
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

MODULAÇÃO DO METABOLISMO MUSCULAR DE GLICOSE E PROTEÍNAS PELO EXERCÍCIO EM RATOS DIABÉTICOS

CAMILA APARECIDA MACHADO DE OLIVEIRA

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

Rio Claro
Outubro de 2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE

CAMILA APARECIDA MACHADO DE OLIVEIRA

**Orientadora: MARIA ALICE ROSTOM DE
MELLO**

**Co-orientadora: MARIA CRISTINA CINTRA
GOMES-MARCONDES**

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

Rio Claro
Outubro de 2007

PARTE DESTE DOUTORADO FOI DESENVOLVIDO NO DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR MÉDICA DA UPPSALA UNIVERSITY, NA CIDADE DE UPPSALA, SUÉCIA, SOB ORIENTAÇÃO DO PROF. DR. ERIK GYLFE. AS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NESSE PERÍODO ENCONTRAM-SE DESCRITAS NO APÊNDICE 1 DESTA TESE, E CONTARAM COM AUXÍLIO FINANCEIRO, NA FORMA DE BOLSA DE DOUTORADO SANDUÍCHE, DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES).



*Aos animais de laboratório, por
darem a vida à ciência.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelas oportunidades.

À meus pais Bernadete e Vicente, e meu irmão Felipe, pelo apoio e ajuda em todos os momentos e por serem motivo de orgulho e alegria para mim. E claro, aos meus irmãos de 4 patas, por mostrarem em sua pureza o que é realmente relevante na vida.

À Prof^a Dr^a Maria Alice, minha querida orientadora, pelas horas de conversa, pelo incentivo, confiança, paciência e generosidade. É em quem me espelho pra ser uma profissional competente, e a quem serei eternamente grata.

À Prof^a Dr^a Eliete Luciano, uma das grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui, pela bondade, competência e ajuda constante e por continuar acreditando em mim.

À Clarice Sibuya, pelo fundamental auxílio nos experimentos, por me ensinar com tanta atenção as técnicas de laboratório, pela competência, generosidade, e ainda por tornar tão agradáveis esses anos todos no laboratório. Obrigada por tudo Zoraide!

Aos professores do Departamento de Educação Física da Unesp-RC, em especial aos professores Dr. Eduardo Kokubun, Dra. Angelina Zanesco, Dra. Lílian Teresa Bucken Gobbi e Dr. José Roberto Moreira Azevedo, e à Dra. Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes, da Unicamp. Sou grata pela expressiva contribuição desses magníficos professores em minha formação.

Aos amigos Maurício Paiva, Clécia Mota, Carla Ribeiro, Natália Zanirato, Kátia Carnier, Fúlvio Manchado, Camila de Moraes, Aline Casonato e demais pessoas que, de alguma forma, me ajudaram nessa etapa da minha vida.

Aos técnicos do Laboratório de Biodinâmica, Eduardo Custódio (China) e José Roberto Rodrigues da Silva (Beto), pelo auxílio durante o período experimental.

Ao Dr. Erik Gylfe, por me aceitar em seu laboratório e me receber tão bem, à Helene Dansk e Oleg Dyachok pela paciência e por tudo o que me ensinaram sobre indicadores fluorescentes e sistema de visualização de cálcio intracelular, e à Dra. Elaine Vieira, que foi quem abriu as portas pra esse estágio na Suécia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 2005/02139-0, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O exercício físico tem sido recomendado no tratamento do diabetes mellitus e suas complicações metabólicas, mas os mecanismos envolvidos nesta intervenção não são totalmente conhecidos. Pesquisas com modelos animais oferecem oportunidade para o estudo mais aprofundado dessa questão. Contudo, alguns resultados são questionados pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal durante o exercício. Desta forma, o presente estudo foi delineado para analisar os efeitos do treinamento físico realizado em intensidade equivalente à transição aeróbia-anaeróbia (determinada pelo teste de lactato mínimo ou de máxima fase estável de lactato), sobre o metabolismo muscular das proteínas e da glicose e sobre a função endotelial em ratos diabéticos aloxânicos. Para isso foram realizadas 3 séries separadas de experimentos. Para indução do diabetes, ratos jovens da linhagem Wistar receberam aloxana monoidratada Sigma (30 mg/Kg de peso corporal, i.v. – grupo SD). Como controles foram utilizados ratos injetados com tampão citrato (grupo SC). Após 2 semanas da administração da droga, os animais realizaram testes para a identificação da intensidade de exercício correspondente à transição aeróbia-anaeróbia e, a partir de então, parte dos animais controles e parte dos animais diabéticos foram submetidos ao treinamento de natação 1h/dia, 5 dias/semana, com sobrecarga equivalente à transição aeróbia-anaeróbia, por 6-8 semanas (grupos TC e TD, respectivamente). Os animais foram avaliados "in vivo" quanto a tolerância à glicose e sacrificados para coleta de material visando análises "in vitro" no músculo sóleo: captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio, produção de lactato, síntese e degradação de proteínas e avaliação da função endotelial por análise da reatividade da artéria aorta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio. Todas as avaliações foram efetuadas 48 horas após a última sessão de exercício. De uma

forma geral observamos melhorias na tolerância à glicose (melhor tolerância à glicose durante GTTo nos animais TD comparados aos animais SD no estudo 1; menor glicemia em um ponto do GTTo nos animais TD comparados a SD no estudo 3) e no metabolismo da glicose em músculo sóleo isolado (maior oxidação de glicose e síntese e teor de glicogênio no músculo sóleo isolado nos animais TD no estudo 2; normalização da síntese de glicogênio no grupo TD no estudo 3) e proteínas (menor degradação protéica no estudo 1), bem como na função endotelial de artéria aorta (restauração da resposta vasodilatadora à acetilcolina no estudo 3) nos animais diabéticos treinados. Além disso, ambos os protocolos utilizados para a determinação da intensidade do exercício foram sensíveis às alterações fisiológicas provocadas pelo diabetes e revelaram prejuízo da capacidade aeróbia dos animais já no início do experimento.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
2.1 Objetivo geral.....	03
2.2 Objetivos específicos.....	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3.1 Diabetes Mellitus.....	05
3.2 Diabetes Mellitus Insulino-Dependente e Exercício.....	09
3.3 Diabetes Experimental.....	11
3.4 Determinação da Transição Aeróbia-Anaeróbia em Exercício de Natação.....	13
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 <i>Animais</i>	17
4.2 <i>Grupos Experimentais e Treinamento Físico...</i>	17
4.3 <i>Indução do Diabetes</i>	18
4.4 <i>Avaliações Efetuadas Antes do Sacrifício</i>	18
4.4.1 Peso corporal, ingestão alimentar e hídrica.....	18
4.4.2 Teste de tolerância à glicose oral.....	18
4.4.3 Determinação da intensidade do esforço durante exercício de natação..	19
4.4.4 Sacrifício dos Animais.....	21
4.5 <i>Avaliações Efetuadas Após o Sacrifício</i>	21
4.5.1 Avaliações efetuadas no sangue.....	21
4.5.2 Avaliações efetuadas em tecidos.....	22
4.6 <i>Análise Estatística</i>	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Primeiro Estudo.....	28
5.2 Segundo Estudo.....	50
5.3 Terceiro Estudo.....	68
6. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES GERAIS.....	103
7. REFERÊNCIAS.....	107
8. ABSTRACT.....	118
9. APÊNDICE 1: Relatório de Doutorado Sanduíche.....	120
10. APÊNDICE 2: Artigo Publicado.....	147

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus caracteriza-se etiológica e clinicamente por um quadro de hiperglicemia, resultante da deficiência parcial ou total da secreção de insulina, ou de uma resposta inefetiva da insulina nos tecidos periféricos sensíveis a ela. Desta forma, existem duas formas básicas da doença, o diabetes mellitus insulino-dependente, e o diabetes mellitus não insulino-dependente (IVY et al., 1999).

O diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM), também conhecido como diabetes mellitus tipo 1, é uma doença autoimune multifatorial, influenciada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (ROSSINI, 2004). Já o diabetes mellitus tipo 2, que representa cerca de 90% dos casos de diabetes, ocorre mais lenta e tardiamente do que o Tipo 1 e é considerado não insulino dependente (NIDDM). Ele pode ser desencadeado por vários fatores tais como obesidade, dieta hipercalórica e falta de atividade física (IVY et al., 1999; POWERS; HOWLEY, 2000).

As complicações do diabetes são graves. A doença é uma das principais causas de cegueira, doença renal, doença macrovascular aterosclerótica e uma variedade de neuropatias debilitantes, diminuindo a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes (EIZIRIK, 1995; KELLY et al., 2003).

Modelos animais para o estudo do diabetes vêm sendo utilizados há muito tempo, permitindo análises mais profundas sobre as causas da doença e, desta forma, são de fundamental importância para a melhor compreensão dessa patologia (ROSSINI, 2004).

Estudos com tais modelos têm demonstrado que a atividade física melhora o quadro da doença, prevenindo disfunções cardíacas (VILLANUEVA et al., 2003), bem como melhorando a tolerância e a homeostase glicêmica (LUCIANO; MELLO, 1998; TANCRÉDE et al., 1982).

Contudo, o estudo dos efeitos metabólicos do exercício em ratos é freqüentemente questionado pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal durante o exercício. Por essa razão, em nosso estudo utilizamos dois protocolos distintos, o de lactato mínimo e o de máxima fase estável de lactato, aplicados em trabalhos diferentes, para a determinação da intensidade do esforço realizada pelos animais. Esses protocolos foram desenvolvidos para ratos em nossos laboratórios, respectivamente, por Voltarelli et al. (2002) e Gobatto et al. (2001), o que nos permitiu uma avaliação mais precisa dos efeitos do exercício em animais diabéticos, uma vez que a intensidade do mesmo era conhecida. Assim, os animais em nosso estudo realizaram exercício de natação em intensidade equivalente a transição aeróbia-anaeróbia por 6-8 semanas, por ser essa intensidade de esforço ideal para a prevenção e/ou reabilitação de doenças (WEINECK, 1999). Ao final desse período, o metabolismo glicídico e protéico, bem como a função endotelial da artéria aorta foram investigados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo foi delineado para avaliar os efeitos do treinamento físico realizado em intensidade equivalente à transição aeróbia-anaeróbia, sobre o metabolismo das proteínas e da glicose e sobre a função endotelial em ratos diabéticos aloxânicos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a intensidade equivalente à transição aeróbia-anaeróbia de ratos diabéticos aloxânicos durante exercício de natação;
- Avaliar os efeitos do treinamento de natação realizado em intensidade equivalente à transição aeróbia-anaeróbia sobre a tolerância à glicose em ratos diabéticos aloxânicos;
- Avaliar os efeitos do treinamento de natação realizado em intensidade equivalente à transição aeróbia-anaeróbia sobre a captação e oxidação de glicose e síntese de glicogênio estimulados pela insulina em músculo sóleo isolado de ratos diabéticos aloxânicos;

- Avaliar os efeitos do treinamento de natação realizado em intensidade equivalente à transição aeróbia-anaeróbia sobre a síntese e degradação de proteínas em músculo sóleo isolado de ratos diabéticos aloxânicos;
- Avaliar os efeitos do treinamento de natação realizado em intensidade equivalente à transição aeróbia-anaeróbia sobre a resposta vasodilatadora da artéria aorta em resposta à acetilcolina (dependente do endotélio) e ao nitroprussiato de sódio (independente do endotélio) em ratos diabéticos aloxânicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus caracteriza-se etiológica e clinicamente por um quadro de hiperglicemia resultante da deficiência parcial ou total da secreção de insulina, ou de uma resposta inefetiva da insulina nos tecidos hepáticos e periféricos sensíveis a ela (IVY et al., 1999). Desta forma, existem duas formas básicas da doença, o diabetes mellitus insulino-dependente, e o diabetes mellitus não insulino-dependente (IVY et al., 1999).

O diabetes mellitus tipo 1, ou diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM) é uma doença autoimune multifatorial, cuja susceptibilidade é determinada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (ROSSINI, 2004). Essa doença é caracterizada por uma 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 a administração exógena do hormônio (KELLY et al., 2003).

O diabetes tipo 2, ocorre mais lenta e tardiamente do que o Tipo 1 e é considerado não insulino dependente (NIDDM). O NIDDM representa cerca de 90% de todos os diabéticos e pode ser desencadeado por fatores tais como a obesidade, dieta hipercalórica e falta de atividade física (IVY et al., 1999; POWERS; HOWLEY, 2000).

Com relação à obesidade, sabe-se que os ácidos graxos interferem na biossíntese e na secreção de insulina pelas células beta e em ações mediadas por esse hormônio, sendo relacionados com o quadro de resistência periférica (BOUCHARD; DESPRÉS, 1989; HAMEL et al., 2003; KREBS et al., 2001; YANEY et al., 2003).

A falta da atividade física é um outro fator que pode aumentar o risco do desenvolvimento do diabetes tipo 2. Estudos epidemiológicos recentes têm proporcionado evidências de que o nível de atividade física está associado com a incidência do diabetes, independentemente da obesidade (BORGHOUTS; KEIZER, 2000). Manson et al. (1991) mostraram que o risco de uma mulher que esteja engajada em algum tipo de exercício no mínimo uma vez por semana desenvolver este tipo de diabetes é 33% menor que em mulheres sedentárias. Além disso, estudos realizados por Kuwajima et al. (1999) utilizando animais geneticamente modificados (ratos que desenvolvem obesidade e intolerância à glicose com 10 semanas de idade) também evidenciaram o efeito profilático da atividade física com relação ao desenvolvimento de NIDDM. A incidência cumulativa de NIDDM nos 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 patologia permaneceu nula durante todo o período experimental.

A hiperglicemia, conforme mencionado anteriormente, é uma característica comum aos dois tipos de diabetes (IDDM e NIDDM) que leva aos principais sintomas

da doença. A elevação 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 (LARSEN et al., 2002).

Essa elevada concentração de glicose sangüínea no diabetes é tóxica, e causa danos micro e macrovasculares sérios. 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. Como resultado, pacientes com diabetes correm um risco muito maior de sofrer infarto do miocárdio, derrame e amputação de membros (BROWNLEE, 2001). E uma vez que as complicações desta doença são fortemente correlacionadas com o tempo de duração da mesma, os pacientes insulino-dependentes, cuja doença se desenvolve mais cedo, são os mais atingidos. Conforme Portuese et al. (1995), a doença cardiovascular é a principal causa de morte no IDDM.

O diabetes desencadeia também importantes alterações no metabolismo protéico, levando a um estado catabólico (CHARLTON; NAIR, 1998).

Nos últimos anos, os principais mecanismos de proteólise foram elucidados. A proteólise muscular ocorre através de vias lisossomal e não lisossomal. A via não lisossomal é controlada pelo sistema ubiquitina-proteossomo, e envolve quebra de proteínas miofibrilares e intracelulares (KEE et al., 2002). A via da ubiquitina é ativada no músculo durante o catabolismo severo (WRAY et al., 2002). Neste processo dependente de energia fornecida pelo ATP, ocorre a ubiquitinização da proteína pela família enzimática ubiquitina E1, E2 e E3 e o complexo proteossomo 26S (ATTAIX et

al., 2001). A proteína poliubiquitinizada é então degradada à polipeptídeos pelo complexo proteossomo 26S (ATTAIX et al., 2001, TAILLANDIER et al., 2004). Essa via pode participar da acentuada degradação protéica observada em ratos diabéticos experimentais (MERFORTH et al., 1999).

Redução da síntese protéica também pode ser observada no diabetes mellitus. A via da mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos), que estimula síntese protéica e crescimento celular (BOLSTER et al., 2004), parece estar reduzida no diabetes experimental. Crozier et al. (2003) encontraram no músculo gastrocnêmio de ratos diabéticos há 3 dias, menor fosforilação da mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e seus substratos, p70^{S6K} e 4E-BP1 e aumento da forma ativa da enzima proteína quinase dependente de AMP (AMPK). A AMPK, considerada um regulador central do status energético, é ativada pelo aumento da concentração de AMP intracelular (RUTTER et al., 2003; CARLING, 2004). De acordo com Kimura et al. (2003) e Gleason et al. (2007), a ativação da AMPK inibe a atividade da p70^{S6K}, possivelmente pela inibição da mTOR (KIMURA et al., 2003). Crozier et al. (2003) sugeriu que a ativação da AMPK, induzida por estresse metabólico no músculo esquelético dos animais diabéticos, tenha causado a redução da síntese protéica por alterar a via de sinalização da mTOR.

A insulina também é capaz de ativar a mTOR pela via PI3K-mTOR. Um intermediário nessa via, a Akt ou proteína quinase B (PKB) bifurca essa via ao fosforilar a mTOR e a GSK3 β (glicogênio sintase quinase-3 β), que quando fosforilada se torna inativa, evitando destruição de algumas proteínas que promovem a proliferação e sobrevivência celular (BERNAL-MIZRACHI et al., 2001; DICKSON; RHODES, 2004; ELGHAZI et al., 2006). A insulina dessa forma tem um importante papel

anabólico, mas também anticatabólico, e em situações crônicas de hipoinsulinemia como no caso de nossos animais diabéticos, a equação claramente se desequilibra a favor do catabolismo protéico.

A deficiência de insulina causa, conjuntamente, uma 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).

O tratamento para o diabetes mellitus insulino-dependente inclui administração exógena de insulina, dieta, educação e atividade física. Já o tratamento básico dos diabéticos NIDDM inclui a dieta e o exercício, para reduzir o peso corporal e auxiliar no controle da glicemia (KELLEY; GOODPASTER, 1999, ZINMAN et al., 2003). Esses cuidados permitem aos pacientes manterem uma vida normal e produtiva. Entretanto, uma significativa proporção dos portadores dessa doença eventualmente desenvolvem 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).

3.2 Diabetes mellitus Insulino-Dependente e Exercício

Atividades físicas aumentam a assimilação de glicose pelas células. O treinamento aumenta a sensibilidade dos tecidos à insulina, reduzindo a sua demanda. Isso ocorre porque o exercício causa múltiplas adaptações no músculo esquelético que contribuem para essa alteração, incluindo aumento na expressão da proteína transportadora de glicose (glut4), aumento da capacidade enzimática e da capilarização muscular (BORGHOUTS; KEIZER, 2000; LEE et al., 2002). Como a musculatura

representa 40% da massa corporal, a atividade muscular é muito significativa para o controle da glicemia (WEINECK, 1999). Contudo, apesar dos benefícios do exercício sobre o controle glicêmico, alguns cuidados devem ser tomados quando se trata de pacientes com IDDM.

Durante a atividade física, o consumo de oxigênio pode aumentar mais de 20%. Para encontrar a energia necessária nestas circunstâncias, o músculo esquelético usa seu próprio estoque de glicogênio e triglicerídeos, bem como os ácidos graxos livres derivados da degradação dos triglicerídeos do tecido adiposo, e a glicose liberada do fígado. Para preservar a função do sistema nervoso central, os níveis sanguíneos de glicose são mantidos durante o exercício (ZINMAN et al., 2003). Isso ocorre devido a ajustes metabólicos em grande parte mediados por hormônios, tais como insulina, glucagon e catecolaminas. Entretanto, este ajuste é perdido em indivíduos com diabetes tipo 1. Como consequência, quando indivíduos diabéticos têm muito pouca insulina na circulação devido à uma terapia inadequada, uma excessiva liberação de hormônios contra-regulatórios durante a atividade física poderia aumentar os já elevados níveis de glicose e corpos cetônicos, conduzindo à cetoacidose diabética. Por outro lado, a presença de altos níveis de insulina, devido à administração exógena do hormônio, pode atenuar ou prevenir o aumento da mobilização de glicose e outros substratos induzidos pela atividade física, causando hipoglicemia (ZINMAN et al., 2003).

Além disso, deve ser levado em consideração, quando um diabético estiver envolvido em algum programa de atividade física, que essa patologia pode causar significativo prejuízo da capacidade aeróbia (OLIVEIRA et al., 2007, NIRANJAN et al., 1997). Niranjana et al. (1997) encontraram, entre outras alterações, redução do volume

sistólico e restrição do volume pulmonar em jovens diabéticos insulino-dependente (NIRANJAN et al., 1997).

Todavia, apesar dos problemas descritos acima, indivíduos portadores de diabetes devem ser fortemente estimulados a realizar alguma forma de atividade física, cujos benefícios são amplamente conhecidos, inclusive seu papel como agente profilático em um grande número de doenças (ASTRAND, 1992; VILLANUEVA et al., 2003).

Entretanto, existe um consenso sobre a importância da realização de exames médicos por diabéticos antes dos mesmos submeterem-se a um programa de atividade física. Estes exames devem verificar se existem complicações macro e microvasculares que podem ser pioradas pelo exercício, além de sintomas e sinais de danos no coração, olhos, rins, pés e sistema nervoso (GALLEN, 2003; ZINMAN et al., 2003). Uma vez afastadas as possibilidades de danos cardiovasculares e outras complicações, o portador de diabetes poderá submeter-se, sem contra-indicações, a um programa de atividade física, inclusive atividades aeróbias de longa duração, desde que haja um ajuste, se necessário, no regime diário de injeção de insulina (GALLEN, 2003).

3.3 Diabetes experimental

Modelos animais para o estudo do diabetes vêm sendo utilizados há muito tempo, permitindo análises mais profundas sobre as causas da doença e, desta forma, são de fundamental importância para a melhor compreensão dessa patologia (ROSSINI, 2004).

Uma das formas de indução de diabetes experimental em ratos é através do uso de substâncias que destroem seletivamente as células beta pancreáticas. Esse

procedimento é muito conveniente e simples, e as drogas mais comumente usadas para a indução do diabetes são streptozotocina e aloxana (SZKUDELSKI, 2001).

Essa forma de diabetes quimicamente induzido em animais tem sido amplamente empregada como modelo experimental para os estudos das complicações causadas pelo diabetes. A streptozotocina (STZ) é a droga mais popular para a indução do diabetes em ratos (BALAMURUGAN et al., 2003). Já a aloxana, uma droga mais antiga que a STZ (YAMAGAMI et al., 1985), é menos empregada que esta, devido às dificuldades 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, de forma que nas últimas duas décadas temos conseguido induzir o diabetes e manter os animais em boas condições por longos períodos (LUCIANO; MELLO, 1998; MELLO; LUCIANO, 1995; OLIVEIRA et al., 2002).

A aloxana possui um efeito seletivamente tóxico sobre as células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Embora os mecanismos pelos quais isso ocorre não fossem totalmente conhecidos até recentemente, a forma de ação dessa droga é atualmente melhor compreendida (MROZIKIEWICZ et al., 1994; SZKUDELSKI et al., 2001).

A ação da aloxana no pâncreas é precedida por sua rápida captação pelas células beta, uma importante característica que possibilita seu efeito diabetogênico. Uma vez dentro das células, a aloxana é reduzida à ácido dialúrico, iniciando o ciclo redox e culminando com a formação de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Ocorre também a geração de radicais hidroxil a partir da decomposição catalítica de peróxido de hidrogênio por íons ferro. A oxidação de grupos -SH essenciais, pelos quais a aloxana tem grande afinidade, incluindo a enzima glicoquinase, que é inativada nesse

processo, também contribui para a ação tóxica da aloxana. Todas essas ações, somadas a um simultâneo aumento massivo no cálcio citosólico, causam rápida destruição das células beta das ilhotas de Langerhans localizadas no pâncreas (SZKUDELSKI et al., 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, polifagia, poliúria, glicosúria, cetonúria, hiperglicemia e cetonemia, mostrando desta forma que a aloxana é um composto adequado para a indução de diabetes experimental em animais.

Diversos estudos em modelo experimental têm demonstrado que a atividade física melhora o quadro do diabetes com ratos, prevenindo disfunções cardíacas causadas pela doença (VILLANUEVA et al., 2003), bem como melhorando a tolerância e a homeostase glicêmica (LUCIANO; MELLO, 1998; TANCRÉDE et al., 1982). Contudo, o estudo dos efeitos metabólicos do exercício em ratos é freqüentemente questionado pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal durante o exercício. Por essa razão, em nosso estudo utilizamos dois protocolos distintos, o de lactato mínimo e o de máxima fase estável de lactato, aplicados em trabalhos diferentes, para a determinação da intensidade do esforço realizada pelos animais. Esses protocolos foram desenvolvidos para ratos em nossos laboratórios, respectivamente, por Voltarelli et al. (2002) e Gobatto et al. (2001), o que nos permitiu uma avaliação mais precisa dos efeitos do exercício em animais diabéticos, uma vez que a intensidade do mesmo era conhecida.

3.4 Determinação da Transição Aeróbia-Anaeróbia em Exercício de Natação

Optamos por utilizar em nosso estudo, dois diferentes protocolos para a determinação da intensidade de esforço equivalente à transição aeróbia-anaeróbia, o teste da máxima fase estável de lactato e o teste do lactato mínimo, ambos originalmente e usualmente aplicados em humanos e adaptados às condições do rato em nossos laboratórios.

O teste da máxima fase estável de lactato, proposto por Heck et al. (1985) para humanos, foi adaptado para ratos em nossos laboratórios por Gobatto et al. (2001). Nesse teste, os animais previamente adaptados ao meio líquido são submetidos a 20 minutos de natação suportando sobrecargas aleatórias e amostras de sangue são coletadas para determinar a concentração de lactato sangüíneo. A estabilização do lactato sangüíneo é definida como uma variação da concentração de lactato, entre o 10^o e o 20^o minuto, menor que 1 mmol/L (GOBATTO et al., 2001).

A máxima fase estável de lactato (MFEL) é definida como a concentração de lactato e a carga de trabalho mais elevadas que podem ser mantidas ao longo do tempo sem acúmulo contínuo do lactato sangüíneo (BILLAT et al., 2003) e, teoricamente, indica a transição metabólica aeróbia-anaeróbia no exercício.

A sobrecarga equivalente à MFEL é correlacionada com e usada na avaliação da capacidade aeróbia de atletas. A determinação da MFEL também tem se mostrado útil em estudos clínicos (WASSERMAN; Mc. ILROY, 1964) e em modelos experimentais com ou sem patologia associada (PILLIS et al., 1993; GOBATTO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

Esta sobrecarga elicita uma concentração média de lactato de 4,0 mmol/L e por essa razão a MFEL tem sido estimada pela carga que provoca a elevação da concentração sangüínea de lactato para esse valor em testes incrementais (HECK et al.,

1985, BILLAT et al., 2003). Contudo, o uso de tal parâmetro para a determinação da MFEL é freqüentemente questionada em função da grande variação individual (de 2 a 8 mmol/L) e da constatação de que os valores de lactato correspondentes à MFEL podem variar dependendo do ergômetro utilizado (BENEKE, 1995). Essa hipótese, levantada por Gobatto et al. (2001) em estudos com ratos, foi posteriormente confirmada por Manchado et al. (2006). Em algumas condições patológicas, como o diabetes mellitus, o uso de valores fixos de lactato também deve ser evitado. Nessa doença, o metabolismo de lactato é prejudicado e hiperlactacidemia pode ocorrer (PY et al., 2001).

O teste do lactato mínimo foi desenvolvido por Tegtbur et al., em 1993. Esse teste envolve a realização de exercícios intensos por curto período de tempo para indução da hiperlactacidemia antes do início do exercício incremental. Uma curva em forma de “U” é obtida com os valores de lactato e carga de trabalho durante o teste incremental. O valor mínimo de lactato durante o teste incremental supostamente indica o limiar de lactato, ou transição aeróbia-anaeróbia (JONES; DOUST, 1998).

De acordo com Voltarelli et al. (2002), que adaptou o teste do lactato mínimo para exercício de natação em ratos, houve estabilização da concentração de lactato sangüíneo na carga equivalente ao menor valor de lactato, e sobrecargas maiores levaram ao aumento dos níveis circulantes deste substrato. Desta forma, a carga em que é observada a menor concentração de lactato durante teste do lactato mínimo coincide com a máxima fase estável de lactato (VOLTARELLI et al., 2002).

Em indivíduos sedentários, a transição metabólica aeróbia-anaeróbia ocorre entre 50 e 60% do consumo máximo de oxigênio. Sobrecargas necessárias para se alcançar essa intensidade de exercício são ideais para a prevenção e/ou reabilitação de

doenças (WEINECK, 1999), sendo dessa forma a intensidade de esforço ideal para nosso estudo.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados ratos, adultos-jovens, da linhagem Wistar. Os animais, provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu foram mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física – IB – UNESP – Rio Claro. Os ratos foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Purina) e água “ad libitum”, e mantidos em gaiolas plásticas coletivas (5 por gaiola) à temperatura ambiente de 25 °C e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com a European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Concil of Europe nº 123, Strasbourg 1985).

4.2 Grupos Experimentais e Treinamento Físico

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- Sedentário Controle (SC);
- Sedentário Diabético (SD);
- Treinado Controle (TC);
- Treinado Diabético (TD);

O treinamento consistiu de 6-8 semanas de exercícios de natação em tanques coletivos (100 cm x 80 cm x 80 cm), contendo água à 30-32°C, 5 dias por semana, suportando sobrecarga equivalente à transição aeróbia-anaeróbia/MFEL.

4.3 Indução do Diabetes

Para a obtenção do diabetes experimental, os ratos depois de permanecerem 15 horas em jejum foram anestesiados com éter etílico para receberem aloxana monoidratada Sigma (30 mg/Kg de peso corporal), dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 e injetada na veia peniana dorsal (LUCIANO; MELLO, 1998). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL (de acordo com American Diabetes Association, 2005) 2 semanas após a administração de aloxana. A comprovação do diabetes foi realizada 2 semanas após a administração de aloxana, através de determinação dos níveis glicêmicos pelo método da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990).

4.4 Avaliações Efetuadas Antes do Sacrifício

4.4.1 Peso Corporal, Ingestão Alimentar e Hídrica

Os animais tiveram peso corporal e ingestão alimentar e hídrica registrados semanalmente.

4.4.2 Teste de Tolerância à Glicose Oral (oGTT)

O oGTT foi realizado após 15 horas de jejum, 2 semanas após a administração da aloxana e ao final do período experimental, após 6-8 semanas de treinamento. Os ratos foram moderadamente anestesiados com éter etílico e a primeira coleta de sangue

foi feita da cauda do animal ao tempo zero (0). Em seguida, uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago pôr via oral e uma solução de glicose de 80% (2 g/Kg de peso corporal) administrada. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0 (T0), 30 (T30), 60 (T60) e 120 (T120) minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL. Após a administração da glicose a determinação da glicemia foi realizada pelo método da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990) através da coleta de 25 µL de sangue e dissolvidos em 200 µL de TCA 4%. As áreas sob as curvas de glicose sangüínea ($\text{mg/dL} \times 120 \text{ min}^{-1}$) durante o oGTT foram calculadas pelo método trapezoidal (MATTHEWS et al., 1990) utilizando o *Software* ORIGIN 6.0 (1999).

4.4.3 Determinação da Intensidade do Esforço Durante Exercício de Natação

Um de dois protocolos descritos a seguir foi usado, em estudos separados, para determinar a intensidade do esforço realizada durante exercício de natação e avaliar a capacidade aeróbia dos animais.

4.4.3.1 Teste do Lactato Mínimo

O Lan foi determinado pelo teste do lactato mínimo, conforme proposto para humanos (JONES; DOUST, 1998; TEGTBUR et al., 1993), modificado para ratos. Este teste envolve: a) um período breve de exercício de alta intensidade para provocar um aumento de lactato sangüíneo circulante; b) um período de breve recuperação para assegurar níveis altos de lactacemia e c) um protocolo de teste de exercício com cargas progressivas, com coleta de sangue para análise de lactato a cada carga. Uma vez que a porção progressiva do teste de lactato mínimo começa quando o sujeito apresenta níveis

altos de lactato sanguíneo, o teste progressivo produz um perfil de lactato sanguíneo característico, em forma de “U”. O lactato mínimo sanguíneo foi definido como a intensidade de exercício na qual a “curva em forma de U”, derivada dos valores de lactato sanguíneo obtidos durante o teste do lactato mínimo, atinja o nadir (TEGTBUR et al., 1993). Partindo desse conceito de lactato mínimo, foi realizado em nosso laboratório estudo para adaptar o teste às condições do rato (VOLTARELLI et al., 2002). O protocolo empregado, descrito a seguir, mostrou-se exequível e foi utilizado no presente estudo.

Inicialmente, 48 horas após realização do oGTT, os animais foram colocados no tanque cheio d’água suportando sobrecarga de 50% do peso corporal e exercitaram-se anaerobiamente (saltos) durante 3 minutos (30 segundos de atividade interrompidos por 30 segundos de repouso), para a elevação da concentração de lactato sanguíneo circulante. Em seguida, foram coletadas amostras de sangue através de corte na extremidade da cauda do animal, para a determinação da concentração do substrato. Após 9 minutos de repouso, os animais iniciaram exercício (natação) com intensidades progressivamente maiores. A primeira carga equivaliu a 4,5% p.c. para animais controles e 2,5% p.c. para os animais diabéticos, sendo acrescida de 0,5% a cada 5 minutos, durante 20 minutos. Ao final dos 9 minutos de repouso e a cada troca de carga, foi coletada amostra de sangue para dosagem de lactato pelo método enzimático (ENGEL; JONES, 1978).

4.4.3.2 Teste da Máxima Fase Estável de Lactato (TMFEL)

O Teste da Máxima Fase Estável de Lactato foi adaptado às condições do rato por Gobatto et al. (2001). Esse teste consistiu na realização de sessões de natação com

duração de 20 min., em tanques com as dimensões 100 x 80 x 80 cm e água mantida à 32 ± 1 °C, suportando uma sobrecarga atada ao peito de 4% p.c. para os animais diabéticos e 5% p.c. para o grupo controle, na primeira sessão. Amostras de sangue (25 µL) foram coletadas em repouso (T0) e a cada 5 minutos (T5, T10, T15 e T20), da extremidade distal da cauda do animal para dosagem de lactato pelo método enzimático (ENGEL; JONES, 1978). Então, dependendo do resultado do teste anterior, a sobrecarga foi reduzida, se o lactato sangüíneo aumentou continuamente sem estabilizar, ou aumentada, se houve estabilização, em 0,5% p.c. Entre cada sessão de teste houve um intervalo de 48 h e foram necessários de 3 a 4 testes para encontrar a MFEL. A estabilização do lactato sangüíneo foi definida como uma variação da concentração de lactato, entre o 10º e o 20º minuto, menor que 1 mmol/L; e a MFEL, como a sobrecarga mais alta em que a concentração de lactato se estabilizou.

4.4.4 Sacrifício dos Animais

Após 6-8 semanas de treinamento, decorridas 48 horas do teste de tolerância, todos os animais foram sacrificados por decapitação, sem jejum prévio, para a obtenção de material biológico.

4.5 Avaliações Efetuadas Após o Sacrifício

4.5.1 Avaliações Efetuadas no Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para verificação dos teores de glicose, ácidos graxos livres, proteínas totais, albumina (NOGUEIRA et al., 1990) e insulina (HERBERT et al., 1965).

4.5.2 Avaliações Efetuadas em Tecidos

4.5.2.1 Extração da Insulina Pancreática

Inicialmente, 0,2 g de pâncreas foram coletados em frascos contendo 2 mL de HCl 1N. O material foi incubado em estufa a 40 °C durante 24 horas. O material assim extraído do pâncreas foi diluído 1:5000 em soro-albumina bovina a 0,25% em tampão borato pH 5,5, conforme preconiza Carpinelli (1978). O teor das amostras foi dosado pelo método do radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

4.5.2.2 Metabolismo da Glicose pelo Músculo Sóleo Isolado

Fatias musculares longitudinais pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [U - ^{14}C] glicose (25 $\mu\text{Ci/mL}$), [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) e insulina (100 mU/mL) dentro de frascos de vidro por cerca de 1 hora e meia e gaseamento contínuo com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante em banho-maria (37°C). O CO_2 liberado foi captado por hiamina 10x, colocada em aparato de vidro inserido no frasco anteriormente citado. Foi avaliada a captação de glicose utilizando-se a 2-deoxiglicose (2-DG) como marcador, e a incorporação do ^{14}C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ^3H da 2-DG e do ^{14}C da glicose, respectivamente. A medida da quantidade de glicose oxidada foi feita através da radioatividade do ^{14}C presente na hiamina. Fatias musculares não incubadas foram utilizadas para avaliação dos teores de glicogênio (DUBOIS et al., 1956). O lactato radioativo liberado no meio de incubação foi determinado por separação de metabólitos em coluna de troca iônica (Dowex-2, Sigma). Além do lactato radioativo foi também determinado o total de lactato no meio de incubação por método enzimático (ENGEL; JONES, 1978).

4.5.2.3 Metabolismo das Proteínas no Músculo Sóleo Isolado

4.5.2.3.1 Síntese de Proteína

Fatias longitudinais (70 mg) 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 [100 µU/mL], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para o novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 µCi/mL] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloro acético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000 rpm 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 (DARDEVET et al., 2000). O conteúdo de proteína muscular foi determinado pelo método folin fenol 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 incorporada por miligrama de proteína por 2 (duas) horas.

4.5.2.3.2 Degradação de Proteína

A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice de degradação protéica. Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias

longitudinais musculares (70 mg) foram pré-incubadas em tampão Kregs-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 (5 µU/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 (duas) horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para a determinação do teor de tirosina (SEIDER et al., 1980).

4.5.2.4 Avaliação da Reatividade Muscular em Artéria Aorta

As artérias aorta foram cuidadosamente removidas e imediatamente colocadas em solução Krebs-Ringer contendo (mM): NaCl, 118; NaHCO₃, 25; glicose, 5,6; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄ 7H₂O, 1,17 e CaCl₂ 2H₂O, 2,5. Tecidos aderentes foram removidos das artérias, que foram então cortadas em anéis de aproximadamente 2 mm. Cada anel foi montado em uma cuba para órgão isolado de 10 mL com solução Krebs à 37°C, pH 7,4, e continuamente gaseado com uma mistura de 95% O₂ e 5% CO₂. O tecido foi então suspenso entre dois ganchos de metal, um deles fixo e o outro conectado a um transdutor de força, permitindo assim um ajuste preciso da tensão. A tensão inicial de 10 mN foi aplicada aos tecidos e periodicamente ajustadas até que ocorresse estabilização da tensão nos mesmos. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistemas de aquisição de dados da PowerLab 400TM (software versão 4.2, AD Instruments, MA, EUA).

4.5.2.5 Curvas Concentração-Efeito em Anéis de Artéria Aorta

Curvas concentração-efeito cumulativas para os agonistas vasodilatadores acetilcolina (ACh, 10 mM- 100 μ M) e nitroprussiato de sódio (SNP, 100 pM - 100 nM) foram obtidas do endotélio intacto dos anéis aórticos dos diferentes grupos experimentais. Para as curvas concentração-efeito ao agente dilatador, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (1 μ M). As respostas relaxantes foram analisadas como porcentagem da contração induzida por fenilefrina. As curvas concentração-efeito foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações da droga utilizada em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). Os dados obtidos foram avaliados segundo a equação descrita abaixo:

$$E = E_{\max} / ((1 + (10^c / 10^x)^n) + \Phi)$$

A letra E representa o efeito do agonista na resposta tecidual; $E_{\max}$ representa a resposta máxima que o agonista pode produzir; c representa o logaritmo da EC_{50} (concentração do agonista que produz metade da resposta máxima); x representa o logaritmo das concentrações do agonista; o exponencial n é o coeficiente angular ou inclinação, o qual define o tipo de curva concentração-efeito obtida, e o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista. Análises de regressão não linear para determinar os parâmetros $E_{\max}$, log EC_{50} e n foram feitas pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego-CA,USA) assumindo-se que $\Phi =$ zero.

4.6 Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA-Two Way). Quando necessário, foi utilizado o teste Post Hoc de Newman-Keuls, com um nível de significância pré-estabelecido de 5%.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados na forma de artigo, como segue:

5.1 Primeiro Estudo: Efeitos do treinamento de natação em intensidade equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia em ratos diabéticos aloxânicos.

5.2 Segundo Estudo: Metabolismo de glicose em ratos diabéticos exercitados na intensidade da transição aeróbia/anaeróbia.

5.3 Terceiro Estudo: Metabolismo muscular e função endotelial em ratos diabéticos exercitados na intensidade da máxima fase estável de lactato.

1º ESTUDO

**Efeitos do treinamento de natação em intensidade equivalente à transição
metabólica aeróbia/anaeróbia em ratos diabéticos aloxânicos**

**Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic
metabolic transition in alloxan diabetic rats**

Journal of Diabetes Complications, v.21, n.4, p.258-264, 2007

Camila A. M. de Oliveira¹, Eliete Luciano¹, Maria Cristina C. G. Marcondes², Maria
Alice R. de Mello¹

¹ Departamento de Educação Física, Unesp, Rio Claro – SP, Brasil

² Departamento de Fisiologia e Biofísica, Unicamp, Campinas – SP, Brasil

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar a intensidade de exercício equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia de ratos diabéticos aloxânicos, através do teste do lactato mínimo (TLM), e avaliar os efeitos do treinamento de natação nesta intensidade (LM) bem como os efeitos do diabetes sobre o condicionamento aeróbio e metabolismo glicídico e protéico desses animais. Ratos Wistar adultos receberam aloxana (SD) via endovenosa (30 mg/Kg p.c.). Como controles (SC) foram utilizados ratos injetados com tampão citrato. Duas semanas após a administração da droga foi realizado teste de tolerância a glicose (oGTT) e TLM para avaliação do metabolismo glicídico e do condicionamento aeróbio dos animais, respectivamente. Após os testes, parte dos animais realizaram exercícios de natação (TC e TD), 1 h/dia, 5 dias/semana, com sobrecarga equivalente ao LM, durante 6 semanas. Ao término desse período, os animais foram submetidos a novo oGTT e TLM, e foram sacrificados, por decapitação, 48 horas após a realização dos testes para análises sanguíneas e do metabolismo protéico (síntese e degradação de proteínas). A carga equivalente ao LM no início do experimento foi menor nos animais SD em relação à SC. Ao final das 6 semanas de treinamento a carga equivalente ao LM foi maior nos animais dos grupos treinados (TC e TD) quando comparados aos respectivos grupos sedentários (SC e SD). A glicemia dos animais TD durante oGTT foi menor que a dos animais DS. Além disso, a degradação protéica foi maior no grupo SD que nos demais. Concluímos que o teste do lactato mínimo foi sensível as severas alterações metabólicas e fisiológicas provocadas pelo diabetes não controlado. O treinamento na intensidade do LM para animais diabéticos melhorou o condicionamento aeróbio e o metabolismo glicídico e protéico.

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo I, ou diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM) é uma doença autoimune multifatorial, cuja susceptibilidade é determinada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais (ROSSINI, 2004).

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, resultando em hiperglicemia crônica (BROWNLEE, 2001). A elevada concentração de glicose sangüínea no diabetes é tóxica, e causa danos micro e macrovasculares sérios.

A doença é uma das principais causas de cegueira, doença renal, doença macrovascular aterosclerótica e uma variedade de neuropatias debilitantes, diminuindo a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes (EIZIRIK, 1995; KELLY et al., 2003).

Modelos animais para o estudo do diabetes vêm sendo utilizados há muito tempo, permitindo análises mais profundas sobre as causas da doença e, desta forma, são de fundamental importância para a melhor compreensão dessa patologia (ROSSINI, 2004).

Estudos com tais modelos têm demonstrado que a atividade física melhora o quadro da doença, prevenindo disfunções cardíacas (VILLANUEVA et al., 2003), bem como melhorando a tolerância e a homeostase glicêmica (LUCIANO; MELLO, 1998; TANCRÉDE et al., 1982). Contudo, o estudo dos efeitos metabólicos do exercício em ratos é freqüentemente questionado pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal durante o exercício. Por essa razão, recentemente em nossos laboratórios, foi padronizado um protocolo para determinação da intensidade do esforço equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia durante o exercício em

ratos (VOLTARELLI et al., 2002), baseado no teste do lactato mínimo (TEGTBUR et al., 1993). Desta forma, uma avaliação mais precisa dos efeitos do exercício em animais diabéticos poderá ser feita, uma vez que a intensidade do mesmo será conhecida.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar a intensidade do esforço equivalente à transição metabólica (LM) de animais diabéticos aloxânicos através do teste do lactato mínimo (TLM), verificar se este teste é sensível às alterações fisiológicas e metabólicas provocadas pelo diabetes e às alterações do condicionamento aeróbio decorrentes do treinamento de natação na carga equivalente ao LM individual, e avaliar os efeitos do treinamento de natação sobre o metabolismo glicídico e proteico em intensidade conhecida de exercício (LM).

MÉTODOS

Animais

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar adultos, mantidos em biotério à $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro, com livre acesso à comida e água. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com a European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Concil of Europe nº 123, Strasbourg 1985).

Indução do Diabetes

Depois de permanecerem 15 horas em jejum, os animais receberam aloxana monoidratada (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) na concentração de 30 mg/Kg de peso corporal, dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 injetada na veia peniana

dorsal (LUCIANO; MELLO, 1998). Como controles foram utilizados ratos injetados com veículo (tampão citrato).

Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL (de acordo com American Diabetes Association, 2005) 2 semanas após a administração de aloxana. Os níveis glicêmicos foram determinados pelo método da glicose-oxidase (Kit Laborlab).

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Sedentário Controle (SC) = ratos que receberam injeção de veículo e permaneceram sedentários; Treinado Controle (TC) = ratos que receberam injeção de veículo e executaram um programa de um exercício de 6 semanas; Sedentário Diabético (SD) = ratos que receberam injeção de aloxana e permaneceram sedentários; Treinado Diabético (TD) = ratos que receberam injeção de aloxana e executaram um programa de um exercício de 6 semanas.

Peso corporal e Ingestão Alimentar e Hídrica

Todos os animais tiveram peso corporal e ingestão alimentar e hídrica registrados uma vez por semana.

Teste de Tolerância à Glicose Oral (oGTT)

O teste de tolerância à glicose foi realizado 2 semanas após a administração da aloxana e ao final do período experimental, após 6 semanas de treinamento. A primeira coleta de sangue foi feita da cauda do animal, após jejum de 15 horas (T0). Em seguida,

uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago pôr via oral e uma solução de glicose 80% (2,0 g/Kg de peso corporal) administrada. Então, amostras de sangue foram coletadas 30 (T30), 60 (T60) e 120 (120) minutos após a administração de glicose. Todas as amostras sanguíneas foram coletadas da extremidade distal da cauda do animal com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL. A determinação da glicemia foi realizada pelo método da glicose-oxidase (Kit Laborlab). A área sob a curva de glicose sanguínea ($\text{mg/dL} \times 120 \text{ min}^{-1}$) durante o oGTT foi calculada pelo método trapezoidal (MATTHEWS et al., 1990) utilizando o *Software* ORIGIN® 6.0 (1999).

Teste do Lactato Mínimo (TLM)

O TLM consistiu na realização de um breve período de exercício supramáximo para induzir hiperlactacemia antes de iniciar um teste incremental de natação. Para produzir hiperlactacemia, os ratos foram induzidos a saltar na água por 6 min (30s exercício/30s repouso) suportando sobrecarga equivalente à 50% do peso corporal atada ao tórax em um tanque cilíndrico (50 cm de profundidade e 25 cm de diâmetro, preenchido com água à $32 \pm 1^\circ\text{C}$). Após intervalo de 9 minutos, amostras de sangue (25 µl) foram coletadas, e então, os ratos foram submetidos à um teste de natação com cargas progressivamente maiores. A primeira carga foi de 4,5% p.c. para animais controles e 2,5% p.c. para os animais diabéticos, sendo acrescida de 0,5% a cada 5 minutos, durante 20 minutos. A cada troca de carga foram coletadas amostras de sangue (25 µl) para dosagem de lactato pelo método enzimático (ENGEL; JONES, 1978). Todas as amostras de sangue foram coletadas da extremidade distal da cauda do animal.

Uma vez que a porção progressiva do teste de lactato mínimo começa quando o animal apresenta níveis altos de lactato sanguíneo, o teste progressivo produz um perfil de lactato sanguíneo característico, em forma de “U”. O lactato mínimo (LM) sanguíneo foi definido como a intensidade de exercício na qual a “curva em forma de U”, derivada dos valores de lactato sanguíneo vs carga de trabalho, obtidos durante o teste do lactato mínimo, atinja o nadir (TEGTBUR et al., 1993). Este valor mínimo corresponde, teoricamente, à transição metabólica aeróbia/anaeróbia.

O LM sanguíneo foi determinado à partir do ajuste polinomial de grau 2 da curva, usando um programa de computador (ORIGIN® 6.0).

Protocolo de Treinamento Físico

Os animais realizaram exercício de natação, 1 h/dia, 5 dias/semana, durante 6 semanas, com sobrecarga atada ao peito (em % do peso corporal) correspondendo ao L_{an} individual dos animais, obtido no teste do lactato mínimo, em tanques com água à temperatura de 32 ± 1 °C.

Sacrifício dos Animais

Após 6 semanas de treinamento, decorridas 48 horas do teste de tolerância, todos os animais foram sacrificados por decapitação, sem jejum prévio, para a obtenção de material biológico.

Avaliações Efetuadas Após o Sacrifício

Sangue

No momento do sacrifício, amostras sanguíneas foram coletadas para a determinação dos teores de glicose, ácidos graxos livres, proteínas totais (NOGUEIRA et al., 1990) e insulina (HERBERT et al., 1965).

Músculo Esquelético

Síntese de Proteína

Fatias longitudinais (70 mg) 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 [100 μ U/mL], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para o novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 μ Ci/mL] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloro acético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000 rpm 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 (DARDEVET et al., 2000). O conteúdo de proteína muscular será determinado pelo método folin fenol e a radioatividade incorporada à proteína muscular será medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica será calculada dividindo-se a radioatividade incorporada pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação e expressa como nanomoles de fenilalanina incorporada por miligrama de proteína por 2 (duas) horas.

Degradação de Proteína

A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice de degradação protéica. Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias longitudinais musculares (70 mg) foram pré-incubadas em tampão Kregs-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 (5 µU/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 incubadas por 2 (duas) horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para a determinação do teor de tirosina (SEIDER et al., 1980).

Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, e foram analisados estatisticamente pela ANOVA Two-Way seguida de teste *post-hoc* de Newman-Keuls. O nível de significância pré-estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

Os valores referentes ao peso corporal dos animais durante o experimento encontram-se na Figura 1. A análise de variância indicou que os animais dos grupos que receberam a droga (SD e TD) tiveram menor peso corporal ($p < 0,05$) que os demais grupos. Na Figura 2 encontram-se os resultados da ingestão alimentar dos ratos no decorrer do estudo. Os grupos tratados com aloxana tiveram maior ingestão alimentar ($p < 0,05$) que os grupos controles durante todo o período. Além disso, na 4^a e 6^a semanas,

o grupo TD apresentou maior ingestão de alimento ($p<0,05$) que o grupo SD. A ANOVA mostrou ainda interação entre droga e treino na 6ª semana (Figura 2). Com relação à ingestão hídrica, esta foi maior ($p<0,05$) nos animais dos grupos SD e TD quando comparadas aos animais dos grupos SC e TC (Figura 3).

No teste de tolerância à glicose (oGTT) realizado no início do experimento, o grupo SD apresentou maior glicemia ($p<0,05$) que o grupo SC em todos os momentos, ou seja, em jejum e 30, 60 e 120 minutos após sobrecarga oral de glicose. Conseqüentemente, o grupo SD apresentou também maior área sob a curva glicêmica (Figura 4).

Após 6 semanas, novo teste de tolerância à glicose foi realizado. Nessa fase, a ANOVA apontou diferenças em função da droga, treino e interação droga e treino. A glicemia dos grupos SD e TD foi maior ($p<0,05$) que a dos demais grupos (SC e TC) durante todo o teste. Entretanto, os ratos diabéticos que treinaram na intensidade do LM tiveram menores valores de glicose ($p<0,05$) no oGTT que os ratos diabéticos sedentários. O mesmo ocorreu com a área sob a curva glicêmica (Figura 5).

A Tabela 1 contém os valores médios de lactato e carga correspondentes ao limiar anaeróbio dos animais no início do experimento de acordo com o teste do lactato mínimo. A carga suportada pelos animais (em % do peso corporal) equivalente ao lactato mínimo foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo controle (SC) comparado ao grupo diabético (SD). Contudo, os valores de lactato nas cargas equivalentes ao LM não diferiram entre os grupos.

A Tabela 2 mostra os resultados do teste do lactato mínimo realizado após 6 semanas de treinamento. Na carga equivalente ao LM, os animais treinados tiveram menor valor de lactato que os animais sedentários de seus respectivos grupos ($TC<SC$;

TD<SD). Por outro lado, a carga equivalente ao LM foi significativamente maior nos animais treinados comparados aos sedentários dos mesmos grupos (TC>SC; TD>SD). Ainda observamos que as cargas equivalentes ao LM dos grupos diabéticos (SD e TD) foram significativamente menores que as dos grupos controles (SC e TC) (Tabela 4).

A Figura 6 apresenta a curva de lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante TLM de um rato controle (C) e um rato diabético (D) antes e depois de 6 semanas de treinamento de natação na intensidade equivalente ao LM.

Na Tabela 3 são apresentados os valores séricos de glicose, insulina, proteínas totais e ácidos graxos livres (A.G.L.) dos ratos após o sacrifício. Os grupos SD e TD tiveram maior glicemia e menor insulinemia que os grupos SC e TC. Com relação às proteínas totais, nenhuma diferença significativa foi observada. Os teores de A.G.L. foram significativamente maiores no grupo TD em relação aos demais.

A Tabela 4 mostra os valores de síntese e degradação protéicas no músculo sóleo incubado dos animais. Embora a síntese de proteína não tenha sido diferente entre os grupos, a degradação foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo SD que nos demais grupos.

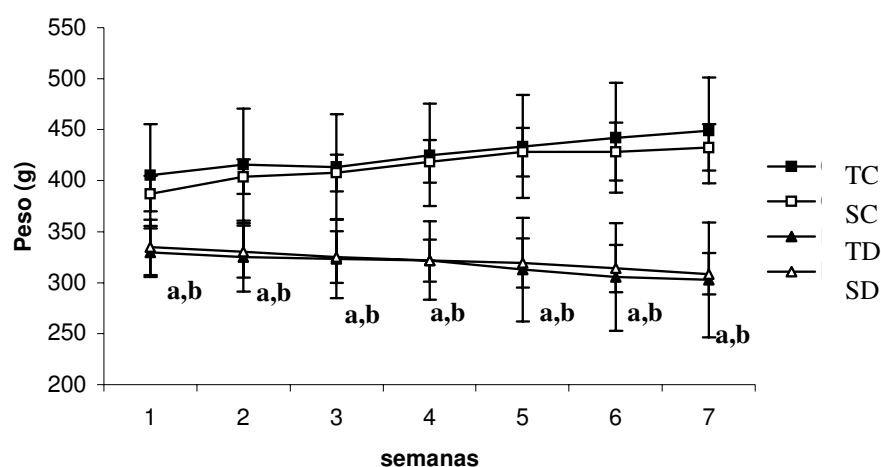


Figura 1: Peso dos animais durante o período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 6$ animais por grupo. $a \neq SC$; $b \neq TC$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

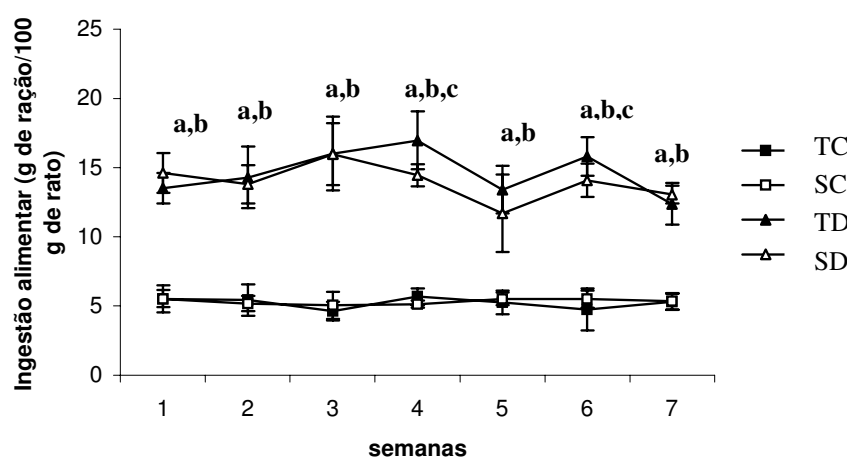


Figura 2: Ingestão alimentar dos animais durante o período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 6$ animais por grupo. $a \neq SC$; $b \neq TC$, $c \neq SD$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

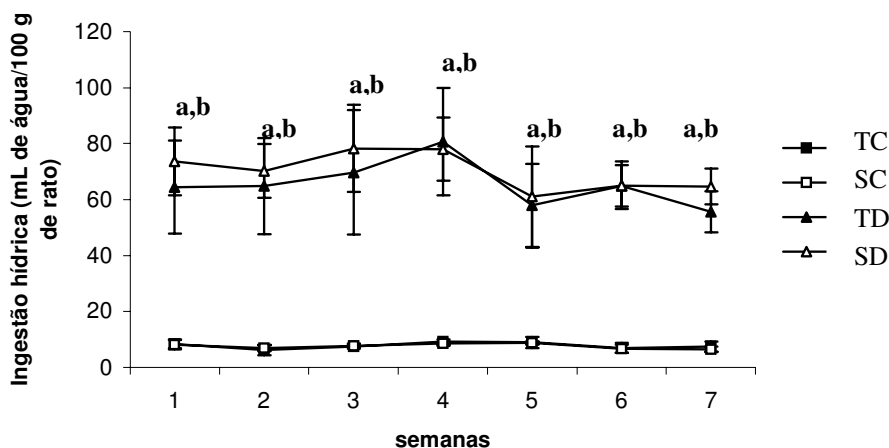


Figura 3: Ingestão hídrica dos animais durante o período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 6$ animais por grupo. $a \neq SC$; $b \neq TC$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

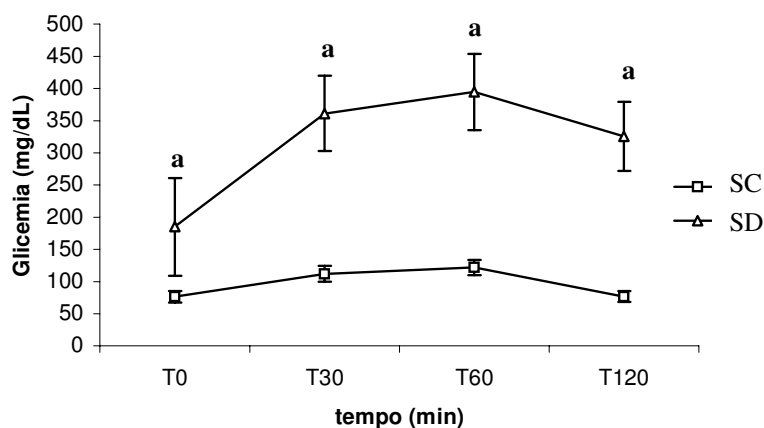


Figura 4: Glicemia dos animais durante teste de tolerância à glicose (oGTT) no início do experimento. As áreas sob as curvas de glicose (mg/dL $\times$ 120 min.) foram: SC = $12301,50 \pm 732,20$ e SD = $41139,90 \pm 5292,40^a$. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 16$ animais por grupo. $a \neq SC$. SC = sedentário controle; SD = sedentário diabético.

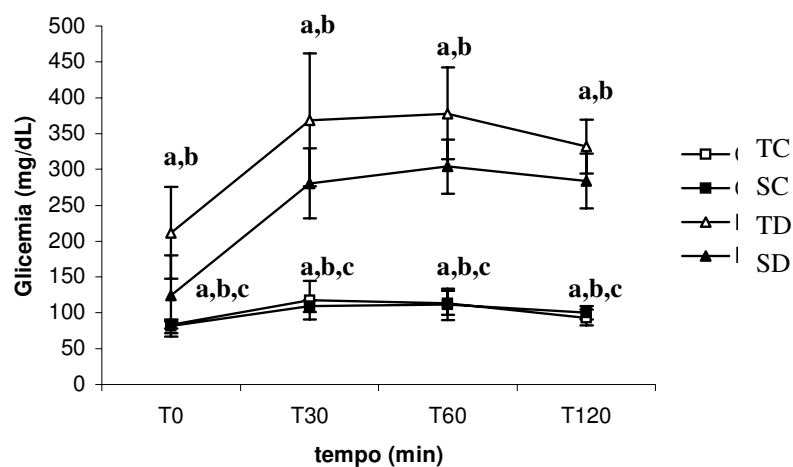


Figura 5: Glicemia dos animais durante teste de tolerância à glicose (oGTT) após 6 semanas. As áreas sob as curvas de glicose (mg/dL x 120 min.) foram: SC = $12685,5 \pm 1310,5$; TC = $12528,70 \pm 1280,20$; SD = $41196,20 \pm 6440,30^{a,b}$; TD = $32472,00 \pm 4238,80^{a,b,c}$. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 8$ animais por grupo. $a \neq SC$; $b \neq TC$; $c \neq SD$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

Tabela 1: Lactato sanguíneo (mmol/L) e carga (% em relação ao peso corporal) equivalentes à transição metabólica aeróbia/anaeróbia (LM), conforme determinados pelo teste de lactato mínimo no início do experimento.

	Lactato	Carga
SC	$6,89 \pm 0,63$	$4,84 \pm 0,21$
SD	$6,79 \pm 0,89$	$3,42 \pm 0,19^a$

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo SC $n = 13$ animais, grupo SD $n = 8$ animais. $a \neq SC$. SC = sedentário controle; SD = sedentário diabético.

Tabela 2: Lactato sanguíneo (mmol/L) e carga (% em relação ao peso corporal) equivalentes à transição metabólica aeróbia/anaeróbia (LM), conforme determinados pelo teste de lactato mínimo após 6 semanas.

	Lactato	Carga
SC	$7,88 \pm 0,72$	$5,11 \pm 0,19$
TC	$6,83 \pm 0,49^a$	$5,79 \pm 0,31^{a,c}$
SD	$7,92 \pm 0,52^b$	$3,72 \pm 0,23^{a,b}$
TD	$6,90 \pm 0,18^{a,c}$	$4,18 \pm 0,30^{a,b,c}$

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 8$ animais por grupo. $a \neq SC$; $b \neq TC$; $c \neq SD$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

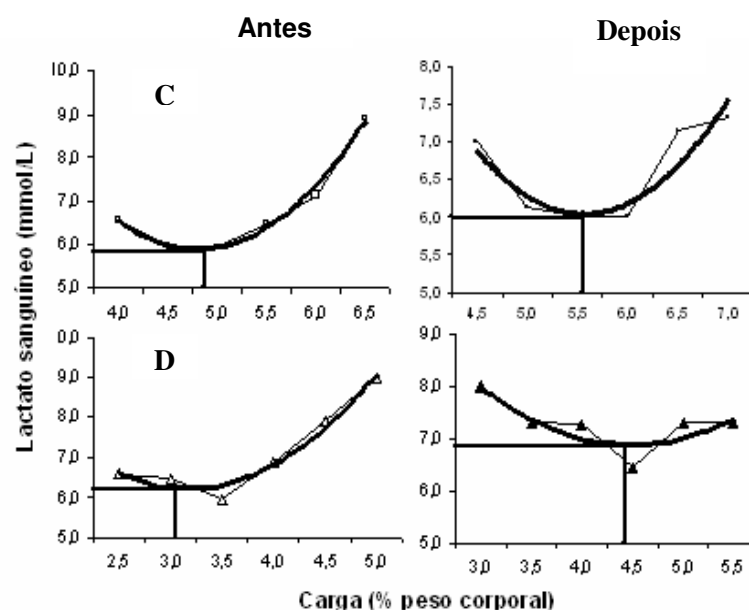


Figura 6: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste do lactato mínimo de um rato controle (C) e um rato diabético (D) antes e depois de 6 semanas de treinamento de natação na intensidade equivalente à transição metabólica anaeróbia/anaeróbia. As curvas foram obtidas por ajuste polinomial de grau 2. com auxílio de programa de computador (ORIGIN 6.0). A linha vertical indica a carga de trabalho correspondente ao lactato mínimo (LM), enquanto a linha horizontal indica a concentração de lactato sanguíneo interpolada. LM, teoricamente, indica a transição metabólica aeróbia/anaeróbia.

Tabela 3: Teores séricos de glicose (mg/dL), insulina (ng/mL), proteínas totais (g/dL) e ácidos graxos livres (A.G.L., em $\mu\text{Eq/L}$) dos animais obtidos após o sacrifício.

	Glicose	Insulina	Proteínas	A.G.L.
SC	121,61 $\pm$ 14,80	0,53 $\pm$ 0,09	5,79 $\pm$ 0,26	422,56 $\pm$ 78,47
TC	103,37 $\pm$ 13,49	0,68 $\pm$ 0,18 ^a	5,71 $\pm$ 0,23	381,05 $\pm$ 20,66
SD	691,54 $\pm$ 118,96 ^{a,b}	0,16 $\pm$ 0,03 ^{a,b}	6,32 $\pm$ 0,49	410,30 $\pm$ 43,68
TD	660,13 $\pm$ 115,62 ^{a,b}	0,13 $\pm$ 0,05 ^{a,b}	6,03 $\pm$ 0,54	507,00 $\pm$ 70,18 ^{a,b,c}

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 8$ animais por grupo. $a \neq \text{SC}$; $b \neq \text{TC}$; $c \neq \text{SD}$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

Tabela 4: Síntese e degradação protéicas (pmol/mg x h) no músculo sóleo isolado de ratos após o sacrifício.

	Síntese	Degradação
SC	16,43 $\pm$ 3,72	151,38 $\pm$ 19,31
TC	17,90 $\pm$ 3,81	171,54 $\pm$ 15,54
SD	19,23 $\pm$ 5,48	203,23 $\pm$ 22,20 ^{a,b,d}
TD	17,09 $\pm$ 3,51	160,08 $\pm$ 28,36

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 10$ animais por grupo. $a \neq \text{SC}$; $b \neq \text{TC}$; $d \neq \text{TD}$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Estudos com animais diabéticos experimentais têm demonstrado que a atividade física melhora o quadro da doença, prevenindo disfunções cardíacas (VILLANUEVA et al., 2003), bem como melhorando a tolerância e a homeostase glicêmica (LUCIANO; MELLO, 1998; TANCRÉDE et al., 1982). Contudo, o estudo dos efeitos metabólicos do exercício em ratos é freqüentemente questionado pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal durante o exercício. Dessa forma, o presente estudo foi delineado para determinar a intensidade de esforço equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia durante o exercício de animais diabéticos aloxânicos através do teste do lactato mínimo, bem como verificar se este teste é sensível às alterações fisiológicas provocadas pelo diabetes e pelo treinamento em exercício de natação na carga equivalente ao $\dot{V}_{O_2}$ individual.

Os resultados de peso corporal e ingestão alimentar e hídrica mostram que nossos animais diabéticos apresentavam os principais sintomas da doença, como redução do peso corporal, polifagia e polidipsia. Além disso, o teste de tolerância a glicose realizado no início do experimento confirmou a instalação do diabetes, uma vez que o grupo tratado com aloxana teve maior área sob a curva glicêmica e maior glicemia em todos os momentos do teste.

Uma vez constatado o diabetes, foi realizado o teste do lactato mínimo para a determinação da intensidade de esforço equivalente à transição metabólica conforme proposto por Voltarelli et al. (2002). De acordo com esses autores, há estabilização da concentração de lactato sanguíneo na carga equivalente ao menor valor de lactato, e sobrecargas maiores levam ao aumento dos níveis circulantes deste substrato. Desta forma, a carga em que é observada a menor concentração de lactato durante teste do

“lactato mínimo” (LM) coincide com a máxima fase estável de lactato (VOLTARELLI et al., 2002), o “gold standard” para a determinação do Lan.

Gobatto et al. (2001), que aplicaram o modelo de “Máxima Fase Estável do Lactato” em ratos, observaram estabilização do lactato nas cargas de 5 e 6% do p.c. Estes valores são próximos aos encontrados por Voltarelli et al. (2002, 2004) para ratos sedentários da mesma linhagem, usando teste do lactato mínimo (valores médios de 4,95 e 4,93, respectivamente), e próximos aos resultados obtidos pelo nosso estudo no grupo SC ($4,84 \pm 0,21\%$ p.c.).

A sobrecarga média equivalente ao LM no grupo diabético foi menor que a observada no grupo controle, embora os valores de lactato tenham sido semelhantes. Isso parece indicar que as alterações metabólicas e fisiológicas provocadas pelo diabetes tornaram esses animais menos tolerantes ao exercício.

Após 6 semanas de exercício, os ratos dos grupos treinados (TC e TD) apresentaram, em relação aos respectivos grupos sedentários (SC e SD), maior valor de carga e menor valor de lactato correspondentes ao lactato mínimo. Ou seja, o exercício de natação na intensidade do LM provocou melhoras no condicionamento aeróbio tanto dos animais controles como dos diabéticos. Voltarelli et al. (2004), verificaram que o treinamento de natação na intensidade do do lactato mínimo provocou melhora no condicionamento de animais saudáveis. Entretanto, não consta na literatura estudos sobre testes procurando avaliar a intensidade do exercício em animais diabéticos, bem como melhorias em seu condicionamento.

Ao final das 6 semanas de treinamento, os animais foram submetidos a outro teste de tolerância à glicose. Apesar da glicemia do grupo TC ter sido semelhante a do

grupo SC, os animais TD tiveram menores valores de glicose que o grupo SD em todos os tempos de coleta, resultando conseqüentemente em menor área sob a curva glicêmica.

Sabe-se que o treinamento aumenta a captação de glicose da circulação em função de múltiplas adaptações no músculo esquelético, incluindo aumento na expressão tanto do RNAm quanto da proteína glut4 (proteína responsável pela captação de glicose neste tecido), aumento da capacidade enzimática e da capilarização muscular (BORGHOUTS; KEIZER, 2000; LEE et al., 2002). Desta forma, a redução da glicemia no grupo TD deve estar relacionada a algum destes fatores.

O exercício realizado na intensidade do LM reduziu a taxa de degradação protéica do músculo sóleo dos animais diabéticos a valores semelhantes aos dos animais controles. De acordo com Charlton e Nair (1998), uma discreta alteração no equilíbrio entre síntese e degradação de proteína pode exercer profundo efeito à longo prazo sobre a viabilidade e metabolismo das células. Assim, podemos considerar que a intensidade de exercício utilizada por nós teve um importante efeito benéfico para os animais diabéticos ao restabelecer a taxa de degradação protéica muscular.

Em resumo, a partir dos resultados obtidos podemos concluir que o teste do lactato mínimo foi sensível as severas alterações metabólicas e fisiológicas provocadas pelo diabetes não controlado. Além disso, o teste utilizado também foi sensível às modificações do condicionamento aeróbio dos animais induzidas pelo treinamento, e mostrou que mesmo os animais diabéticos descompensados tiveram melhora em seu condicionamento em função do exercício de natação realizado em intensidade equivalente ao LM individual, ao tolerar carga mais alta que os animais sedentários. O treinamento na intensidade do LM para animais diabéticos, além de melhorar o

condicionamento aeróbio, ainda provocou importantes melhoras no metabolismo glicídico e protéico.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelas agências Capes, FAPESP (2005/02139-0) e CNPq (300270/2004-6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Diabetes Association. Diagnosis and classifications of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.28, p.S37-42, 2005.

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

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, n.6865, p.813-821, 2001.

CHARLTON, M.; NAIR, K. S. Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Nutrition**, v.128, suppl. 2, p.323S-27S, 1998.

DARDEVET, D. et al. Stimulation of *in vitro* rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **Journal of Nutrition**, v.130, n.11, p.2630-2635, 2000.

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

ENGEL, P. C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v.88, n.2, p.475-484, 1978.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Molecular Pathology Part A**, v.130, n.1, p.21-7, 2001.

HERBERT, V. et al. Coated charcoals immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.25, n.10, p.1375-1384, 1965.

JONES, A. M.; DOUST, J. H. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 Km running performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, n.8, p.1304 – 1313, 1998.

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

LEE, J. S. et al. Interaction of exercise and diet on glut-4 protein and gene expression in type I and type II rat skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.175, n.1, p.37-44, 2002.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, v.2, n.12, p.202-209, 1998.

MATTHEWS, J. N. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, v.300, n.6719, p.230-235, 1990.

NOGUEIRA, D. M. et al. Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M. et al. **Métodos de bioquímica clínica**. São Paulo: Pancast, 1990. p.153-168.

ROSSINI, A. A. Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. **Diabetes**, v.53, n.2, p.267-75, 2004.

SEIDER, M. J. et al. The effects of cutting or of stretching skeletal muscle in vitro on the rates of protein synthesis and degradation. **Biochemistry Journal**, v.188, n.1, p.247-254, 1980.

TANCRÉDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocina-induced diabetes mellitus. **Diabetes**, v.31, n.5, pt.1, p.406-9, 1982.

TEGTBUR, U.; BUSSE, M. W.; BRAUMANN, K. M. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.25, n.5, 620-627, 1993.

VILLANUEVA, D. S. et al. Prevention of ischemic heart failure by exercise in spontaneously diabetic BB Wistar rats subjected to insulin withdrawal. **Metabolism**, v.52, n.6, p.791-97, 2003.

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.11, p.1389-94, 2002.

VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R.; GOBATTO, C. A. Limiar anaeróbio determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: efeitos dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.4, n.3, p.16-25, 2004.

2º ESTUDO

**Metabolismo de glicose em ratos diabéticos exercitados na intensidade da transição
aeróbia/anaeróbia**

**Glucose metabolism in diabetic rats exercised at the aerobic/anaerobic transition
intensity**

Biological Research

Camila A. M. de Oliveira¹, Natália Seleglim Zanirato¹, Eliete Luciano¹, Maria Cristina
C. G. Marcondes², Maria Alice R. de Mello¹

¹ Departamento de Educação Física, Unesp, Rio Claro – SP, Brasil

² Departamento de Fisiologia e Biofísica, Unicamp, Campinas – SP, Brasil

RESUMO

Em estudo anterior, nós determinamos a intensidade de esforço correspondente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia (MT) para exercício de natação em ratos diabéticos (OLIVEIRA et al., 2007), e agora nosso objetivo foi avaliar os efeitos da natação nessa intensidade de esforço (MT), durante 6 semanas, sobre o metabolismo de glicose em animais diabéticos. Para este fim, ratos adultos da linhagem Wistar receberam aloxana (SD), via endovenosa (30 mg Kg⁻¹ b.w.) para a indução do diabetes. Como controles (SC) foram utilizados ratos injetados com veículo. Após 2 semanas, os animais foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose (oGTT). Em seguida, parte dos animais foi submetida ao treinamento de natação (TC e TD), 1 h/dia, 5 dias/semana por 6 semanas, com sobrecarga equivalente à intensidade MT determinada em estudo anterior (4,80% e 3,40% p.c. nos grupos TC e TD respectivamente). Ao final do experimento, os animais foram submetidos ao oGTT e à análises sangüíneas e musculares para investigar o metabolismo da glicose. A glicose sangüínea dos animais SD e TD foi maior que nos animais SC e TC durante os oGTTs e no sacrifício. Nenhum efeito do exercício foi visto. Contudo, a oxidação de glicose, bem como a síntese e o teor de glicogênio no músculo sóleo isolado foram maiores no grupo DT quando comparado aos demais grupos. Concluimos que o exercício de natação na intensidade da MT, embora não tenha melhorado os níveis glicêmicos nos animais diabéticos, teve efeitos benéficos no metabolismo de glicose no músculo esquelético desses animais.

INTRODUÇÃO

A atividade física está intrinsecamente relacionada à existência biológica de nossa espécie, uma vez que era necessária e obrigatória para a obtenção de alimento e água, para conseguir abrigo, para confecção de materiais para a guerra, entre outros. A falta de atividade física na sociedade moderna encontra-se relacionada ao aumento de grande número de doenças crônico-degenerativas (BOOTH et al., 2000, BOOTH et al., 2002; CHAKRAVARTHY; BOOTH, 2004).

Em extensa revisão, Booth et al. (2002) e Pedersen e Saltin (2006) apresentam evidências científicas para uma relação entre inatividade física e mais de vinte doenças crônicas, incluindo doenças respiratórias e cardiovasculares, câncer, disfunção imune, desordens músculo-esqueléticas e neurais e doenças metabólicas, tais como obesidade, dislipidemia e diabetes tipo 2.

O diabetes é causa principal de cegueira, doença renal terminal, aterosclerose e de uma variedade de neuropatias debilitantes, reduzindo a qualidade e a expectativa de vida do paciente (EIZIRIK, 1995, KELLY et al., 2003). Embora não haja nenhuma evidência de correlação entre nível da atividade física e incidência de diabetes mellitus tipo 1, pacientes diabéticos podem se beneficiar do exercício ao amenizar as sérias complicações decorrentes da doença (PEDERSEN; SALTIN, 2006).

Modelos animais permitem avaliações mais profundas das causas e das conseqüências do diabetes, e são de grande importância para compreensão mais abrangente desta doença (ROSSINI, 2004). Estudos com estes modelos demonstraram que a atividade física ameniza as complicações da doença, atenuando disfunções cardíacas (VILLANUEVA et al., 2003), assim como melhorando a tolerância à glicose e a homeostase glicêmica (LUCIANO; MELLO, 1998, TANCRÉDE et al., 1982).

A despeito disso, estudos dos efeitos metabólicos do exercício em ratos são freqüentemente questionados, devido à falta da informação sobre a intensidade do esforço executado pelo animal durante o exercício. Por esta razão, recentemente em nosso laboratório, estabelecemos um protocolo para determinar a intensidade de esforço equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia (TM) durante exercício de natação em ratos (VOLTARELLI et al., 2002). Em estudo anterior, determinamos a intensidade da TM para ratos diabéticos (OLIVEIRA et al., 2007) durante exercício de natação e, no presente estudo, objetivamos avaliar os efeitos da natação sobre o metabolismo glicídico de animais diabéticos exercitados na intensidade da TM.

MÉTODOS

Animais

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar adultos, mantidos em biotério à $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro, com livre acesso à comida e água. Todos os animais tiveram peso corporal e ingestão alimentar e hídrica registrados uma vez por semana. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com a European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Concil of Europe nº 123, Strasbourg 1985).

Indução do Diabetes

Depois de permanecerem 15 horas em jejum, os animais receberam aloxana monoidratada (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) na concentração de 30 mg/Kg de peso corporal, dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 injetada na veia peniana dorsal (LUCIANO; MELLO, 1998). Como controles foram utilizados ratos injetados

com veículo (tampão citrato). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL (de acordo com American Diabetes Association, 2005) 2 semanas após a administração de aloxana. Os níveis glicêmicos foram determinados pelo método da glicose-oxidase (Kit Laborlab).

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Sedentário Controle (SC) = ratos que receberam injeção de veículo e permaneceram sedentários; Treinado Controle (TC) = ratos que receberam injeção de veículo e executaram um programa de um exercício de 6 semanas; Sedentário Diabético (SD) = ratos que receberam injeção de aloxana e permaneceram sedentários; Treinado Diabético (TD) = ratos que receberam injeção de aloxana e executaram um programa de um exercício de 6 semanas.

Teste de Tolerância à Glicose Oral (oGTT)

O teste de tolerância à glicose foi realizado 2 semanas após a administração da aloxana e ao final do período experimental, após 6 semanas de treinamento. A primeira coleta de sangue foi feita da cauda do animal, após jejum de 15 horas. Em seguida, uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago por via oral e uma solução de glicose 80% (2,0 g/Kg de peso corporal) administrada. Então, amostras de sangue foram coletadas 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. Todas as amostras sangüíneas foram coletadas da extremidade distal da cauda do animal com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL. A determinação da glicemia foi realizada pelo método da glicose-oxidase (Kit Laborlab). A área sob a curva de glicose

sangüínea ($\text{mg/dL} \times 120\text{min}^{-1}$) durante o GTTo foi calculada pelo método trapezoidal (MATTHEWS et al., 1990) utilizando o *Software* ORIGIN® 6.0 (1999).

Treinamento Físico

O protocolo consistiu de exercício de natação com sobrecarga, 1 h/dia, 5 dias/semana, durante 6 semanas, em tanques (100 x 80 x 100 cm) com água a 32 ± 1 °C. A sobrecarga (chumbo para pesca, atada ao tórax do animal por elástico) foi de 4,80% e 3,40% do peso corporal nos grupos TC e TD, respectivamente. Estes valores de sobrecarga foram estimados em estudo anterior, e equivalem à transição metabólica aeróbia/anaeróbia (TM) de animais controles e diabéticos, respectivamente, obtidos pelo teste do lactato mínimo (OLIVEIRA et al., 2007). O protocolo de exercício de natação foi escolhido visto que é bastante usado em nosso laboratório e mostrou resultados satisfatórios na melhoria da capacidade aeróbia dos ratos (GOBATTO et al., 2001).

Sacrifício

Ao final do período de 6 semanas de treinamento, 48 horas após o último teste e sem jejum prévio, todos os animais foram mortos por decapitação, para a obtenção de material biológico.

Análises

Sangue

No momento do sacrifício, amostras sangüíneas foram coletadas para a determinação dos teores de glicose, ácidos graxos livres, proteínas totais, albumina (NOGUEIRA et al., 1990) e insulina (HERBERT et al., 1965).

Músculo Sóleo

Para a avaliação do metabolismo muscular da glicose, fatias longitudinais do músculo sóleo pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [U - ^{14}C] glicose (25 $\mu\text{Ci/mL}$), [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) e insulina (100 mU/mL) dentro de frascos de vidro por cerca de 1 hora e meia e contínuo gaseamento com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante em banho-maria (37°C). O CO_2 liberado foi captado por hiamina 10x, colocada em aparato de vidro inserido no frasco anteriormente citado. Foram avaliadas, a captação de glicose utilizando-se a 2-deoxiglicose (2-DG) como marcador, e a incorporação do ^{14}C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ^3H da 2-DG e do ^{14}C da glicose, respectivamente. A medida da quantidade de glicose oxidada foi feita através da radioatividade do ^{14}C presente na hiamina. Fatias musculares não incubadas foram utilizadas para avaliação dos teores de glicogênio (DUBOIS et al., 1956). O lactato radioativo liberado no meio de incubação foi determinado por separação de metabólitos em coluna de troca iônica (Dowex-2, Sigma).

Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística utilizada foi a ANOVA Two-Way seguida do teste de Newman-Keuls. O nível de significância foi pré-fixado em 5%.

RESULTADOS

Conforme esperado, a área sob a curva de glicose sangüínea dos animais diabéticos (SD) foi maior ($p<0,05$) que nos animais controles (SC) durante o oGTT realizado no início do experimento (Figura 1A).

Após 6 semanas, outro oGTT foi realizado. A área sob a curva de glicose dos animais diabéticos (SD e TD) foi maior ($p<0,05$) que nos animais dos grupos controles (SC e TC). Nenhum efeito do exercício foi visto (Figura 1 B).

Os animais tratados com aloxana (SD e TD) tiveram peso corporal reduzido ($p<0,05$) quando comparados aos demais grupos durante todo o estudo (Figura 2A). Em contraste, os grupos SD e TD tiveram ingestão alimentar e hídrica comparativamente mais elevadas ($p<0,05$) do que os grupos SC e TC (Figura 2B e 2C, respectivamente).

As concentrações séricas de glicose, insulina, proteínas totais, albumina e ácidos livres (AGL) após o sacrifício são mostradas na Tabela 1. Os animais diabéticos (SD e TD) tiveram glicemia mais elevada ($p<0,05$) e insulinemia mais baixa ($p<0,05$) do que os controles (SC e TC). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos nas concentrações de proteínas totais, albumina e AGL.

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes ao metabolismo da glicose no músculo sóleo incubado no fim do experimento. A oxidação de glicose foi mais elevada ($p<0,05$) no grupo TD do que nos demais grupos. Houve diferença significativa em função do treinamento na síntese de glicogênio, resultando em concentrações mais elevadas ($p<0,05$) do substrato no músculo sóleo do grupo TD. Embora ANOVA tenha acusado diferença causada pelo treinamento na produção de lactato, nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada após a aplicação do teste de contraste.

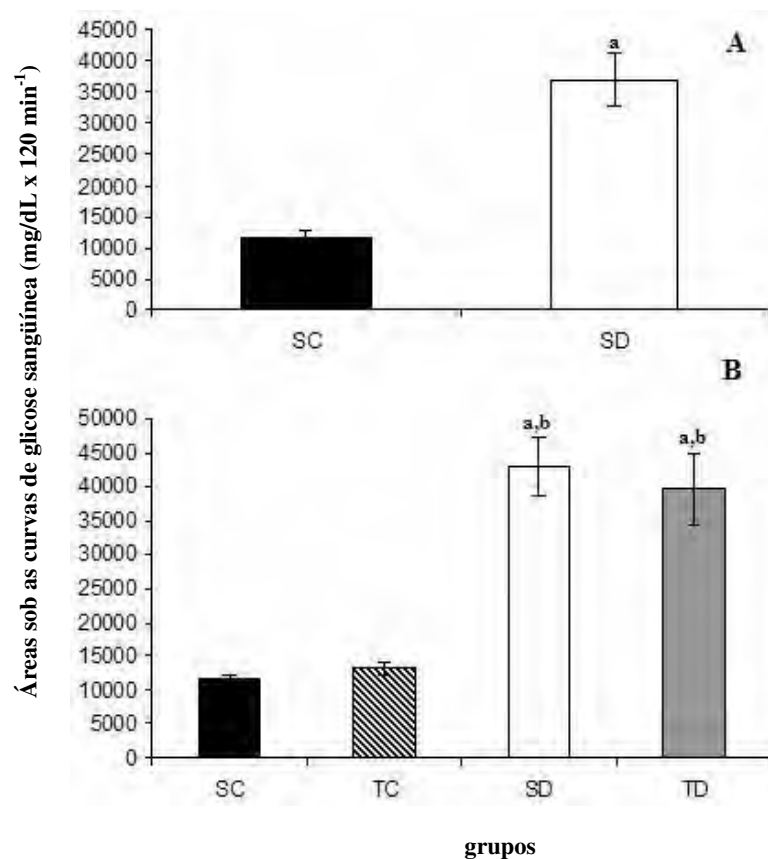


Figura 1: Áreas sob as curvas de glicose sanguínea durante teste de tolerância à glicose (oGTT) no início (A) e no fim (B) do experimento. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. $n = 16$ animais em cada grupo no início do experimento e $n = 8$ animais em cada grupo no fim do experimento. a $\neq$ SC; b $\neq$ TC. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

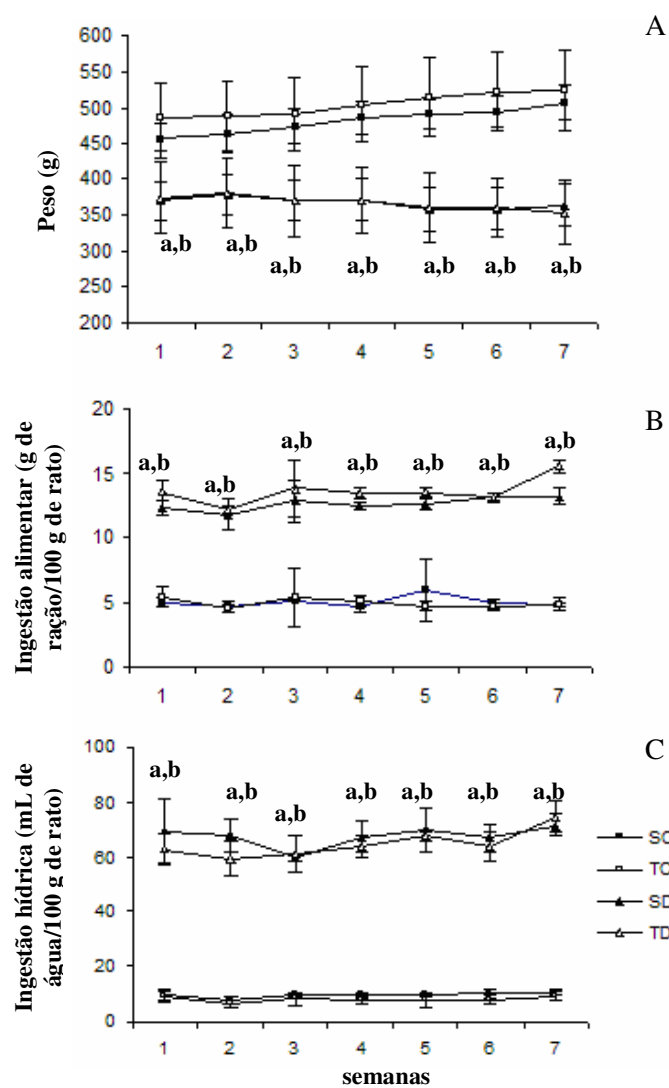


Figura 2: Peso corporal (A), ingestão alimentar (B) e ingestão hídrica (C) dos animais durante o período experimental. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. $n = 6$ animais por grupo. $a \neq SC$; $b \neq TC$; $c \neq SD$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

Tabela 1: Concentrações séricas de glicose (mg/dL), insulina (ng/mL), proteínas totais(g/dL), albumina (g/dL) e ácidos graxos livres(A.G.L., in $\mu\text{Eq/L}$) dos animais após o sacrifício.

	SC	TC	SD	TD
Glicose	107,86 $\pm$ 17,33	110,00 $\pm$ 21,11	482,14 $\pm$ 57,50 ^{a,b}	492,00 $\pm$ 74,93 ^{a,b}
Insulina	1,92 $\pm$ 1,06	2,30 $\pm$ 1,97	0,45 $\pm$ 0,20 ^{a,b}	0,54 $\pm$ 0,31 ^{a,b}
Proteína	6,24 $\pm$ 0,49	6,76 $\pm$ 0,54	6,96 $\pm$ 0,60	6,91 $\pm$ 0,76
Albumina	4,90 $\pm$ 0,70	4,87 $\pm$ 0,60	4,22 $\pm$ 0,62	4,15 $\pm$ 0,53
A.G.L.	145,27 $\pm$ 61,19	138,51 $\pm$ 44,38	155,41 $\pm$ 78,80	115,83 $\pm$ 51,08

Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. $n = 6$ animais por grupo. a $\neq$ SC; b $\neq$ TC. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

Tabela 2: Captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio, produção de lactato ($\mu\text{mol/g} \times \text{h}$) e concentração de glicogênio (mg/100 mg) no músculo sóleo isolado dos animais após o sacrifício.

	SC	TC	SD	TD
Captação de glicose	2,96 $\pm$ 0,66	3,64 $\pm$ 0,67	2,74 $\pm$ 0,32	3,38 $\pm$ 0,76
Oxidação de glicose	5,33 $\pm$ 1,70	5,27 $\pm$ 0,69	5,58 $\pm$ 1,36	7,46 $\pm$ 0,71 ^{a,b,c}
Síntese de glicogênio	0,21 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,06 ^{a,b,c}
Teor de glicogênio	0,07 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,04 ^{a,b,c}
Produção de lactato	7,09 $\pm$ 0,96	5,22 $\pm$ 1,88	6,73 $\pm$ 1,27	5,62 $\pm$ 1,07

Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. $n = 6$ animais por grupo. a $\neq$ SC; b $\neq$ TC; c $\neq$ SD. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os efeitos do treinamento físico em indivíduos diabéticos têm sido o foco de diversos estudos. O diabetes mellitus é caracterizado por um grupo de desordens metabólicas e hormonais que interferem no metabolismo da glicose, dos lipídios e das proteínas, alterando a homeostase glicêmica. O exercício físico facilita a utilização periférica da glicose, amenizando alguns efeitos deletérios do diabetes. Neste estudo, foram investigados os efeitos do treinamento físico realizado em intensidade equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia (MT) sobre a glicemia e o metabolismo muscular da glicose de ratos diabéticos.

Os animais diabéticos do presente estudo apresentaram menor ganho de peso, polifagia e polidipsia, todos sintomas clínicos do diabetes mellitus, particularmente diabetes tipo 1.

O diabetes aloxânico causou, nos grupos SD e TD, alterações no desenvolvimento físico, indicado pelo emagrecimento, esperado nessas condições apesar da ingestão alimentar aumentada. O emagrecimento é creditado primariamente à depleção das reservas de água e triglicerídeos e, de forma crônica, à redução da massa muscular causada pela excessiva proteólise (SALLÉ et al., 2004). O peso corporal não foi afetado pelo treinamento nesse estudo, demonstrando que treinamento físico não implicou em comprometimento adicional deste parâmetro.

Os animais diabéticos (DS e DT) apresentaram aumento na ingestão alimentar, sintoma clássico no quadro diabético. A polifagia em diabéticos está geralmente relacionada à baixa produção de leptina (SINDELAR, 1999), e elevada produção de grelina, ambos agindo nos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético (DONG et al., 2006). A elevação na grelina plasmática é associada a

hipoleptinemia diabética (TSUBONE et al., 2005), mas não às concentrações de insulina cerebrais que, apesar de estarem relacionadas ao controle de apetite, permanecem inalteradas no estado de hipoinsulinemia diabética (LEME et al., 2006a).

O aumento na ingestão hídrica observado entre os animais diabéticos no presente estudo é explicado pela poliúria, que resulta em perda urinária não apenas de glicose (glicosúria), mas também de água livre e eletrólitos (LARSEN et al., 2002).

Neste estudo foram realizadas avaliações de glicemia e insulinemia no estado alimentado. Foram constatadas hiperglicemia e hipoinsulinemia nos animais diabéticos. A droga diabetogênica aloxana, pela produção de espécies reativas de oxigênio, somada a um simultâneo aumento massivo no cálcio citosólico, causa rápida destruição das células beta das ilhotas de Langerhans localizadas no pâncreas (SZKUDELSKI et al., 2001). As células beta são produtoras de insulina e a sua destruição é responsável pela hipoinsulinemia encontrada nos animais feitos diabéticos pela aplicação dessa droga.

O hipoinsulinismo gera uma série de distúrbios metabólicos. A hiperglicemia encontrada nos animais diabéticos no presente estudo é causada pela severa redução deste hormônio. A insulina promove a manutenção da homeostase glicêmica de várias formas, principalmente pela redução da saída de glicose hepática (via diminuição de glicogenólise e gliconeogênese) e aumento da captação de glicose em determinados tecidos. Na condição de repouso, as células musculares e adiposas dependem da translocação, estimulada pela insulina, dos glut-4 para a superfície celular para captação da glicose sérica (PESSIN; SALTIEL, 2000).

O exercício físico tem efeito sinérgico à ação da insulina no controle da homeostase glicêmica, aumentando a translocação dos glut-4 para a membrana das células musculares (ZINMAN et al., 2003). Em nosso estudo, entretanto, o treinamento

físico na intensidade da transição metabólica não se mostrou eficaz em reduzir a glicemia dos animais diabéticos no estado alimentado e durante o oGTT. O exercício crônico aumenta a sensibilidade celular à insulina, potencializando seu efeito junto à fosforilação do substrato do receptor de insulina-2 (IRS-2), aumentando, por consequência, a atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (HOWLETT et al., 2002). O treinamento ainda melhora a responsividade à insulina através do aumento da fosforilação do IRS-1 e aumento da atividade da PI3K (LUCIANO et al., 2002). Nossos dados contrastam com outros estudos que apontam diminuição dos valores glicêmicos em animais diabéticos treinados (GOMES et al., 2005; LEME et al., 2006b), incluindo nosso estudo prévio com ratos treinados na intensidade da transição metabólica (OLIVEIRA et al., 2007), no qual nos baseamos para selecionar a carga usada para o treinamento dos animais. Possíveis explicações para o contraste observado incluem a necessidade da determinação da intensidade do esforço individualmente já que a severidade dos efeitos da aloxana varia entre os animais, ou ainda a intensidade do esforço equivalente à transição metabólica pode não ser a mais apropriada para a obtenção dos efeitos benéficos esperados.

Na tentativa de ampliar as informações sobre os efeitos do treinamento na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia sobre o metabolismo glicídico de ratos diabéticos, avaliamos também captação e oxidação de glicose bem como síntese de glicogênio e produção de lactato pelo músculo sóleo isolados desses animais.

O exercício físico é um estímulo para a regulação dos processos metabólicos na musculatura esquelética, favorecendo a captação de glicose e a síntese de glicogênio e de proteína (SAKAMOTO; GOODYEAR, 2002).

A oxidação de glicose, bem como a síntese e o conteúdo de glicogênio na musculatura esquelética foram aumentadas nos animais diabéticos que foram submetidos ao exercício físico por natação na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia. Estes dados estão de acordo com a literatura, que indica melhoria do condicionamento aeróbio com o exercício moderado (MATZINGER et al., 2002). Embora não tenha sido estatisticamente significante, uma tendência na redução da produção de lactato em ambos os grupos exercitados (TC e TD) foi observada, o que também indica melhor nível de condicionamento aeróbio.

Concluindo, o exercício de natação na intensidade da MT, embora não tenha melhorado o nível glicêmico dos animais diabéticos, teve efeito benéfico sobre o metabolismo de glicose no músculo esquelético.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pelas agências brasileiras de fomento CAPES, FAPESP (2005/02139-0) e CNPq (300270/2004-6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Diabetes Association. Diagnosis and classifications of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.28, p.S37-42, 2005.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **Journal of Applied Physiology**, v.88, n.2, p.774-787, 2000.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against the ancient enemy. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.1, p.3-30, 2002.

CHAKRAVARTHY, M. V.; BOOTH, F. W. Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. **Journal of Applied Physiology**, v.96, n.1, p.3-10, 2004.

DONG, J. et al. Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. **Endocrinology**, v.147, n.6, p.2634-2642, 2006.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

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

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Molecular Pathology Part A**, v.130, n.1, p.21-7, 2001.

GOMES, R. J. et al. Effects of chronic exercise on growth factors in diabetic rats. **Journal of Exercise Physiology**, v.8, n.2, p.16-23, 2005.

HERBERT, V. et al. Coated charcoals immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.25, n.10, p.1375-1384, 1965.

HOWLETT, K. F. et al. Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice. **Diabetes**, v.51, n.2, p.479-483, 2002.

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

LARSEN, P. R. et al. (2002) Williams Textbook of Endocrinology. 10th ed. Saunders. 1820p.

LEME, J. A. C. A. et al. Concentrações cerebrais de insulina em animais diabéticos experimentais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.50, p.172, 2006a.

LEME, J. A. C. A.; SILVEIRA, R. F.; LUCIANO, E. Efeitos da atividade física em parâmetros metabólicos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento** v.14, p.S99, 2006b.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, v.2, n.12, p.202-209, 1998.

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**, v.147, n.1, p.149-157, 2002.

MATTHEWS, J. N. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, v.300, n.6719, p.230-235, 1990.

MATZINGER, O.; SCHNEITER, P.; TAPPY, L. Effects of fatty acids on exercise plus insulin-induced glucose utilization in trained and sedentary subjects. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.282, n.1, p.E125-31, 2002.

NOGUEIRA, D. M. et al. Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M. et al. **Métodos de bioquímica clínica**. São Paulo: Pancast, 1990. p.153-168.

OLIVEIRA, C. A. M. et al. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. **Journal of Diabetes Complications**, v.21, n.4, 258-264, 2007.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scandinavian Journal of Medicine in Science and Sports**, v.16 (suppl 1), p.3-63, 2006.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, n.2, p.165-169, 2000.

ROSSINI, A. A. Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. **Diabetes**, v.53, n.2, p.267-75, 2004.

SAKAMOTO, K.; GOODYEAR, L. J. Exercise Effects on Muscle Insulin Signaling and Action Invited Review: Intracellular signaling in contracting skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.1, p.369–383, 2002.

SALLÉ, A. et al. Effect of insulin treatment on the body composition in type 2 diabetic patients. **Diabetes Medicine**, v.21, n.12, p.1298-1303, 2004.

SINDELAR, D. K. et al. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. **Diabetes**, v.48, n.6, p.1275-80, 1999.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v.50, n.6, p.536-546, 2001.

TANCRÉDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocina-induced diabetes mellitus. **Diabetes**, v.31, pt.1, p.406-9, 1982.

TSUBONE, T. et al. Leptin downregulates ghrelin levels in streptozotocin-induced diabetic mice. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v.289, n.6, p.1703-1706, 2005.

VILLANUEVA, D. S. et al. Prevention of ischemic heart failure by exercise in spontaneously diabetic BB Wor rats subjected to insulin withdrawal. **Metabolism**, v.52, n.6, p.791-97, 2003.

VOLTARELLI, F. A; GOBATTO, C. A; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.11, p.1389-94, 2002.

ZINMAN, B. et al. Physical activity/exercise and diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.26, supl.1, p.73-77, 2003.

3º ESTUDO

**Metabolismo muscular e função endotelial em ratos diabéticos exercitados na
intensidade da máxima fase estável de lactato**

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar a intensidade de exercício equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia de ratos diabéticos aloxânicos, através do Teste da Máxima Fase Estável de Lactato (TMFEL), e avaliar os efeitos do treinamento de natação nesta intensidade (MFEL) bem como os efeitos do diabetes sobre o condicionamento aeróbio e metabolismo glicídico, protéico e função endotelial desses animais. Ratos Wistar adultos receberam aloxana (SD) via endovenosa (30 mg/Kg p.c.). Como controles (SC) foram utilizados ratos injetados com tampão citrato. Duas semanas após a administração da droga foram realizados testes de tolerância a glicose (oGTT) e TMFEL. Após os testes, parte dos animais realizaram exercícios de natação (TC e TD), 1 h/dia, 5 dias/semana, com sobrecarga equivalente à MFEL, durante 8 semanas. Ao término desse período, os animais foram submetidos a novo oGTT, e foram sacrificados, por decapitação, 48 horas após a realização dos últimos testes para análises sanguíneas e do metabolismo protéico (síntese e degradação de proteínas) e glicídico (captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio e produção de lactato) durante incubação do músculo sóleo isolado e avaliação da função endotelial de artéria aorta isolada. A carga equivalente à MFEL no início do experimento foi menor nos animais SD em relação à SC, e os valores médios de lactato nessa intensidade foram maiores nos animais diabéticos. A glicemia dos animais TD durante oGTT foi menor que a dos animais DS. Além disso, a degradação protéica foi maior no grupo SD que nos demais. Concluímos que o treinamento de 8 semanas na intensidade da MFEL proporcionou algumas melhoras no metabolismo glicídico (oxidação de glicose, síntese de glicogênio e menor glicemia em um ponto do oGTT) e restaurou a função endotelial dos animais diabéticos, sem contudo alterar o metabolismo protéico.

A determinação da intensidade do esforço também nos revelou que os animais apresentam prejuízo da capacidade aeróbia.

INTRODUÇÃO

A elevada concentração de glicose sangüínea no diabetes mellitus, causada pela ausência de insulina ou resistência à sua ação, é tóxica e causa danos micro e macrovasculares sérios. O diabetes é uma das principais causas de cegueira, doença renal, doença macrovascular aterosclerótica e uma variedade de neuropatias debilitantes, diminuindo a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes (EIZIRIK, 1995; KELLY et al., 2003). Como resultado, pacientes com diabetes correm um risco muito maior de sofrer infarto do miocárdio, derrame e amputação de membros (BROWNLEE, 2001), e conforme Portuese et al. (1995), a doença cardiovascular é a principal causa de morte no IDDM.

As diversas desordens metabólicas e hormonais presentes no diabetes também interferem no metabolismo da glicose, dos lipídios e das proteínas, alterando a homeostase orgânica.

O exercício físico facilita a utilização periférica da glicose, amenizando alguns efeitos deletérios do diabetes. Estudos com modelos animais têm demonstrado que a atividade física melhora o quadro da doença, prevenindo disfunções cardíacas (VILLANUEVA et al., 2003), bem como melhorando a tolerância e a homeostase glicêmica (LUCIANO; MELLO, 1998; TANCRÉDE et al., 1982). Contudo, o estudo dos efeitos metabólicos do exercício em ratos é freqüentemente questionado pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal durante o exercício.

Por essa razão, em nossos laboratórios, Gobatto et al. (2001) desenvolveram um teste para avaliação da máxima fase estável de lactato em ratos durante exercício de natação. A máxima fase estável de lactato representa a maior concentração de lactato sanguíneo e maior sobrecarga/intensidade suportada na qual a remoção de lactato da circulação compensa sua produção, e é considerada como indicadora da capacidade aeróbia (JONES; CARTER, 2000). Desta forma, uma avaliação mais precisa dos efeitos do exercício em animais diabéticos poderá ser feita, uma vez que a intensidade do mesmo será conhecida.

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi identificar a intensidade do esforço equivalente à máxima fase estável de lactato (MFEL) de animais diabéticos aloxânicos através do Teste da Máxima Fase Estável de Lactato (TMFEL), verificar se este teste é sensível às alterações fisiológicas e metabólicas provocadas pelo diabetes e avaliar os efeitos do treinamento de natação sobre o metabolismo glicídico e protéico musculares e função endotelial da artéria aorta nessa intensidade conhecida de esforço (MFEL).

MÉTODOS

Animais

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar adultos, mantidos em biotério à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e foto período de 12 horas de claro e 12 de escuro, com livre acesso à comida e água. Todos os animais tiveram peso corporal e ingestão alimentar e hídrica registrados uma vez por semana. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com a European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Concil of Europe nº 123, Strasbourg 1985).

Indução do Diabetes

Depois de permanecerem 15 horas em jejum, os animais receberam aloxana monoidratada (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) na concentração de 30 mg/Kg de peso corporal, dissolvida em tampão citrato 0,01 M, pH 4,5 injetada na veia peniana dorsal (LUCIANO; MELLO, 1998). Como controles foram utilizados ratos injetados com veículo (tampão citrato). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL (de acordo com American Diabetes Association, 2005) 2 semanas após a administração de aloxana. Os níveis glicêmicos foram determinados pelo método da glicose-oxidase (Kit Laborlab).

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Sedentário Controle (SC) = ratos que receberam injeção de veículo e permaneceram sedentários; Treinado Controle (TC) = ratos que receberam injeção de veículo e executaram um programa de um exercício de 8 semanas; Sedentário Diabético (SD) = ratos que receberam injeção de aloxana e permaneceram sedentários; Treinado Diabético (TD) = ratos que receberam injeção de aloxana e executaram um programa de um exercício de 8 semanas.

Teste da Máxima Fase Estável de Lactato (TMFEL)

O Teste da Máxima Fase Estável de Lactato para natação foi adaptado às condições do rato por Gobatto et al. (2001). Esse teste consistiu na realização de sessões de natação com duração de 20 min., em tanques com as dimensões 100 x 80 x 80 cm e água mantida à 32 ± 1 °C, suportando uma sobrecarga atada ao peito de 4% p.c. para os

animais diabéticos e 5% p.c. para o grupo controle, na primeira sessão. Amostras de sangue (25 µL) foram coletadas em repouso (T0) e a cada 5 minutos (T5, T10, T15 e T20), da extremidade distal da cauda do animal para dosagem de lactato pelo método enzimático (ENGEL; JONES, 1978). Então, dependendo do resultado do teste anterior, a sobrecarga foi reduzida, se o lactato sangüíneo aumentou continuamente sem estabilizar, ou aumentada, se houve estabilização, em 0,5% p.c. Entre cada sessão de teste houve um intervalo de 48 h e foram necessários de 3 a 4 testes para encontrar a MFEL. A estabilização do lactato sangüíneo foi definida como uma variação da concentração de lactato, entre o 10º e o 20º minuto, menor que 1 mmol/L; e a MFEL, como a sobrecarga mais alta em que a concentração de lactato se estabilizou.

Teste de Tolerância à Glicose Oral (oGTT)

O teste de tolerância à glicose foi realizado 2 semanas após a administração da aloxana e ao final do período experimental, após 8 semanas de treinamento. A primeira coleta de sangue foi feita da cauda do animal, após jejum de 15 horas. Em seguida, uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago por via oral e uma solução de glicose 80% (2,0 g/Kg de peso corporal) administrada. Então, amostras de sangue foram coletadas 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. Todas as amostras sangüíneas foram coletadas da extremidade distal da cauda do animal com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL. A determinação da glicemia foi realizada pelo método da glicose-oxidase (Kit Laborlab). A área sob a curva de glicose sangüínea ($\Delta G = \text{mg/dL} \times 120\text{min}^{-1}$) durante o GTTo foi calculada pelo método trapezoidal (MATTHEWS et al., 1990) utilizando o *Software* ORIGIN® 6.0 (1999).

Treinamento Físico

Os animais realizaram exercício de natação, 1 h/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas, com sobrecarga atada ao peito (em % do peso corporal) correspondendo à MFEL individual dos animais, obtido no teste da Máxima Fase Estável de Lactato, em tanques (100 x 80 x 100 cm) com água à temperatura de 32 ± 1 °C. O protocolo de exercício de natação foi escolhido visto que é bastante usado em nosso laboratório e mostrou resultados satisfatórios na melhoria da capacidade aeróbia dos ratos (GOBATTO et al., 2001).

Sacrifício

Ao final do período de 8 semanas de treinamento, 48 horas após o último teste e sem jejum prévio, todos os animais foram mortos por decapitação, para a obtenção de material biológico.

Análises

Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para verificação dos teores de glicose, ácidos graxos livres, proteínas totais (NOGUEIRA et al., 1990) e insulina (HERBERT et al., 1965).

Pâncreas

Para a extração da insulina pancreática, 0,2 g de pâncreas foram coletados em frascos contendo 2 mL de HCl 1N. O material foi incubado em estufa a 40 °C durante 24 horas. O material assim extraído do pâncreas foi diluído 1:5000 em soro-albumina

bovina a 0,25% em tampão borato pH 5,5, conforme preconiza Carpinelli (1978). O teor das amostras foi dosado pelo método do radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

Avaliação da Reatividade Vascular da Artéria Aorta

As artérias aorta foram cuidadosamente removidas e colocadas em solução Krebs contendo (mM): NaCl, 118; NaHCO₃, 25; glicose, 5,6; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄ 7H₂O, 1,17 e CaCl₂ 2H₂O, 2,5. Tecidos aderentes foram removidos das artérias, que foram então cortadas em anéis de aproximadamente 2 mm. Cada anel foi suspenso entre ganchos de metal e montado em cuba para órgão isolado de 10 mL, com solução Krebs à 37°C, pH 7,4, e continuamente gaseado com uma mistura de 95% O₂ e 5% CO₂ sob uma tensão de repouso de 10 mN. A tensão isométrica dos tecidos foi recordada por um transdutor (UgoBasile, Varese, Itália) conectado a um sistema de aquisição de dados da PowerLab 400TM (software versão 4.2, AD Instruments, MA, USA).

Após um período de estabilização de 1 h, os anéis aórticos foram pré-contraídos com fenilefrina (1 µM). Curvas concentração-resposta cumulativas para os agonistas vasodilatadores acetilcolina (ACh, 10 mM - 100 µM) e nitroprussiato de sódio (SNP, 100 pM - 100 nM) foram obtidas do endotélio intacto dos anéis aórticos. As respostas relaxantes foram analisadas como porcentagem da contração induzida por fenilefrina. Os dados obtidos foram avaliados de acordo com a equação descrita abaixo:

$$E = E_{\max} / ((1 + (10^c / 10^x)^n) + \Phi)$$

onde E representa a resposta; E_{max} representa a resposta máxima que o agonista pode produzir; c representa o logaritmo da EC₅₀ (concentração do agonista que produz metade da resposta máxima); x representa o logaritmo da concentração do agonista; o termo exponencial n representa o coeficiente angular ou inclinação, o qual define o tipo de

curva concentração-efeito obtida, e o símbolo Φ representa a resposta observada na ausência do agonista adicionado. Análises de regressão não linear para determinar os parâmetros $E_{\max}$, $\log EC_{50}$ e n foram feitas pelo software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego-CA,USA) assumindo-se que $\Phi = \text{zero}$.

Músculo Sóleo

Metabolismo de Glicose

Para a avaliação do metabolismo muscular da glicose, fatias longitudinais do músculo sóleo pesando em torno de 25 - 35 mg foram incubadas em meio de Krebs-Ringer bicarbonato enriquecido com glicose (5,5 mM), contendo [U - ^{14}C] glicose (25 $\mu\text{Ci/mL}$), [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$) e insulina (100 mU/mL) dentro de frascos de vidro por cerca de 1 hora e meia e contínuo gaseamento com carbogênio O_2/CO_2 (95%/5%), sob agitação constante em banho-maria (37°C). O CO_2 liberado foi captado por hiamina 10x, colocada em aparato de vidro inserido no frasco anteriormente citado. Foram avaliadas a captação de glicose utilizando-se a 2-deoxiglicose (2-DG) como marcador, e a incorporação do ^{14}C a glicogênio (síntese), medindo-se a radioatividade do ^3H da 2-DG e do ^{14}C da glicose, respectivamente. A medida da quantidade de glicose oxidada foi feita através da radioatividade do ^{14}C presente na hiamina. Fatias musculares não incubadas foram utilizadas para avaliação dos teores de glicogênio (DUBOIS et al., 1956). O lactato radioativo liberado no meio de incubação foi determinado por separação de metabólitos em coluna de troca iônica (Dowex-2, Sigma).

Síntese de Proteína

Fatias longitudinais (70 mg) 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 [100 μ U/mL], saturado com mistura gasosa (95% de O₂ e 5% de CO₂). Em seguida, as fatias foram transferidas para o novo meio RPMI com a mesma suplementação, contendo ¹⁴C fenilalanina [0,05 μ Ci/mL] e incubadas por 2 horas. Ao final da incubação, as fatias musculares foram homogeneizadas em ácido tricloro acético (TCA) 5% e centrifugadas a 2000 rpm 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 (DARDEVET et al., 2000). O conteúdo de proteína muscular será determinado pelo método folin fenol e a radioatividade incorporada à proteína muscular será medida com o auxílio de um cintilador. A síntese protéica será calculada dividindo-se a radioatividade incorporada pela radioatividade específica da fenilalanina no meio de incubação e expressa como nanomoles de fenilalanina incorporada por miligrama de proteína por 2 (duas) horas.

Degradação de Proteína

A liberação de tirosina pelo músculo isolado na presença de ciclohexamida foi utilizada como índice de degradação protéica. Este método vale-se do fato de que o aminoácido tirosina não é sintetizado nem degradado pelo músculo esquelético. Fatias longitudinais musculares (70 mg) foram pré-incubadas em tampão Kregs-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 (5 μ U/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 incubadas por 2 (duas) horas. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram utilizadas para a determinação do teor de tirosina (SEIDER et al., 1980).

Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística utilizada foi a ANOVA Two-Way seguida do teste de Newman-Keuls. O nível de significância foi pré-fixado em 5%.

RESULTADOS

Os animais tratados com aloxana (SD e TD) tiveram peso corporal reduzido ($p < 0,05$) quando comparados aos demais grupos durante todo o estudo (Figura 1A). Em contraste, os grupos SD e TD tiveram ingestão alimentar e hídrica comparativamente mais elevadas ($p < 0,05$) do que os grupos SC e TC (Figura 1B e 1C, respectivamente).

Conforme esperado, no teste de tolerância à glicose (oGTT) realizado no início do experimento, o grupo SD apresentou maior glicemia ($p < 0,05$) que o grupo SC em todos os momentos, ou seja, em jejum e 30, 60 e 120 minutos após sobrecarga oral de glicose. Conseqüentemente, o grupo SD apresentou também maior área sob a curva glicêmica (Figura 2A).

Após 8 semanas, novo teste de tolerância à glicose foi realizado. Nessa fase, a ANOVA apontou diferenças em função da droga e em função do treino. A glicemia dos grupos SD e TD foi maior ($p < 0,05$) que a dos demais grupos (SC e TC) durante todo o

teste. Os ratos controles que treinaram na intensidade da MFEL (TC) tiveram menores valores de glicose ($p<0,05$) no oGTT aos 30 e 60 minutos que os ratos demais ratos, e a glicemia dos animais diabéticos treinados (TD) foi menor que do respectivo grupo sedentário (SD). A área sob a curva glicêmica foi maior ($p<0,05$) em ambos os grupos diabéticos (SD e TD) que nos controles (SC e TC). Nenhum efeito do exercício foi visto (Figura 2 B).

A Tabela 1 contém os valores médios de lactato sangüíneo e sobrecarga correspondentes à máxima fase estável do lactato dos animais no início do experimento de acordo com o teste MFEL. A carga máxima suportada pelos animais (em % do peso corporal) em que foi observada estabilização da concentração sérica de lactato foi significativamente maior ($p<0,05$) no grupo controle (SC) comparado ao grupo diabético (SD). Contudo, os valores de lactato na carga equivalente à MFEL foram maiores ($p<0,05$) no grupo diabético (SD) em relação ao grupo controle (SC).

A Figura 3 apresenta um exemplo do comportamento da concentração sangüínea de lactato durante Teste da Máxima Fase Estável de Lactato de um rato controle (SC) e um rato diabético (SD) no início do experimento. Nesse exemplo, tanto o animal do grupo SC quanto do grupo SD realizaram o teste suportando sobrecarga equivalente à 6% do peso corporal. A concentração de lactato do 10º ao 20º minuto se estabiliza no animal SC (variação menor que 1 mmol/L do 10º ao 20º minuto), ao passo que no rato SD ela se eleva continuamente.

As concentrações séricas de glicose, insulina, proteínas totais e ácidos livres (AGL), juntamente com o teor de insulina do pâncreas após o sacrifício são mostradas na Tabela 2. Os animais diabéticos (SD e TD) tiveram glicemia mais elevada ($p<0,05$) e insulinemia mais baixa ($p<0,05$) do que os controles (SC e TC). A ANOVA apontou

diferença em função da droga, treino, e uma interação entre os dois fatores para os níveis séricos de proteínas totais. Os grupos diabéticos (SD e TD) tiveram menores níveis protéicos ($p < 0,05$) que os animais controles (SC e TC), e o grupo controle treinado (TC) teve um valor de proteínas totais séricas comparativamente maior ($p < 0,05$) que o respectivo grupo sedentário (SC). Embora a ANOVA tenha encontrado diferença em função da droga ao analisar os níveis circulantes de A.G.L., nenhuma diferença foi observada entre os grupos. Diferença em função da droga e interação entre droga e exercício foi constatada na análise do teor pancreático de insulina pela ANOVA. O conteúdo de insulina do pâncreas foi menor ($p < 0,05$) nos grupos SD e TD comparado aos grupos SC e TC, e maior ($p < 0,05$) no grupo TC que nos demais grupos (Tabela 2).

Na Figura 4 encontram-se os resultados referentes à resposta relaxante à acetilcolina (Figura 4A) e nitroprussiato de sódio (Figura 4B) ao final do experimento em anéis aórticos de ratos pré-contraídos com fenilefrina. A EC_{50} (concentração do agonista que produz metade da resposta máxima) não foi diferente entre os grupos tanto em resposta à acetilcolina quanto ao nitroprussiato de sódio. Por outro lado, a resposta máxima à acetilcolina foi menor ($p < 0,05$) no grupo SD comparado ao grupo SC, e maior ($p < 0,05$) no grupo TD comparado ao grupo SD. A EC_{50} e a resposta máxima ao nitroprussiato de sódio não diferiram entre os grupos.

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes ao metabolismo da glicose no músculo sóleo incubado no fim do experimento. A captação de glicose não foi diferente entre os grupos. A oxidação de glicose apresentou diferenças em função da droga e interação entre droga e exercício. Ela foi menor ($p < 0,05$) nos grupos diabéticos (SD e TD) do que nos grupos controles (SC e TC), e maior ($p < 0,05$) nos animais diabéticos

treinados na intensidade da MFEL (TD) do que nos animais diabéticos sedentários (SD). A síntese de glicogênio foi menor ($p<0,05$) nos animais do grupo diabético sedentário (SD) comparado aos animais controles sedentários e treinados (SC e TC). O teor de glicogênio do músculo sóleo foi maior ($p<0,05$) no grupo TD quando comparado ao grupo SC. Com relação à síntese de lactato, a ANOVA apontou diferença em função da droga aloxana, mas nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada com o teste de contraste (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra os valores de síntese e degradação protéicas no músculo sóleo incubado dos animais. Embora a síntese de proteína não tenha sido diferente entre os grupos, a degradação foi significativamente maior ($p<0,05$) nos grupos SD e TD do que nos demais grupos.

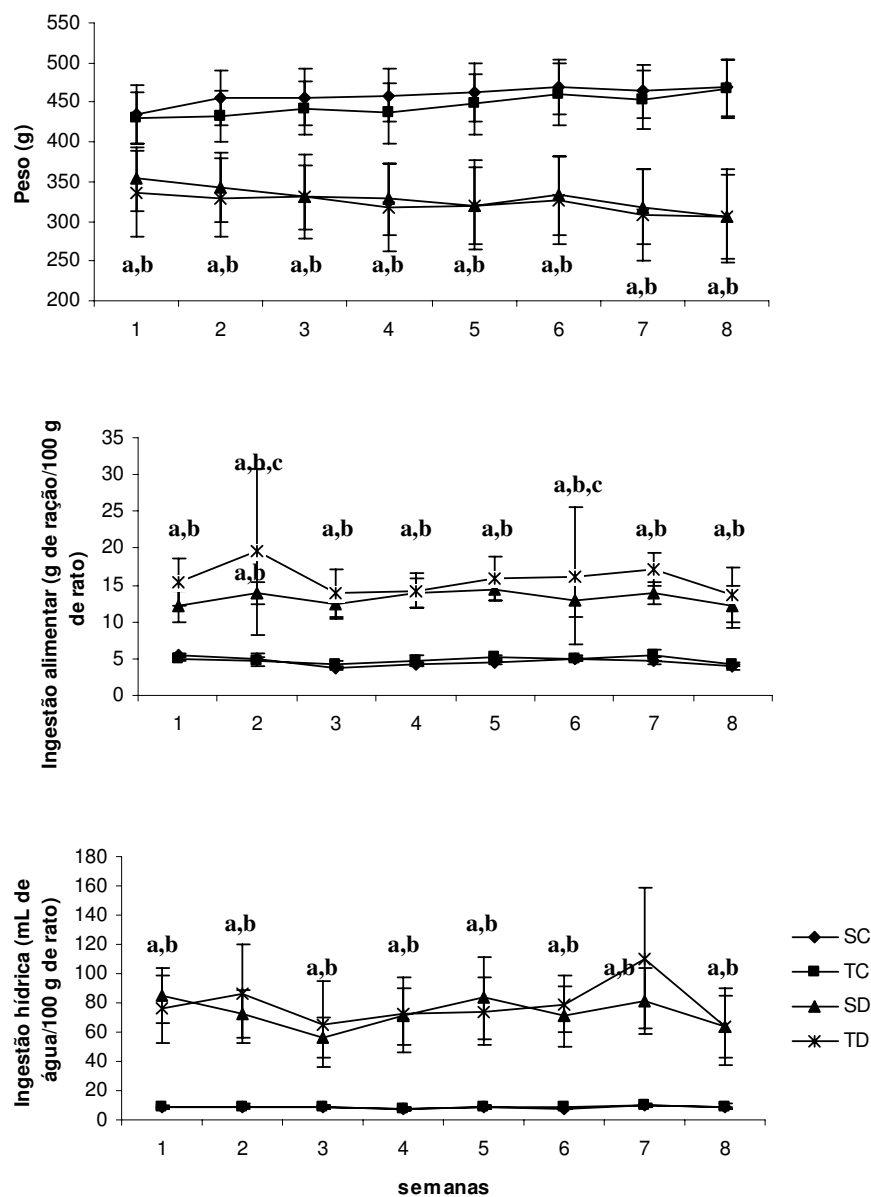


Figura 1: Peso corporal (A), ingestão alimentar (B) e ingestão hídrica (C) dos animais durante o período experimental. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. $n = 6$ animais por grupo. $a \neq SC$; $b \neq TC$; $c \neq SD$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

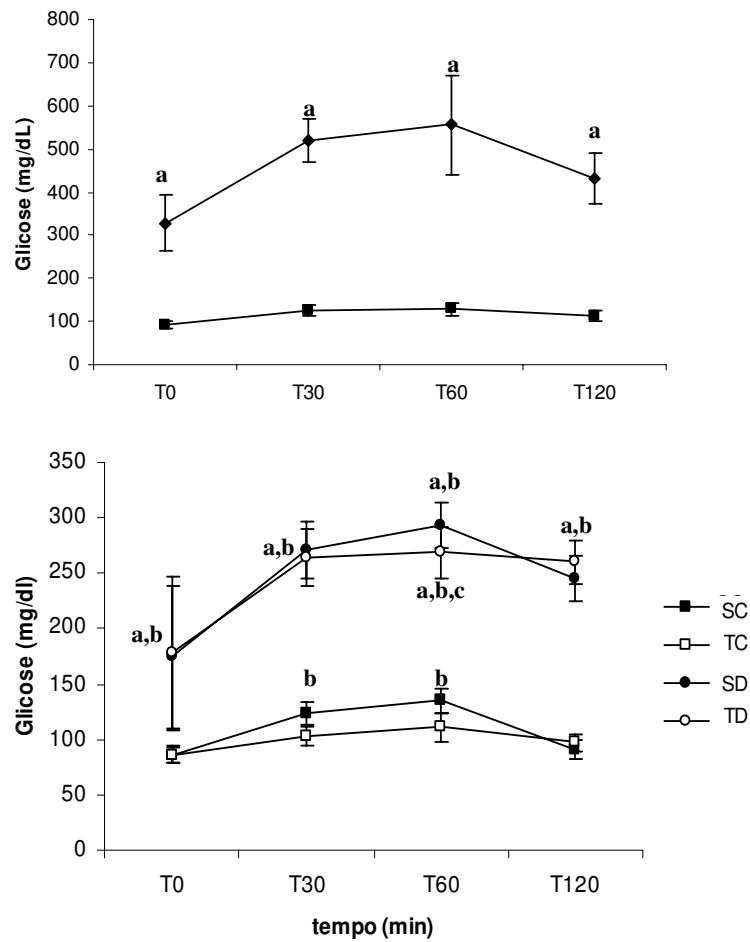


Figura 2: Glicemia dos animais durante teste de tolerância à glicose (oGTT) no início do experimento (A) e após 8 semanas (B). As áreas sob as curvas de glicose (mg/dL x 120 min.) foram: (A) SC = $14498,09 \pm 1158,22$, SD = $58505,36 \pm 6600,48$; (B) SC = $13878,36 \pm 858,71$, TC = $12531,99 \pm 1270,45$, SD = $31158,53 \pm 3206,66$, TD = $30506,27 \pm 3264,54$. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 8$ animais por grupo. a $\neq$ SC; b $\neq$ TC; c $\neq$ SD. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

Tabela 1: Lactato sanguíneo (mmol/L) e carga (% em relação ao peso corporal) equivalentes à MFEL, conforme determinados pelo teste da Máxima Fase Estável de Lactato no início do experimento.

	Lactato	Carga
SC	$5,00 \pm 0,90$	$5,80 \pm 0,80$
SD	$6,40 \pm 0,97^a$	$4,60 \pm 1,13^a$

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo SC $n = 13$ animais, grupo SD $n = 8$ animais. $a \neq$ SC. SC = sedentário controle; SD = sedentário diabético.

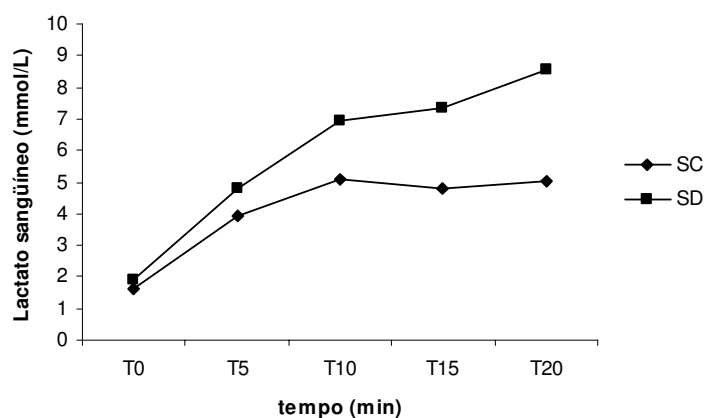


Figura 3: Curva lactato sanguíneo vs carga de trabalho durante teste da máxima fase estável de lactato (MFEL) de um rato controle (SC) e um rato diabético (SD) no início do experimento, ambos suportando sobrecarga equivalente à 6% p.c. SC = sedentário controle; SD = sedentário diabético.

Tabela 2: Teores séricos de glicose (mg/dL), insulina (Insulina S, ng/mL), proteínas totais (g/dL) e ácidos graxos livres (A.G.L., em $\mu\text{Eq/L}$), e insulina pancreática (Insulina P, $\mu\text{g/g}$) dos animais obtidos após o sacrifício.

	SC	TC	SD	TD
Glicose	130,56 $\pm$ 33,50	130,10 $\pm$ 22,83	536,14 $\pm$ 22,40 ^{a,b}	524,59 $\pm$ 45,64 ^{a,b}
Insulina S	1,76 $\pm$ 0,35	1,80 $\pm$ 0,23	1,08 $\pm$ 0,11 ^{a,b}	1,16 $\pm$ 0,15 ^{a,b}
Insulina P	0,95 $\pm$ 0,13	1,14 $\pm$ 0,16 ^a	0,61 $\pm$ 0,14 ^{a,b}	0,47 $\pm$ 0,05 ^{a,b}
Proteína	7,55 $\pm$ 0,38	8,10 $\pm$ 0,35 ^a	6,18 $\pm$ 0,20 ^{a,b}	6,24 $\pm$ 0,23 ^{a,b}
A.G.L.	169,59 $\pm$ 73,11	166,77 $\pm$ 40,29	225,78 $\pm$ 83,37	203,02 $\pm$ 54,58

Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. $n = 6$ animais por grupo. a $\neq$ SC; b $\neq$ TC. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

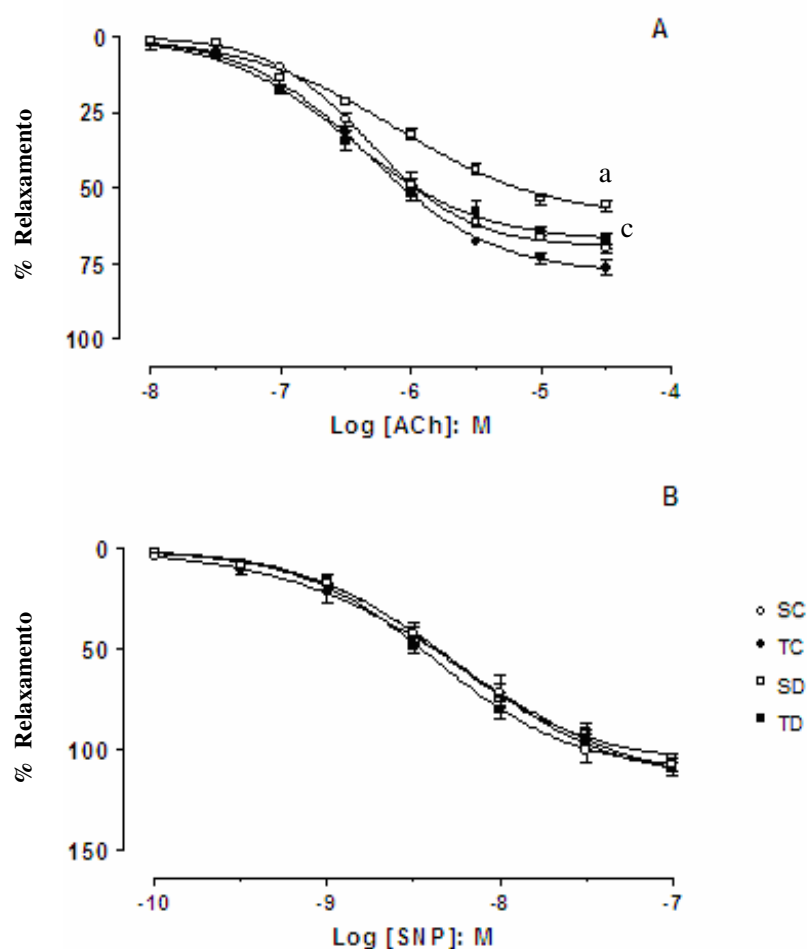


Figura 4. Efeitos do treinamento de 8 semanas na intensidade da MFEL na resposta relaxante à acetilcolina (A) e nitroprussiato de sódio (B) em anéis aórticos de ratos pré-contráídos com fenilefrina (1 μ M). EC_{50} em resposta à acetilcolina: SC = $6,33 \pm 0,05$; TC = $6,22 \pm 0,08$; SD = $6,14 \pm 0,09$; TD = $6,45 \pm 0,08$. EC_{50} em resposta ao nitroprussiato de sódio: SC = $8,20 \pm 0,09$; TC = $8,22 \pm 0,15$; SD = $8,30 \pm 0,11$; TD = $8,34 \pm 0,09$. a $\neq$ SC; c $\neq$ SD. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

Tabela 3: Captação e oxidação de glicose, síntese de glicogênio, produção de lactato ($\mu\text{mol/g} \times \text{h}$) e concentração de glicogênio ($\text{mg}/100 \text{ mg}$) no músculo sóleo isolado dos animais após o sacrifício.

	SC	TC	SD	TD
Captação de glicose	$8,11 \pm 0,95$	$7,93 \pm 1,61$	$8,16 \pm 1,08$	$7,70 \pm 0,89$
Oxidação de glicose	$9,12 \pm 1,28$	$8,83 \pm 1,71$	$5,53 \pm 0,81^{a,b}$	$7,34 \pm 1,67^{a,b,c}$
Síntese de glicogênio	$0,28 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,05^{a,b}$	$0,25 \pm 0,05$
Teor de glicogênio	$0,39 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,05^a$
Produção de lactato	$10,29 \pm 0,76$	$9,91 \pm 2,09$	$8,67 \pm 0,96$	$8,72 \pm 2,10$

Resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. $n = 10$ animais por grupo. $a \neq \text{SC}$; $b \neq \text{TC}$; $c \neq \text{SD}$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

Tabela 4: Síntese e degradação protéicas ($\text{pmol}/\text{mg} \times \text{h}$) no músculo sóleo isolado de ratos após o sacrifício.

	Síntese	Degradação
SC	$13,84 \pm 1,68$	$315,09 \pm 51,69$
TC	$14,36 \pm 2,30$	$296,41 \pm 37,55$
SD	$17,12 \pm 3,25$	$376,74 \pm 64,37^{a,b}$
TD	$15,06 \pm 4,26$	$398,38 \pm 78,67^{a,b}$

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. $n = 10$ animais por grupo. $a \neq \text{SC}$; $b \neq \text{TC}$. SC = sedentário controle; TC = treinado controle; SD = sedentário diabético; TD = treinado diabético.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Sabe-se que a atividade física melhora o quadro do diabetes, prevenindo disfunções cardíacas (VILLANUEVA et al., 2003), bem como melhorando a tolerância e a homeostase glicêmica (LUCIANO; MELLO, 1998; TANCRÉDE et al., 1982). Contudo, estudos envolvendo exercício são freqüentemente questionados pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelo animal. Neste estudo, visando preencher essa lacuna, foram investigados os efeitos do treinamento físico realizado em intensidade equivalente à máxima fase estável de lactato (MFEL) sobre o metabolismo muscular da glicose e das proteínas, e também a função endotelial de ratos diabéticos, todos parâmetros severamente afetados pelo diabetes.

O teste de tolerância a glicose realizado no início do experimento confirmou a instalação do diabetes, uma vez que o grupo tratado com aloxana teve maior glicemia durante todo o teste, e conseqüentemente, maior área sob a curva glicêmica. Perda de peso, polifagia e polidipsia, todos sintomas clínicos do diabetes mellitus, particularmente diabetes tipo 1, também estavam presentes em nossos animais diabéticos.

O emagrecimento, esperado nessas condições apesar da ingestão alimentar aumentada, é creditado primariamente à depleção das reservas de água e triglicerídeos e, de forma crônica, à redução da massa muscular causada pela excessiva proteólise (SALLÉ et al., 2004). O peso corporal não foi afetado pelo treinamento nesse estudo, demonstrando que treinamento físico não implicou em comprometimento adicional deste parâmetro.

A polifagia em diabéticos está geralmente relacionada à baixa produção de leptina (SINDELAR, 1999), e elevada produção de grelina, ambos agindo nos centros

hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético (DONG et al., 2006). A elevação na grelina plasmática é associada a hipoleptinemia diabética (TSUBONE et al., 2005), mas não às concentrações de insulina cerebrais que, apesar de estarem relacionadas ao controle de apetite, permanecem inalteradas no estado de hipoinsulinemia diabética (LEME et al., 2006).

O aumento na ingestão hídrica observado entre os animais diabéticos no presente estudo é explicado pela poliúria, que resulta em perda urinária não apenas de glicose (glicosúria), mas também de água livre e eletrólitos (LARSEN et al., 2002).

Após confirmação do diabetes pelo oGTT, foi realizado o Teste da Máxima Fase Estável de Lactato para determinar a intensidade do exercício a ser realizada pelos animais. Gobatto et al. (2001), que aplicaram o mesmo teste, no mesmo ergômetro, em ratos euglicêmicos, observaram estabilização do lactato nas cargas de 5 e 6% do p.c., valores semelhantes aos encontrados por nós (5,5% p.c.) no grupo controle. A concentração média de lactato na MFEL em nosso estudo nos animais controles foi de 5 mmol/L, valores também próximos ao 5,5 mmol/L encontrado pelo pesquisador supracitado.

A carga de trabalho na máxima fase estável de lactato é usada para se estimar a capacidade aeróbia, e geralmente ela é encontrada numa concentração média de lactato de 4 mmol/L. Por essa razão, há tempos tem-se estimado a MFEL como a carga de trabalho em que a concentração de lactato alcance 4 mmol/L em teste incremental (BILLAT et al., 2003). Contudo, o uso de tal parâmetro para a determinação da MFEL é alvo de críticas freqüentes. Uma delas é a grande variação individual (de 2 a 8 mmol/L). Outra crítica importante baseia-se no fato de que os valores de lactato correspondentes à MFEL podem variar dependendo do ergômetro utilizado (BENEKE, 1995). Essa

hipótese foi levantada por Gobatto et al. (2001) também para estudos com ratos, ao constatar uma estabilização máxima das concentrações de lactato para ratos em torno de 5,5 mmol/L em teste de natação, contra o valor de 4 mmol/L encontrado por Pilis et al. (1993) em teste progressivo em esteira. Essa hipótese foi posteriormente confirmada por Manchado et al. (2006).

Nossa avaliação nos animais diabéticos pode colocar ainda uma outra limitação no uso de valores fixos de lactato para se estimar a MFEL. Os valores de lactato nesses animais se estabilizaram numa concentração mais elevada que nos animais controles (5,0 vs. 6,4 mmol/L). A concentração sangüínea de lactato é controlada e afetada por diversos fatores como capilarização, atividade ou número dos transportadores de lactato, atividade enzimática e reservas de glicogênio (BILLAT et al., 2003). Em algumas condições patológicas como o diabetes o metabolismo de lactato é prejudicado, sem que contudo se saiba a razão da hiperlactacidemia, dada a complexidade dos fatores que controlam a concentração desse substrato. Na tentativa de responder parcialmente a essa questão, Py et al. (2001) encontraram uma transporte total de lactato reduzido em vesículas sarcolemas de ratos diabéticos, e esse resultado estava associado a uma atividade oxidativa muscular aumentada. Embora esses sejam casos extremos de diabetes não controlados, esses achados também depõe contra o uso de valores fixos de lactatos, principalmente quando pensamos em populações com distúrbios metabólicos.

A sobrecarga média equivalente à MFEL no grupo diabético foi menor que a observada no grupo controle. Isso parece indicar que as alterações metabólicas e fisiológicas provocadas pelo diabetes tornaram esses animais menos tolerantes ao exercício. Corroborando nosso resultado, Niranjan et al. (1997) encontraram em pacientes com IDDM com pobre controle glicêmico, capacidade aeróbia

significativamente prejudicada, devido em grande parte à um volume sistólico máximo reduzido, à restrições do volume pulmonar e à capacidade de difusão pulmonar anormal.

Ao final das 8 semanas de treinamento, os animais foram submetidos a outro teste de tolerância à glicose. A glicemia dos grupos treinados (TC e TD) foi menor em alguns momentos do teste quando comparada aos respectivos grupos sedentários (SC e SD), apesar de a área sob a curva glicêmica não ter diferido entre os grupos.

O treinamento físico aumenta a captação de glicose da circulação em função de múltiplas adaptações no músculo esquelético, incluindo aumento na expressão tanto do RNAm quanto da proteína transportadora de glicose (glut-4), aumento da capacidade enzimática e da capilarização muscular (BORGHOUTS; KEIZER, 2000; LEE et al., 2002; ZINMAN et al., 2003). O exercício crônico também aumenta a sensibilidade celular à insulina, potencializando seu efeito junto a fosforilação dos substratos do receptor de insulina-1 e 2 (IRS-1 e IRS-2), aumentando, por consequência, a atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (HOWLETT et al., 2002; LUCIANO et al., 2002). Desta forma, a redução da glicemia nos grupos treinados deve estar relacionada a algum destes fatores.

Neste estudo foram realizadas avaliações de glicemia e insulinemia no estado alimentado. Foram constatadas hiperglicemia e hipoinsulinemia nos animais diabéticos. A droga diabetogênica aloxana, pela produção de espécies reativas de oxigênio, somada a um simultâneo aumento massivo no cálcio citosólico, causa rápida destruição das células beta das ilhotas de Langerhans localizadas no pâncreas (SZKUDELSKI et al., 2001). As células beta são produtoras de insulina e a sua destruição é responsável pela hipoinsulinemia encontrada nos animais feitos diabéticos pela aplicação dessa droga.

O hipoinsulinismo gera uma série de distúrbios metabólicos. A hiperglicemia encontrada nos animais diabéticos no presente estudo é causada pela severa redução deste hormônio. A insulina promove a manutenção da homeostase glicêmica de várias formas, principalmente pela redução da saída de glicose hepática (via diminuição de glicogenólise e gliconeogênese) e aumento da captação de glicose em determinados tecidos. Na condição de repouso, as células musculares e adiposas dependem da translocação, estimulada pela insulina, dos glut-4 para a superfície celular para captação da glicose sérica (PESSIN; SALTIEL, 2000).

Na tentativa de ampliar as informações sobre os efeitos do treinamento na intensidade da MFEL sobre o metabolismo glicídico de ratos diabéticos, avaliamos também captação e oxidação de glicose bem como síntese de glicogênio e produção de lactato pelo músculo sóleo isolados desses animais.

O exercício físico é um estímulo para a regulação dos processos metabólicos na musculatura esquelética, favorecendo a captação de glicose e a síntese de glicogênio e de proteína (BORGHOUTS; KEIZER, 2000; SAKAMOTO; GOODYEAR, 2002). A oxidação de glicose e síntese de glicogênio foram reduzidas nos animais diabéticos, mas o treinamento por natação na intensidade da MFEL parcialmente restaurou os valores de oxidação de glicose e impediu a diminuição da síntese de glicogênio. Estes dados estão de acordo com a literatura, que indica essas adaptações com o exercício moderado (MATZINGER et al., 2002).

Os efeitos do exercício realizado na intensidade da MFEL sobre o metabolismo protéico no músculo sóleo isolado também foram investigados. A associação entre diabetes mellitus e catabolismo protéico é conhecida há milênios. O catabolismo é resultado de degradação protéica aumentada, síntese protéica diminuída ou combinação

de mudanças relativas tanto da degradação quanto na síntese. Na condição de privação de insulina, há consenso entre os pesquisadores de que a degradação protéica está aumentada (CHARLTON; NAIR, 1998). Embora a síntese protéica não tenha diferido entre os grupos em nosso trabalho, encontramos maior degradação protéica nos grupos diabéticos (SD e TD).

A insulina, entre outras ações, também é capaz de ativar a proteína mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos), cuja sinalização promove a síntese protéica e crescimento celular. A ligação da insulina ao seu receptor culmina em uma série de reações de fosforilação, que ativam a PI3K, e a via de sinalização PI3K-mTOR (BOLSTER et al., 2004). Um intermediário nessa via, a Akt ou proteína quinase B (PKB), bifurca essa via ao fosforilar simultaneamente a mTOR e a GSK3 β (glicogênio sintase quinase-3 β), abolindo a degradação de proteínas como ciclina D1 e c-Myc e também evitando a destruição da proteína β -catetina, promovendo respectivamente, a proliferação e sobrevivência celular (BERNAL-MIZRACHI et al., 2001, DICKSON; RHODES, 2004, ELGHAZI et al., 2006). A insulina dessa forma tem um importante papel anabólico, mas também anticatabólico, e em situações crônicas de hipoinsulinemia como no caso de nossos animais diabéticos, a equação claramente se desequilibra a favor do catabolismo protéico.

Um outro mecanismo de degradação protéica pode estar ativado no diabetes. A via de degradação protéica não lisossomal controlada pelo sistema ubiquitina-proteossomo envolve quebra de proteínas miofibrilares e intracelulares, e é ativada em situações de catabolismo severo (KEE et al., 2002, WRAY et al., 2002). Este processo, dependente de ATP, envolve múltiplos estágios que são proteossomo-dependentes e incluem a ubiquitinização da proteína pela família enzimática ubiquitina E1, E2 e E3. A

proteína poliubiquitinizada é então degradada à polipeptídeos pelo complexo proteossomo 26S (ATTAIX et al., 2001, TAILLANDIER et al., 2004). Merforth et al. (1999) sugerem que esse processo possa participar da quebra exagerada de proteínas ao encontrar atividade proteolítica aumentada após indução de diabetes em ratos.

O diabetes mellitus também causa danos micro e macrovasculares sérios, diminuindo a qualidade e expectativa de vida dos pacientes (EIZIRIK, 1995; KELLY et al., 2003), e a disfunção endotelial é considerada um importante fator na patogênese da micro e macro angiopatia (CALLES-ESCANDON; CIPOLLA, 2001; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2005). Entre outras funções, as células endoteliais, que se localizam na mais interna (lúmen) das três camadas que compõe um vaso sanguíneo (MULVANY; AALKJAER, 1990), regulam a permeabilidade e o tônus vascular, e essas ações são mediadas pela produção de mediadores regulatórios, dentre os quais destaca-se o óxido nítrico, ou NO (CALLES-ESCANDON; CIPOLLA, 2001; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2005).

O NO endógeno é produzido pela conversão do aminoácido L-arginina à L-citrulina, pela ação da enzima NO sintase (NOS) (CALLES-ESCANDON; CIPOLLA, 2001; MAIORANA et al., 2003). O NO produzido pelas células endoteliais difunde-se para as células musculares adjacentes, que compõe a camada média vascular, e interage com a enzima guanilato ciclase, levando à formação de GMPc, que por sua vez diminui os níveis de cálcio intracelular, resultando em relaxamento muscular com conseqüente vasodilatação (MONCADA et al., 1988; PALMER et al., 1988).

Para avaliar a função endotelial, analisamos a resposta da artéria aorta aos agentes vasodilatadores acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (SNP) nos diferentes grupos no final do experimento. A vasodilatação provocada pela acetilcolina

é endotélio-dependente, mediada por ligação da Ach ao seu receptor no endotélio vascular, ao passo que o nitroprussiato de sódio é um doador de óxido nítrico, que se difunde e age nas células musculares lisas vasculares (CALLES-ESCANDON; CIPOLLA, 2001).

Nossos animais diabéticos tiveram menor resposta relaxante em resposta à Ach e não ao SNP, indicando claramente a presença de disfunção endotelial. Os resultados da literatura são contrastantes sobre a presença ou não de disfunção endotelial no diabetes tipo 1 (CALLES-ESCANDON; CIPOLLA, 2001; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2005). De acordo com esses mesmos autores, o estado diabético predispõe ao aparecimento da disfunção endotelial, mas outros fatores podem determinar se ela ocorrerá ou não.

Por outro lado, nosso protocolo de treinamento restaurou a ação vasodilatadora da acetilcolina nos animais diabéticos a valores semelhantes aos observados em nossos animais controles e, portanto, melhorou a função endotelial. Os efeitos benéficos da atividade física regular sobre a função endotelial são mostrados tanto em experimentos envolvendo animais (DELP et al., 1993) quanto humanos (HIGASHI et al., 1999). O aumento do fluxo sanguíneo e da pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular durante o exercício provocam aumento na tensão de cisalhamento, ou *shear stress*. O *shear stress* sobre a parede endotelial é um potente estímulo para produção de NO. Ele ativa os mecanorreceptores na parede do endotélio que convertem os estímulos mecânicos em estímulos químicos para a ativação da NOS (KOJDA; HAMBRECHT, 2005). Somada a essa ação vasodilatadora, o NO possui ainda propriedades antiaterogênicas, evidenciando a importante ação vaso e cardioprotetora do treinamento físico (MAIORANA et al., 2003; SCHALKWIJK; STEHOUWER, 2005).

Há um consenso geral que o aparecimento de disfunção endotelial no diabetes tipo 1 implica em um risco muito elevado de micro e macroangiopatia (CALLES-ESCANDON; CIPOLLA, 2001), e dada a gravidade dessas complicações, o efeito do treinamento de 8 semanas aplicado por nós é extremamente importante, especialmente se levarmos em consideração que nosso modelo de diabetes é severo (sem tratamento com insulina exógena) e os animais permaneceram nessa condição por cerca de 10 semanas.

Concluimos dessa forma que o treinamento de 8 semanas na intensidade da máxima fase estável de lactato proporcionou algumas melhoras no metabolismo glicídico (oxidação de glicose, síntese de glicogênio e menor glicemia em um ponto do oGTT) e restaurou a função endotelial dos animais diabéticos, sem contudo alterar o metabolismo protéico. A determinação da intensidade do esforço também nos revelou que 2 semanas após indução do diabetes os animais apresentam prejuízo da capacidade aeróbia, o que deve ser levado em consideração quando a atividade física for utilizada nessa condição.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pelas agências brasileiras de fomento CAPES, FAPESP (2005/02139-0) e CNPq (300270/2004-6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Diabetes Association. Diagnosis and classifications od diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.28, p.S37-42, 2005.

ATTAIX, D. et al. Regulation of proteolysis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care**, v. 4, n.1, p.45-49, 2001.

BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.27, n.6, p.863-867, 1995.

BERNAL-MIZRACHI, E. et al. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. **Journal of Clinical Investigation**, v.108, n.11, p.1631-1638, 2001.

BILLAT, V. L. et al. The concept of maximal lactate steady state. **Sports Medicine**, v.33, n.6, p.407-426, 2003.

BOLSTER, D. R.; JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, n.2, p.351-356, 2004.

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

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, n.6865, p.813-821, 2001.

CALLES-ESCANDON, J.; CIPOLLA, M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. **Endocrine Reviews**, v.22, n.1, p.36-52, 2001.

CARPINELLI, A. R. **Estudo da secreção de insulina e da homeostase glicêmica em ratos desnutridos**. 1978. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

CHARLTON, M.; NAIR, K. S. Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Nutrition**, v.128, suppl. 2, p.323S-27S, 1998.

DARDEVET, D. et al. Stimulation of *in vitro* rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **Journal of Nutrition**, v.130, n.11, p.2630-2635, 2000.

DELP, M. D.; McALLISTER, R. M.; LAUGHLIN, M. H. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. **Journal of Applied Physiology**, v.75, n.3, p.1354-63, 1993.

DICKSON, L. M.; RHODES, C. J. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.287, n.2, p.E192-198, 2004.

DONG, J. et al. Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. **Endocrinology**, v.147, n.6, p.2634-2642, 2006.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

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

ELGHAZI, L.; BALCAZAR, N.; BERNAL-MIZRACHI, E. Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.38, n.2, p.157-163, 2006.

ENGEL, P. C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v.88, n.2, p.475-484, 1978.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Molecular Pathology Part A**, v.130, n.1, p.21-7, 2001.

HERBERT, V. et al. Coated charcoals immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.25, n.10, p.1375-1384, 1965.

HIGASHI, Y. et al. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. **Circulation**, v.100, n.11, p.1194-1202, 1999.

HOWLETT, K. F. et al. Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice. **Diabetes**, v.51, n.2, p.479-483, 2002.

JONES, A. M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameter of aerobic fitness. **Sports Medicine**, v.29, n.6, 373-386, 2000.

KEE, A. D. et al. Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. **Journal of Physiology**, v.546, n.3, p.765-766, 2002.

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

KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovascular Research**, v.1, n.67, p.187-197, 2005.

LARSEN, P. R. et al. (2002) Williams Textbook of Endocrinology. 10th ed. Saunders. 1820p.

LEE, J. S. et al. Interaction of exercise and diet on glut-4 protein and gene expression in type I and type II rat skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.175, n.1, p.37-44, 2002.

LEME, J. A. C. A. et al. Concentrações cerebrais de insulina em animais diabéticos experimentais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.50, p.172, 2006.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, v.2, n.12, p.202-209, 1998.

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**, v.147, n.1, p.149-157, 2002.

MAIORANA, A. et al. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. **Sports Medicine**, v.33, n.14, p.1013-1035, 2003.

MANCHADO, F. B. et al. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente

em modelo experimental utilizando ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12, n.5, 2006

MATTHEWS, J. N. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, v.300, n.6719, p.230-235, 1990.

MATZINGER, O; SCHNEITER, P; TAPPY, L. Effects of fatty acids on exercise plus insulin-induced glucose utilization in trained and sedentary subjects. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.282, n.1, p.E125-131, 2002.

MERFORTH, S.; OSMERS, A.; DAHLMANN, B. Alterations of proteasome activities in skeletal muscle tissue of diabetic rats. **Molecular Biology Reports**, v.26, n.1-2, p.83-87, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R. M., HIGGS, E. A. The Discovery of the nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v.12, n.4, p.365-372, 1998.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Reviews**, v.70, n.4, p.921-961, 1990.

NIRANJAN, V. et al. Glycemic control and cardiopulmonary function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **American Journal of Medicine**, v.103, n.6, p.504-13, 1997.

NOGUEIRA, D. M. et al. Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M. et al. **Métodos de bioquímica clínica**. São Paulo: Pancast, 1990. p.153-168.

PALMER, R. M. et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.30, n.153, p.1251-1256, 1988.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, n.2, p.165-169, 2000.

PILIS, W. et al. Anaerobic threshold in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.106A, n.2, p.285-289, 1993.

PORTUESE, E. I. et al. High mortality from unidentified CVD in IDDM: time to start screening? **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.30, n.3, p.223-231, 1995.

PY, G. et al. Streptozotocin-induced diabetes decreases rat sarcolemmal lactate transport. **Metabolism**, v.50, n.4, p.418-424, 2001.

SAKAMOTO, K.; GOODYEAR, L. J. Exercise Effects on Muscle Insulin Signaling and Action Invited Review: Intracellular signaling in contracting skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.1, p.369-383, 2002.

SALLÉ, A. et al. Effect of insulin treatment on the body composition in type 2 diabetic patients. **Diabetes Medicine**, v.21, n.12, p.1298-1303, 2004.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. A. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. **Clinical Science**, v.109, n.2, p.143-159, 2005.

SEIDER, M. J. et al. The effects of cutting or of stretching skeletal muscle in vitro on the rates of protein synthesis and degradation. **Biochemistry Journal**, v.188, n.1, p.247-254, 1980.

SINDELAR, D. K. et al. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. **Diabetes**, v.48, n.6, p.1275-80, 1999.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v.50, n.6, p.536-546, 2001.

TAILLANDIER, D. T. et al. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodeling of skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, 357-361, 2004.

TANCRÉDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Diabetes**, v.31, pt.1, p.406-9, 1982.

TSUBONE, T. et al. Leptin downregulates ghrelin levels in streptozotocin-induced diabetic mice. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v.289, n.6, p.1703-1706, 2005.

VILLANUEVA, D. S. et al. Prevention of ischemic heart failure by exercise in spontaneously diabetic BB Wor rats subjected to insulin withdrawal. **Metabolism**, v.52, n.6, p.791-97, 2003.

WRAY, C. D.; MAMMEN, J. M.; HASSELGREEN, P. O. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition**, v.18, n.11-12, p.971-977, 2002.

ZINMAN, B. et al. Physical activity/exercise and diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.26, supl.1, p.73-77, 2003.

6. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES GERAIS

Ao se prescrever ou recomendar a prática da atividade física devemos levar em consideração o volume, a frequência e a intensidade do esforço realizado. Sabendo-se esses três fatores, será possível conhecer 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 da atividade física. Por motivos óbvios, a determinação da intensidade do esforço não é tão simples, e essa informação acaba sendo negligenciada. Essa lacuna torna os estudos sobre os efeitos da atividade física, especialmente aqueles envolvendo animais, imprecisos e prejudicam a extrapolação dos resultados para a aplicação prática, fazendo desses trabalhos alvos constantes de crítica. Dessa forma, nosso estudo foi delineado para investigar os efeitos do exercício em intensidade conhecida sobre parâmetros metabólicos severamente afetados pelo diabetes.

A determinação da intensidade do exercício em si, tanto com o teste do lactato mínimo como com o teste da máxima fase estável de lactato (TMFEL), nos trouxe uma informação importante. Apenas duas semanas após a indução do diabetes, a capacidade aeróbia dos animais foi significativamente reduzida. Além disso, com o TMFEL observamos uma estabilização máxima da concentração de lactato numa concentração

mais elevada nos animais diabéticos. Em conjunto, esses resultados têm uma aplicação prática importante, seja para pesquisas com modelos experimentais de diabetes envolvendo exercício, seja para prescrição de exercício para indivíduos portadores da doença, especialmente nos casos com pobre controle glicêmico. Deve-se levar em conta o prejuízo da capacidade aeróbia e evitar o uso de valores fixos de lactato para a prescrição de exercício nesses casos.

Nossos resultados, de forma geral, 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 6-8 semanas. Tivemos esse cuidado justamente para evitar interferência dos efeitos agudos da atividade física.

Pudemos observar que o treinamento na intensidade escolhida (transição aeróbia-anaeróbia) apresentou efeitos benéficos variados sobre o metabolismo de glicose, 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 Ca^{2+} (via ativação de proteínas cálcio-dependentes como proteína quinase calmodulina-dependente (CAMPK), proteína quinase C (PKC) e neuregulina) 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 do exercício independente da presença do hormônio pancreático, mas os efeitos de uma única sessão de atividade física permanecem por pelo menos 16 horas, com maior sensibilidade à insulina e maior expressão de RNA mensageiro para glut-4 e da própria proteína glut-4 (BORGHOUTS; KEIZER, 2000).

Obtivemos resultados variados com relação ao metabolismo protéico. Em ambos os experimentos com análise do turnover protéico (estudos 1 e 3) os animais diabéticos tiveram maior degradação de proteína no músculo sóleo isolado. Contudo, no primeiro estudo obtivemos menor degradação protéica em animais diabéticos treinados (OLIVEIRA et al., 2007), e nenhuma alteração ocorreu no terceiro estudo. 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; BOLSTER et al., 2004), promovendo desta forma maior síntese e menor degradação protéicas. Assim, apesar de termos observado diminuição da degradação protéica nos animais diabéticos no estudo 1, talvez por inibição da via proteolítica ubiquitina-proteossomo (TAILLANDIER et al., 2004) nosso protocolo de treinamento não é o mais indicado para obter respostas anabólicas máximas.

A restauração da função endotelial nos animais diabéticos pelo nosso protocolo de treinamento, vista pela normalização da resposta à acetilcolina (dependente de endotélio) em artéria aorta, é um resultado bastante positivo. O aparecimento de disfunção endotelial no diabetes tipo 1 implica em um risco muito elevado de micro e macroangiopatia (CALLES-ESCANDON; CIPOLLA, 2001), e dada a gravidade dessas complicações, o efeito do treinamento de 8 semanas em intensidade moderada é extremamente importante, especialmente se levarmos em consideração que nosso modelo de diabetes é severo (sem tratamento com insulina exógena) e os animais permaneceram nessa condição por cerca de 10 semanas.

Concluimos assim que o treinamento aeróbio de 6-8 semanas em intensidade moderada de esforço (transição metabólica) proporcionou melhorias no metabolismo

glicídico, protéico e da função endotelial. Os principais achados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Principais resultados observados nos 3 estudos realizados.

	ESTUDO 1	ESTUDO 2	ESTUDO 3
Metabolismo Glicídico	Melhor tolerância à glicose durante GTTo nos animais TD em relação à SD.	Aumento da oxidação de glicose e síntese e teor de glicogênio no músculo sóleo isolado dos animais do grupo TD.	Redução da glicemia em um ponto durante GTTo, maior oxidação de glicose e normalização da síntese de glicogênio no grupo TD em relação ao SD.
Metabolismo Protéico	Normalização da degradação protéica no grupo TD.	-----	-----
Função Endotelial	-----	-----	Normalização da função endotelial (resposta vasodilatadora à ACh) dos animais do grupo TD.

Além disso, ambos os protocolos para determinação da transição metabólica (Teste do Lactato Mínimo e Teste da Máxima Fase Estável de Lactato, nos estudos 1 e 3, respectivamente) mostraram-se eficazes para o seu fim e foram sensíveis às alterações fisiológicas provocadas pelo diabetes, mostrando um prejuízo na capacidade aeróbia desses animais já no início dos experimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

American Diabetes Association. Diagnosis and classifications od diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.28, p.S37-42, 2005.

ASTRAND, P. “Why exercise?”. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, Madison, v.24, n.2, p.153-62, 1992.

ATTAIX, D. et al. Regulation of proteolysis. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care**, v.4, n.1, p.45-49, 2001.

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.

BALAMURUGAN, A. N. et al. Streptozotocin (STZ) is commonly used to induce diabetes in animal models. **Pancreas**, v.26, n.1, p.102-103, 2003.

BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.27, n.6, p.863-867, 1995.

BERNAL-MIZRACHI, E. et al. Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. **Journal of Clinical Investigation**, v.108, n.11, p.1631-1638, 2001.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) – NBR 6023/2002.

BILLAT, V. L. et al. The concept of maximal lactate steady state. **Sports Medicine**, v.33, n.6, p.407-426, 2003.

BODINE, S. C. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.38, n.11, p.1950-957, 2006.

BOLSTER, D. R.; JEFFERSON, L. S.; KIMBALL, S. R. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, n.2, p. 351-356, 2004.

BONORA, E. et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v.23, n.1, p.57-63, 2000.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **Journal of Applied Physiology**, v.88, n.2, p.774-787, 2000.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.1, p.3-30, 2002.

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

BOUCHARD, C.; DESPRÉS, J. P. Variation in fat distribution with age and health implications. In: American Academy of Physical Education Papers (Sixtieth Annual Meeting), n.22, Human Kinetic Books, 1989.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, n.6865, p.813-821, 2001.

CALLES-ESCANDON, J.; CIPOLLA, M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. **Endocrine Reviews**, v.22, n.1, p.36-52, 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.

CARLING, D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. **Trends in Biochemical Sciences**, v.29, n.1, p.18-24, 2004.

CARPINELLI, A. R. **Estudo da secreção de insulina e da homeostase glicêmica em ratos desnutridos**. 1978. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

CHAKRAVARTHY, M. V.; BOOTH, F. W. Eating, exercise, and “thrifty” genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. **Journal of Applied Physiology**, v.96, n.1, p.3-10, 2004.

CHARLTON, M.; NAIR, K. S. Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Nutrition**, v.128, suppl.2, p.323S-27S, 1998.

CROZIER, S. J. et al. Tissue-specific regulation of protein synthesis by insulin and free fatty acids. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.285, n.4, p.E754-762, 2003.

DARDEVET, D. et al. Stimulation of *in vitro* rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. **Journal of Nutrition**, v.130, n.11, p.2630-2635, 2000.

DELP, M. D.; McALLISTER, R. M.; LAUGHLIN, M. H. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. **Journal of Applied Physiology**, v.75, n.3, p.1354-63, 1993.

DICKSON, L. M.; RHODES, C. J. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.287, n.2, p.E192-198, 2004.

DONG, J. et al. Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. **Endocrinology**, v.147, n.6, p.2634-2642, 2006.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

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

ELGHAZI, L.; BALCAZAR, N.; BERNAL-MIZRACHI, E. Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.38, n.2, p.157-163, 2006.

ENGEL, P. C.; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v.88, n.2, p.475-484, 1978.

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

GILES, K. W.; MAYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature**, v.206, n.4975, p.93, 1965.

GLICKMAN, M. H.; CHIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction of the sake of construction. **Physiology Reviews**, v.82, n.2, p.373-428, 2002.

GLEASON, C. E. et al. The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.14, p.10341-10351, 2007.

GOBATTO, C. A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Molecular Pathology Part A**, v.130, n.1, p.21-7, 2001.

GOMES, R. J. et al. Effects of chronic exercise on growth factors in diabetic rats. **Journal of Exercise Physiology**, v.8, n.2, p.16-23, 2005.

HAMEL, F. G.; UPWARD, J. L.; BENNETT, R. G. In vitro inhibition of insulin-degrading enzyme by long-chain fatty acids and their coenzyme A thioesters. **Endocrinology**, v.144, n.6, p.2404-2408, 2003.

HECK, H. et al. Justification of the 4 mmol/l lactate threshold. **International Journal of Sports Medicine**, v.6, n.3, p. 117-130, 1985.

HERBERT, V. et al. Coated charcoals immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.25, n.10, p.1375-1384, 1965.

HIGASHI, Y. et al. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. **Circulation**, v.100, n.11, p.1194-1202, 1999.

HOWLETT, K. F. et al. Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice. **Diabetes**, Alexandria, v.51, n.2, p.479-483, 2002.

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

JESSEN, N; GOODYEAR, L. J. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.99, n.1, p.330-337, 2005.

JONES, A. M.; DOUST, J. H. The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 Km running performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, n.8, p.1304-1313, 1998.

JONES, A. M.; CARTER, H. The effect of endurance training on parameter of aerobic fitness. **Sports Medicine**, v.29, n.6, p.373-386, 2000.

KEE, A. D. et al. Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. **Journal of Physiology**, v.546, n.3, p.765-766, 2002.

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**, v.31, n.11, suppl., p.619-623, 1999.

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

KIMURA, N. et al. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. **Genes Cells**, v.8, n.1, p.65-79, 2003.

KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovascular Research**, v.1, n.67, p.187-197, 2005.

KREBS, M. et al. Free fatty acids inhibit the glucose-stimulated increase of intramuscular glucose-6-phosphate concentration in man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.86, n.5, p.2153-60, 2001.

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.

LARSEN, P. R. et al. (2002) Williams Textbook of Endocrinology. 10th ed. Saunders. 1820p.

LEE, J. S. et al. Interaction of exercise and diet on glut-4 protein and gene expression in type I and type II rat skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.175, n.1, p.37-44, 2002.

LEME, J. A. C. A. et al. Concentrações cerebrais de insulina em animais diabéticos experimentais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.50, p.172, 2006a.

LEME, J. A. C. A.; SILVEIRA, R. F.; LUCIANO, E. Efeitos da atividade física em parâmetros metabólicos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento** v.14, p.S99, 2006b.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, v.31, n.6, p.337-342, 1988.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulista de Educação Física**, v.2, n.12, p.202-209, 1998.

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**, v.147, n.1, p.149-157, 2002.

MAIORANA, A. et al. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. **Sports Medicine**, v.33, n.14, p.1013-1035, 2003.

MANCHADO, F. B. et al. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.12, n.5, 2006

MANSON, J. E. et al. Physical activity and incidence of non-insulin dependent diabetes mellitus in women. **Lancet**, v.338, n.8770, p.774-778, 1991.

MATTHEWS, J. N. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, v.300, n.6719, p.230-235, 1990.

MATZINGER, O; SCHNEITER, P; TAPPY, L. Effects of fatty acids on exercise plus insulin-induced glucose utilization in trained and sedentary subjects. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.282, n.1, p.E125-131, 2002.

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**, v.28, p.467-470, 1995.

MERFORTH, S.; OSMERS, A.; DAHLMANN, B. Alterations of proteasome activities in skeletal muscle tissue of diabetic rats. **Molecular Biology Reports**, v.26, n.1-2, p.83-87, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R. M., HIGGS, E. A. The Discovery of the nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. **Hypertension**, v.12, n.4, p.365-372, 1998.

MROZIKIEWICZ, A. et al. Blood levels of alloxan in children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v.31, n.4, p.236-237, 1994.

MULVANY, M. J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Reviews**, v.70, n.4, p.921-961, 1990.

NADER, G. A. Concurrent strength and endurance training: from molecules to man. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.38, n.11, p.1965-1970, 2006.

NIRANJAN, V. et al. Glycemic control and cardiopulmonary function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **American Journal of Medicine**, v.103, n.6, p.504-13, 1997.

NOGUEIRA, D. M. et al. Sangue-parte I: Glicídios. In: _____. **Métodos de bioquímica clínica**. São Paulo: Pancast, 1990. p.153-168.

OLIVEIRA, C. A. M.; ROGATTO, G. P.; LUCIANO, E. Efeitos do treinamento físico de alta intensidade sobre os leucócitos de ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.8, n.6, p.219-24, 2002.

OLIVEIRA, C. A. M. et al. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. **Journal of Diabetes Complications**, v.21, n.4, 258-264, 2007.

PALMER, R. M. et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.30, n.153, p.1251-1256, 1988.

PEDERSEN, B. K.; SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scandinavian Journal of Medicine in Science and Sports**, v.16 (suppl 1), p.3-63, 2006.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, n.2, p.165-169, 2000.

PILIS, W. et al. Anaerobic threshold in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.106A, n.2, p.285-289, 1993.

PORTUESE, E. I. et al. High mortality from unidentified CVD in IDDM: time to start screening? **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.30, n.3, p.223-231, 1995.

POWERS, S. K.; HOWLEY, E. T. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2000. 527p.

PY, G. et al. Streptozotocin-induced diabetes decreases rat sarcolemmal lactate transport. **Metabolism**, v.50, n.4, p.418-424, 2001.

ROSSINI, A. A. Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. **Diabetes**, v.53, n.2, p.267-75, 2004.

RUTTER, G. A.; da SILVA XAVIER, G.; LECLERC, I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homoeostasis. **Biochemical Journal**, v.375, n.1, 1-16, 2003.

SAKAMOTO, K.; GOODYEAR, L. J. Exercise effects on muscle insulin signaling and action invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.93, n.1, p.369-383, 2002.

SALLÉ, A. et al. Effect of insulin treatment on the body composition in type 2 diabetic patients. **Diabetes Medicine**, v.21, n.12, p.1298-1303, 2004.

SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUSER, C. D. A. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. **Clinical Science**, v.109, n.2, p.143-159, 2005.

SEIDER, M. J. et al. The effects of cutting or of stretching skeletal muscle in vitro on the rates of protein synthesis and degradation. **Biochemistry Journal**, v.188, n.1, p.247-254, 1980.

SINDELAR, D. K. et al. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. **Diabetes**, v.48, n.6, p.1275-80, 1999.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v.50, n.6, p.536-546, 2001.

TAILLANDIER, D. T. et al. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodeling of skeletal muscle. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, 357-361, 2004.

TANCRÉDE, G.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocina-induced diabetes mellitus. **Diabetes**, v.31, pt.1, p.406-9, 1982.

TEGTBUR, U.; BUSSE, M. W.; BRAUMANN, K. M. Estimation of individual equilibrium between production and catabolism during exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.25, n.5, 620-627, 1993.

TSUBONE, T. et al. Leptin downregulates ghrelin levels in streptozotocin-induced diabetic mice. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v.289, n.6, p.1703-1706, 2005.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. II Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Archives of Internal Pharmacology and Therapeutic**, v.143, p.299-330, 1963.

VILLANUEVA, D. S. et al. Prevention of ischemic heart failure by exercise in spontaneously diabetic BB Wor rats subjected to insulin withdrawal. **Metabolism**, v.52, n.6, p.791-97, 2003.

VOLTARELLI, F.A; GOBATTO, C. A; MELLO, M.AR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.11, p.1389-94, 2002.

VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R.; GOBATTO, C. A. Limiar anaeróbio determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: efeitos dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v.4, n.3, p.16-25, 2004.

WASSERMAN, K; McILROY, M. B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **American Journal of Cardiology**, v.14, p.844-852, 1964.

WEINECK, J. **Treinamento ideal**: instruções técnicas sobre o desempenho fisiológico, incluindo considerações específicas de treinamento infantil e juvenil. 9. ed. São Paulo: Manole, 1999. 740p.

WRAY, C. D.; MAMMEN, J. M.; HASSELGREEN, P. O. Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition**, v.18, n.11-12, p.971-977, 2002.

YAMAGAMI, B. 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**, v.45, n.4, p.1845-49, 1985.

YANEY, G. C.; CORKEY, B. E. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v.46, n.10, p.1297-1312, 2003.

ZINMAN, B. et al. Physical activity/exercise and diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.26, supl.1, p.73-77, 2003.

ABSTRACT

Exercise has been indicated in the treatment of diabetes mellitus and its metabolic complications, but the mechanisms involved in this intervention are not completely known. Researches with animal models offer a great opportunity to further study this issue. However, some results are challenged due the lack of information about the intensity of the effort performed by the animal during exercise. Therefore, the present study was designed to analyse the effects of physical training at the intensity of the aerobic-anaerobic transition (determined by the lactate minimum test or the maximal lactate steady state test), on muscle metabolism of proteins and glucose and on the endothelial function in alloxan diabetic rats. For this purpose, 3 separated sets of experiments were performed. Adult Wistar rats received monohydrated alloxan from Sigma (30 mg/Kg of body weight, i.v.). As controls were used vehicle-injected (citrate buffer) rats. Two weeks after drug application, the animals performed tests to determine the aerobic-anaerobic transition exercise intensity, and then, part of the animals were submitted to swimming training 1h/day, 5 days/weeks, with an overload equivalent to the aerobic-anaerobic transition, during 6-8 weeks. The animals were evaluated "in vivo" for glucose tolerance and sacrificed for material collection aiming "in vitro" analyses on soleus muscle: glucose uptake and oxidation, glycogen synthesis, lactate production, protein synthesis and degradation; and on aorta artery: endothelial function through vascular reactivity to acetylcholine and sodium nitroprussiate. All assessments occurred 48 hours after exercise. In general, we observed improvements on glucose tolerance and on glucose and protein metabolism in isolated soleus muscle, as well as improvements in the endothelial function in the exercised diabetic animals. Besides, both protocols used for exercise intensity determination were sensitive to the physiological

alterations caused by diabetes and revealed an impairment of the aerobic capacity of the diabetic animals already at an early stage of the experiments.

APÊNDICE 1

RELATÓRIO DE DOUTORADO SANDUÍCHE

ESTÁGIO REALIZADO NA UPPSALA UNIVERSITY, SOB SUPERVISÃO DO
PROF. DR. ERIK GYLFE



UPPSALA
UNIVERSITET

DEPARTMENT OF MEDICAL CELL BIOLOGY

REPORT

FFP-18: a calcium indicator for measuring calcium near membrane

FURA-2FF: a lower affinity calcium indicator

Zinc and calcium oscillations

CAMILA A. M. OLIVEIRA

**UPPSALA – SWEDEN
2006/2007**

**FFP-18: A CALCIUM INDICATOR
FOR MEASURING CALCIUM NEAR
MEMBRANE**

INTRODUCTION

Ca^{2+} -sensitive processes at cell membranes involved in contraction, secretion, and neurotransmitter release are activated by Ca^{2+} concentrations 10-100 times higher than the average cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) measured during stimulation in intact cells. This paradox might be explained if the local $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at the cell membrane is much higher than in the rest of the cell. Soluble Ca^{2+} indicators, which indicate spatially averaged $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cannot resolve these localized, near-membrane $[\text{Ca}^{2+}]$ signals (Vorndran et al. 1995, Etter et al. 1996).

The relatively new Ca^{2+} indicator, FFP-18, was designed to selectively monitor near-membrane $[\text{Ca}^{2+}]$. FFP-18 is an analogue of Fura-2 (see Fig 1) with a 12-carbon hydrophobic tail that partitions into the cell membrane and a positively charged piperazine moiety between the tail and the Fura-2 moiety, which aids in binding to membrane phospholipids and thereby prevents the calcium-binding portion of the indicator from being pulled into the membrane. It has a lower Ca^{2+} affinity (K_d 400 nm) and is more water soluble than previously used membrane-associating Ca^{2+} indicators (Vorndran et al. 1995, Etter et al. 1996). This indicator has been successfully used to monitor rapid changes in the sub-plasma-membrane $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in a variety of cell types, such as astrocytes (Golovina 2005), myofibers (Han et al. 2006), neutrophils (Davies & Hallet 1996) and endothelial cells (Graier et al. 1998).

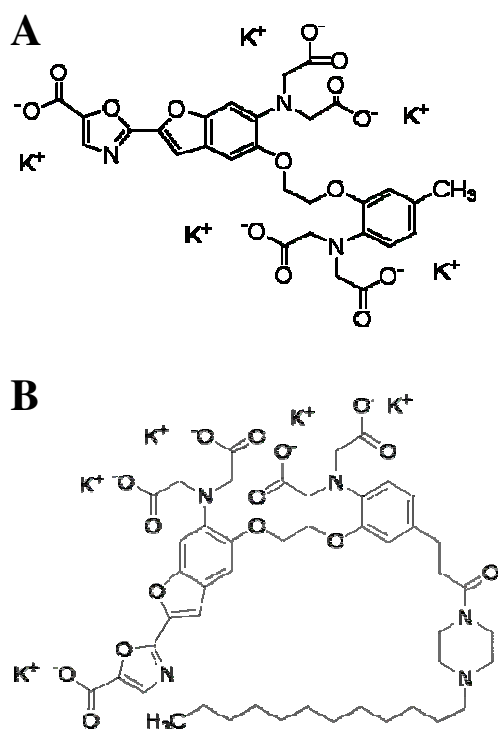


FIGURE 1 Structure of a Fura-2 pentapotassium salt molecule (A) and its lipophilic analogue FFP-18 (B).

Some physical properties of FFP-18 are described in Table 1 (modified from Vorndran et al. 1995). It's possible to see that both peak absorption and peak emission, either in a calcium bound or free anion situation are basically the same for FFP-18 and Fura-2. An important advantage of FFP-18 over Fura-2 is its higher K_d (400 vs 224 nM), allowing measurements of higher calcium concentration. Nevertheless, Vorndran et al. (1995) have observed truncated calcium peaks, suggesting that also FFP-18 may saturate during transients. If so, analogues of FFP-18 with lower calcium affinity may be required to accurately track these high Ca^{2+} levels close to the membrane. FFP-18

has a higher affinity for Mg^{2+} but it is sufficiently low to make Mg^{2+} interference unlikely. The fluorescence quantum efficiency is very similar between the two dyes.

TABLE 1 Physical properties of FFP18

Dye	Peak absorption wavelength (nm)		Peak emission wavelength (nm)		Calcium K_d (nM)		Magnesium K_d (mM)		Fluorescence quantum efficiency	
	Ca bound	Free anion	Ca bound	Free anion	20°C	37°C	20°C	37°C	Ca bound	Free anion
FFP18	335	364	490	502	331* (510) [†]	415 [‡] (400) [‡]	6.8	3.3	0.46	0.25
fura-2	336	364	505	510	161*	224**	9.8**	5.6**	0.49**	0.23**

*100 mM KCl, 10 mM MOPS, pH 7.3, 20°C. Apparent K_d of CaEGTA was 95.4 nM.

[‡]130 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM free $MgCl_2$, 10 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid (MOPS), pH 7.05, 37°C. Apparent K_d of CaEGTA used was 214 nM with an apparent K_d for MgEGTA of 8.96 mM.

[‡]130 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM free $MgCl_2$, 10 mM MOPS, pH 6.9, 37°C. Apparent K_d of CaEGTA used was 423 nM with an apparent K_d for MgEGTA of 14.7 mM.

[†]FFP18 was adsorbed to liposomes, which were then pelleted and resuspended in 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.2, and titrated at 20°C.

[‡]FFP18 was adsorbed to liposomes, which were then pelleted and resuspended in 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.2, and titrated at 37°C.

**Data from Grynkiewicz et al. (1985).

METHODOLOGY

Cells

Pancreatic beta-cells were obtained from *C57/bl* mice. Islets of Langerhans were collagenase-isolated from pieces of pancreas and free cells were prepared by shaking the islets in a Ca^{2+} -deficient medium (Lernmark 1974).

Loading process

Both FFP-18 and Fura-2 were loaded as acetoxymethyl (AM) esters. FFP-18AM passes the plasma membrane through a flip-flop process that is slower than the diffusion of Fura-2AM (Golovina 2005), requiring a longer loading time for FFP-18. We therefore started loading for 2 hours, then gradually reduced the loading time to 1.5 h, 1 h and finally 45 minutes, which is the same time that we used for Fura-2AM. The shortest loading gave a good signal and was therefore used for all subsequent

experiments. This loading time is the same as recently used for myofiber (Han et al. 2006). However, it should be checked in the future how much of the indicator that is facing the outside of the cells. This can be done by applying Ni^{2+} that is impermeable to the cell membrane and quenches the dye fluorescence. If some dye is facing the outside, it may be corrected by adjusting loading time (see Davies & Hallet 1996).

Based on literature (Davies & Hallet 1996, Graier et al. 1998, Golovina 2005, Han et al. 2006) we tested concentrations of FFP-18AM ranging from 5 μM to 0.5 μM . Since all concentrations were effective, the lowest one, 0.5 μM , was selected for all subsequent experiments. In short, cells were loaded for 45 minutes with either 0.5 μM FFP-18AM or 0.5 μM Fura-2AM.

Calibration

In some previous studies using FFP-18 the Ca^{2+} signal was not calibrated and results simply presented as 340/380 nm fluorescence excitation ratios (510 nm emission) (Graier et al. 1998, Golovina 2005). However, Han et al. (2006) made a calibration according to Grynkiewicz et al. (1985) to determine R_{min} , R_{max} and β values *in vitro*, using solutions approximating the intracellular environment with respect to pH and ionic strength. In another study, patch clamped cells were loaded with FFP-18 salt through the patch pipette and permeabilized by hyperpolarizations to – 250 mV or brief treatments with β -escin to perform *in situ* calibration by varying the extracellular calcium concentration (Etter et al. 1996). Two different calibration protocols were tested in the present study:

***In vitro* calibration:**

In vitro calibration was performed for FFP-18 using its pentapotassium salt dissolved at 100 μM in calcium free or calcium saturated solution (see composition below). The measurements were made on small droplets of the two solutions to determine $R_{\min}$, $R_{\max}$ and β - according to according to Grynkiewicz et al. (1985). The composition of the solutions for calibration were as follows:

Ca²⁺ Saturated (Ca²⁺ Sat) – KCl 115 mM, NaCl 20 mM, MOPS 10 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 1.20 mM, CaCl₂ 10 mM.

Ca²⁺ Free – KCl 115 mM, NaCl 20 mM, MOPS 10 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 1.20 mM. The pH was adjusted to 7.00 with KOH.

TABLE 2 Fluorescence intensities at 340 and 380 nm in *Ca²⁺ Free* and *Sat* solutions and β value during in vitro calibration with FFP-18 K⁺ salt.

	Intensity at 340 nm		Intensity at 380 nm		β
	<i>Ca²⁺ Free</i>	<i>Ca²⁺ Sat</i>	<i>Ca²⁺ Free</i>	<i>Ca²⁺ Sat</i>	
Calib 1	953	1708	1885	244	7.73
Calib 2	841	1488	1691	205	8.23
Calib 3	873	1481	1749	201	8.66
Calib 4	818	1159	1648	140	11.74
Calib 5	811	1234	1633	161	10.29
Calib 6	829	1177	1663	143	11.61
Calib 7	847	865	1703	92	18.45
Calib 8	1051	952	1951	165	12.08
Calib 9	1261	1266	2141	199	10.97
Calib 10	1296	1193	2151	188	11.42

Table 2 shows a series of successive calibrations performed within 2 hours with the same *Ca²⁺ Free* and *Ca²⁺ Sat* solutions. From calibration 1 to calibration 7 there was a decrease in fluorescence intensity at both 340 and 380 nm in *Ca²⁺ Free* as well as *Ca²⁺ Sat* solutions, and an increase in β . The decrease was greater in the *Ca²⁺ Sat* solution at both wavelengths. According to Etter et al. (1996), lipophilic fluorescent indicators tend to aggregate in solution and when their fluorophores come close enough to interact the fluorescence is quenched. This occurs more easily in the presence of Ca^{2+} because Ca^{2+} neutralizes the tetraanionic indicator charges that otherwise would repel

other FFP-18 molecules. The FFP-18 concentration used in the present calibration (100 μM) may be too high since Vorndran et al. (1995) found that FFP-18 aggregates at concentrations above 50 μM . Thus, lower concentration of FFP-18 should be tested in future calibrations.

***In situ* calibration**

FFP-18 is very sensitive to environmental changes, and some alterations in its physical properties occurs depending on whether the indicator is in aqueous solution or bound to lipid membranes (see Table 1 and Vorndran et al. 1995, Etter et al. 1996). An *in situ* calibration in living cells is therefore preferable to *in vitro* calibration.

FFP-18 K⁺ salt

We first tried the *in situ* calibration using the pentapotassium salt form of FFP-18 (1 and 10 μM). The salt should not enter cells but the lipid tail is expected to bind to the plasma membrane with the Ca^{2+} -chelating carboxyles facing the exterior. Such cells could be exposed to an intracellular like medium (ICM) allowing simple alterations of the calcium concentration to obtain R_{max} , R_{min} and β . However this approach did not work because there was little indicator binding to the membrane.

We therefore loaded cells with FFP-18AM assuming that the indicator would bind to the membrane with the carboxyles facing the cytoplasm. In this situation we used alpha toxine to permeabilize the cells and control the cytoplasmic calcium concentration with extracellular calcium and EGTA.

Figure 2 shows an example of a successful calibration. In a calcium free solution, cells were exposed to alpha toxine. As cells started to become permeabilized,

the medium was changed to ICM. R_{max} was determined by the addition of 10 mM Ca^{2+} in the presence of 10 mM EGTA and R_{min} was determined in the continued presence of EGTA but absence of calcium. We found an R_{max} value of 1.68 and R_{min} value of 0.50, which is reasonable since R_{min} is below the basal level (0.67). However, the most frequent result observed during *in situ* calibration with FFP-18AM was a decrease

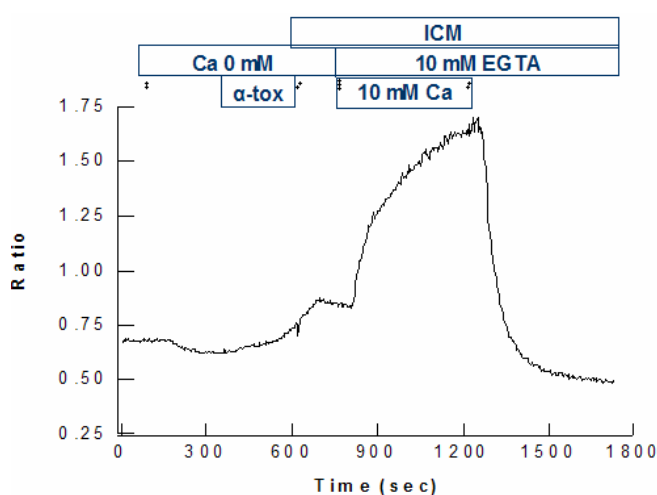


FIGURE 2 *In situ* calibration with FFP-18AM. Ratio of excitation fluorescence intensities at 340 and 380 nm (510 nm emission).

in both 340 and 380 nm fluorescence intensities after alpha toxin application, as illustrated in Figure 3, indicating that the dye is leaking from the permeabilized cells. This is a clear indication that the dye is not attached to the plasma membrane (PM). A possible explanation might be breakdown of the lipid tail as suggested by the manufacturer.

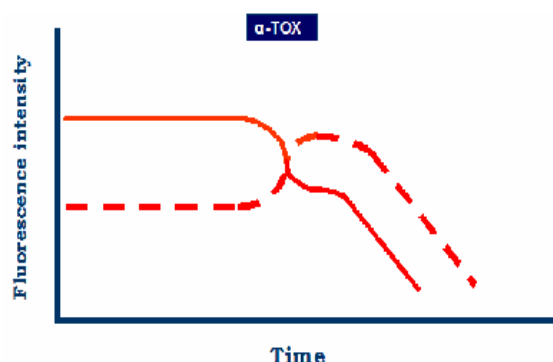


FIGURE 3 Scheme illustrating fluorescence intensities behaviour after alpha toxin application during *in situ* calibration with FFP-18AM in pancreatic beta-cells. Wavelengths (nm): ---- 340, ——— 380.

Dye Localization

Since the most important characteristic of FFP-18 is its property to bind to the PM to detect submembrane calcium oscillations, it is essential to verify whether the dye is correctly located. In a study of Etter et al. (1996) with smooth muscle cells, images of the intracellular distribution of FFP18 showed that the dye also binds to the nuclear membrane but they estimated that at least 65% is located to or near the plasma membrane. It is also possible that some FFP-18 inserts into the endoplasmic reticulum (ER) membrane, mainly facing the space between the PM and ER (Golovina 2005).

We used confocal microscopy to assess localization of FFP-18 and Fura-2. Unexpectedly, FFP-18 seems to distribute throughout cell and not only to the plasma membrane in pancreatic beta cells (see Figure 4). This finding and the observation that FFP-18 leaks from permeabilized cells indicate that the dye is not located in the plasma membrane. Note in the upper panel of Figure 4 that Fura-2AM is not restricted to the cytoplasm but occurs in a higher concentration in the nucleus.

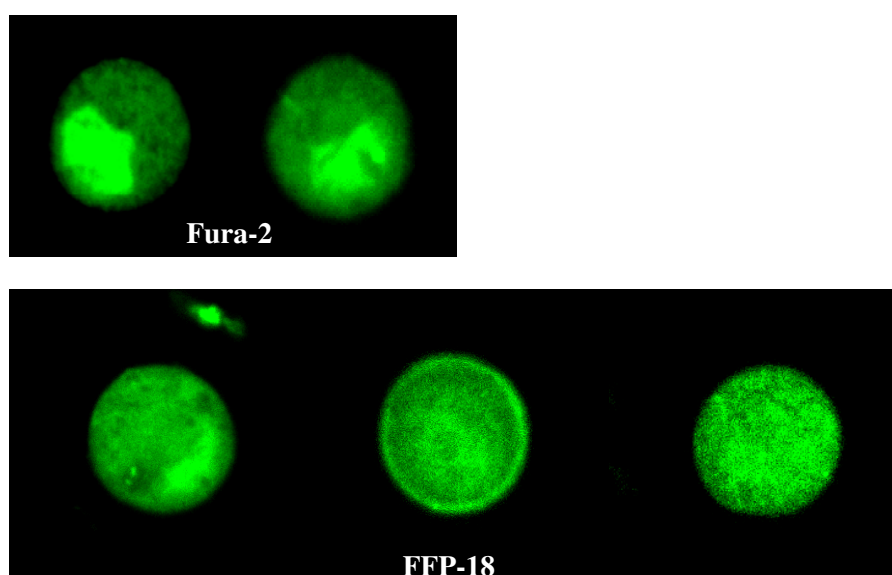


FIGURE 4 Confocal images of Fura-2 and FFP-18 loaded beta-cells. Pancreatic beta cells were loaded with either 0.5 μM of fura-2 or FFP-18 during 45 min incubation.

FFP-18 has previously been found to be distributed throughout the cytoplasm in myotubes, but restricted to the plasma membrane in myofibers (Han et al. 2006). Since the myotubes and myofibers were studied with the same batch of dye it is unlikely that breakdown of the dye causes the differences in distribution. Myotubes are reported to have zones of very high endocytotic activity, raising the possibility that the FFP-18 may have been internalised by endocytotic processes. Another possibility is that myotubes, and perhaps beta cells, contain enzymes that breakdown the lipid tail.

RESULTS

Recent studies comparing calcium signals reported by fura-2 and FFP-18 under the same experimental conditions show dramatic differences in magnitude and kinetics. There are larger (micromolar) and faster increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ directly beneath the plasma membrane than in the bulk of the cytoplasm, which may explain how numerous Ca^{2+} -

sensitive membrane processes are activated although average $[Ca^{2+}]_i$ changes seem too small (Etter et al. 1996). In porcine endothelial cells, a small or slow IP_3 formation evoked a sub-plasmalemmal Ca^{2+} elevation detected by FFP-18, due to vectorial Ca^{2+} release from the superficial ER towards the plasmalemma. Such Ca^{2+} increase was not detected with calcium dyes determining bulk $[Ca^{2+}]_i$ (Graier et al. (1998).

Based on the FFP-18 property to measure $[Ca^{2+}]$ near the plasma membrane we had the idea that this indicator would see relatively little of an increase in $[Ca^{2+}]_i$ after release of Ca^{2+} from intracellular stores since that would result in a rather even increase throughout the cytoplasm. However, FFP-18 would be better at detecting store-operated influx of Ca^{2+} through the plasma membrane that accompanies the release of Ca^{2+} from the stores. Fura-2 on the other hand would be better at detecting intracellular release than store-operated influx due to its cytoplasmic localization. In this way, the ratio between the $[Ca^{2+}]_i$ peak after emptying intracellular stores and the subsequent sustained increase of $[Ca^{2+}]_i$ due to store-operated influx should be smaller when using FFP-18 than Fura-2. We have tested this hypothesis by exposing individual beta-cells to 100 μM Ca^{2+} -mobilizing carbachol. These experiments were done in hyperpolarizing medium containing 250 μM diazoxide to prevent voltage-dependent Ca^{2+} influx and 20 mM glucose to ascertain that the intracellular stores were initially filled with Ca^{2+} . Indeed, Fig. 6 shows that when $[Ca^{2+}]_i$ is expressed as 340/380 nm fluorescence excitation ratio, the peak/sustained ratio response to carbachol was lower in FFP-18 loaded (5.1 ± 1.5 ; $n=9$) than in Fura-2 loaded (9.30 ± 2.60 ; $n=9$; $P<0.01$) cells. Moreover, the peak response to carbachol reported by Fura-2 was similar to the response to depolarization with 30 mM

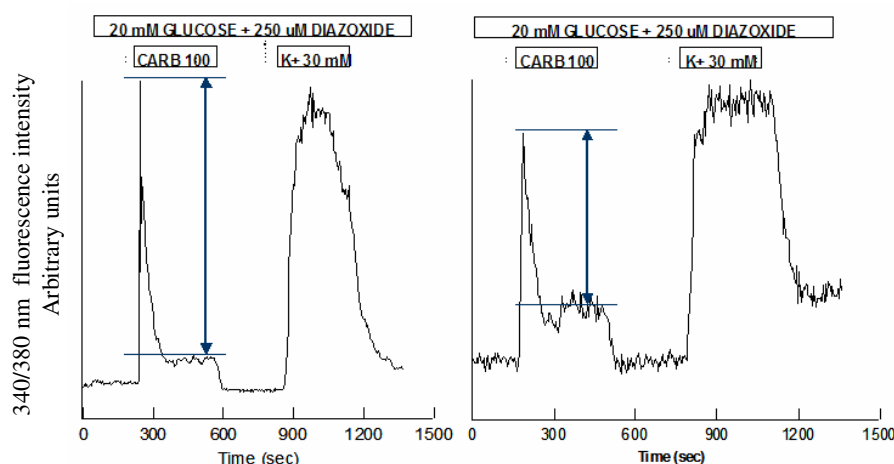


FIGURE 6 Effect of carbachol on elevation of $[Ca^{2+}]$ due to calcium release from ER and store-operated influx of Ca^{2+} , and voltage-dependent calcium influx due to K^+ depolarization in individual beta-cells. Pancreatic beta-cells were loaded with Fura-2 (A) or FFP-18 (B) in hyperpolarizing medium containing 250 μM diazoxide, 20 mM glucose and 1.28 mM Ca^{2+} . The presence of 100 μM carbachol (CARB) and 30 mM K^+ are indicated by the lower bars. Ratio of fluorescence intensities at 340 nm and 380 nm wavelength (510 nm emission).

K^+ , whereas FFP-18 reported a lower peak response to carbachol than depolarization. Although these data support the view that FFP-18 preferentially reports membrane associated Ca^{2+} the observation that FFP-18 leaked from the cells indicated that a considerable fraction of the dye is in the cytoplasm. Another problem is that these assumptions are based on 340/380 nm fluorescence excitation ratios, which without calibration show a complex relationship to the Ca^{2+} concentration.

CONCLUSION

FFP-18 has been found to be located to the plasma membrane with only small amounts in nuclear and ER membranes in different types of cells (Etter et al. 1996, Golovina 2005). The indicator may therefore be used to specifically monitor $[Ca^{2+}]_i$ under the membrane of importance for secretion and other processes. The present study showed that there are also problems with FFP-18 with regard to its actual localization

and calibration of the fluorescence signal. It is unclear whether the encountered difficulties depended on the specific batches of indicator used or if the studied beta-cells interfere by breaking down the lipophilic tail that anchors the indicator to membranes. The elucidation of these matters will require further study.

REFERENCES

Davies EV & Hallett. Near membrane Ca^{2+} changes resulting from store release in neutrophils: detection by FFP-18. *Cell Calcium*. 19(4):355-362, 1996.

Etter EF, Mintat A, Poeniet M & Fay FS. Near-membrane $[\text{Ca}^{2+}]$ transients resolved using the Ca^{2+} indicator FFP18. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5368-5373, 1996.

Golovina VA. Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J. Physiol.* 564(3):737-749, 2005.

Graier WF, Paltauf-Doburzynska J, Hill BJF, Fleischhacker E, Hoebel BG, Kostner GM & Sturek M. Submaximal stimulation of porcine endothelial cells causes focal Ca^{2+} elevation beneath the cell membrane. *J. Physiol.* 506(1):109-125, 1998.

Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260(6):3440-3450, 1985.

Han R, Grounds MD, Bakker AJ. Measurements of sub-membrane $[Ca^{2+}]$ in adult myofibers and cytosolic $[Ca^{2+}]$ in myotubes from normal and mdx mice using the Ca^{2+} indicator FFP-18. *Cell Calcium*. 40:299-307, 2006.

Lernmark, Å. The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 10:431–438, 1974.

Vorndran C, Minta A & Poenie M. New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes. *Biophys. J.* 69:2112-2124, 1995.

FURA-2FF: A LOW AFFINITY CALCIUM INDICATOR

INTRODUCTION

Demonstrations that the cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) can reach levels as high as 100 mM have sparked interest in fluorescent calcium indicators with lower affinity than the most commonly used indicators, such as Fura-2 and Indo-1 (Hyrc et al. 2000). Fura-2FF is a relatively new low-affinity derivative of Fura-2, modified by the addition of two fluorines on the BAPTA moiety (Fig. 1B). It has gained great popularity and has been used to measure high $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in many cell systems (Hyrc et al. 2000). Fura-2FF has high specificity, wide dynamic range, and lower pH sensitivity than others low affinity calcium dyes, such as Mag-Fura-2 and BTC, and is an optimal low-affinity Ca^{2+} indicator for most imaging applications (Hyrc et al. 2000).

Table 1 (from Hyrc et al. 2000) shows some physical properties of the low affinity calcium indicators Mag-Fura-2, Fura-2FF and BTC. Fura-2FF has a higher K_d for both calcium and magnesium when compared to Fura-2 (see Grynkiewicz et al. 1985), which allows measurements of much higher Ca^{2+} concentration without interference from Mg^{2+} .

Table 1 Apparent dissociation constants (K_d) and relative ratio changes $R_{\text{max}}/R_{\text{min}}$ of low-affinity calcium indicators upon binding selected divalent cations

Indicator (1)	Excitation (nm) (2)	Calcium		Magnesium		Zinc	
		K_d (3)	$R_{\text{max}}/R_{\text{min}}$ (4)	K_d (5)	$R_{\text{max}}/R_{\text{min}}$ (6)	K_d (7)	$R_{\text{max}}/R_{\text{min}}$ (8)
Mag-Fura-2	340/380	20±2 μM (3)	~25	2±0.4 mM (4)	~11.0	11±5 nM (2)	~8.0
Fura-2FF	340/380	6±1 μM (6)	~24	13±2 mM (2)	~1.1	12±1 nM (2)	~7.1
BTC	400/485	12±1 μM (9)	~11	16±2 mM (3)	~1.2	19±5 nM (3)	~15*

Columns (1) and (2) list the indicators compared in this article and their excitation wavelengths, respectively. Columns (3), (5) and (7) list the indicator's in-vitro dissociation constants for Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} determined in a 90 mM K⁺/10 mM MOPS solution, pH=7.2, at room temperature. The presented data are means ± SD and the number of experiments. Columns (4), (6) and (8) contain the relative changes in indicator's ratio determined at proper excitation wavelengths (2) in divalent cation-free buffer (R_{min}) containing 10 mM EGTA and in the presence of saturating concentrations (R_{max}) of Ca^{2+} (1 mM), Mg^{2+} (33 mM), Zn^{2+} (1 μM) at pH=7.2

*: in the case of Zn^{2+} , we ratioed fluorescence excited at Zn^{2+} sensitive (400 nm) and insensitive (495 nm) wavelengths.

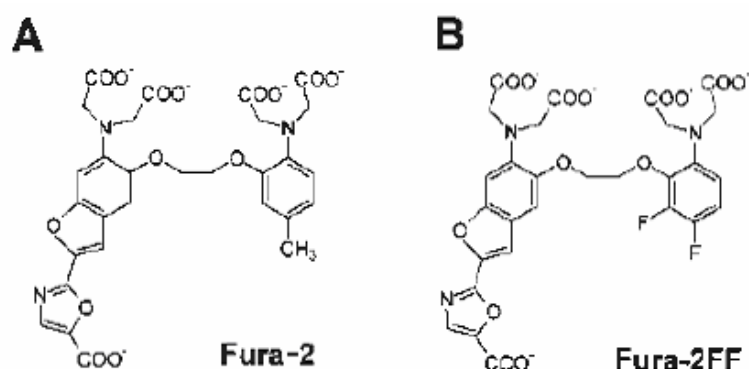


Fig. 1 The chemical structures of Fura-2 (A) and its low-affinity counterpart Fura-2FF (B).

METHODOLOGY

Cells

Pancreatic beta-cells were obtained from *C57/bl* mice. Islets of Langerhans were collagenase-isolated from pieces of pancreas and free cells were prepared by shaking the islets in a Ca^{2+} -deficient medium (Lernmark 1974).

Loading

Fura-2 and Fura-2FF were loaded as acetoxymethyl (AM) esters. Cells were loaded for 45 minutes with either 0.5 μM Fura-2AM or 0.5 μM Fura-2FFAM .

Calibration

In vitro calibration was performed for Fura-2FF using its pentapotassium salt dissolved at 50 μM in calcium free or calcium saturated solution (see composition below). The measurements were made on small droplets of the two solutions to determine $R_{\min}$, $R_{\max}$ and β according to Gryniewicz et al. (1985). The

calcium saturated solution lacking indicator was used as blank. The composition of the solutions for calibration was as follows:

Ca^{2+} Saturated (*Sat*) – KCl 115 mM, NaCl 20 mM, MOPS 10 mM, EGTA 5 mM, $MgCl_2$ 1.20 mM, $CaCl_2$ 10 mM.

Ca^{2+} Free (*Free*) – KCl 115 mM, NaCl 20 mM, MOPS 10 mM, EGTA 5 mM, $MgCl_2$ 1.20 mM. The pH was adjusted to 7.00 with KOH.

TABLE 2 Fluorescence intensities at 340 and 380 nm excitation wavelength (510 nm emission) for *Free* (Ca^{2+} *Free*) and *Sat* (Ca^{2+} *Sat*) solutions, beta, R_{min} and R_{max} for two solutions with the same composition but prepared at different time (A and B).

	Intensity at 340 nm		Intensity at 380 nm		β	R_{min}	R_{max}
	Ca^{2+} <i>Free</i>	Ca^{2+} <i>Sat</i>	Ca^{2+} <i>Free</i>	Ca^{2+} <i>Sat</i>			
Cal 1A	798.407	1847.956	1699.447	163.650	10.385	0.470	11.341
Cal 2A	910.397	1984.833	1899.787	189.361	10.033	0.479	10.517
Cal 3A	817.737	1902.975	1737.950	171.735	10.120	0.470	11.126
Cal 4A	863.242	1980.270	1820.561	231.488	7.865	0.474	10.107
mean A	745.957	1611.207	1507.549	227.247	9.600	0.473	10.773
Cal 1B	1081.541	2007.605	2100.728	200.339	10.486	0.515	10.052
Cal 2B	834.101	1843.247	1767.124	164.428	10.747	0.472	11.254
Cal 3B	781.792	1861.331	1671.359	168.548	9.916	0.468	11.085
Cal 4B	866.033	2018.958	1817.025	203.160	8.944	0.476	9.969
Cal 5B	830.911	1965.605	1757.795	190.234	9.240	0.473	10.368
mean B	878.876	1939.349	1822.806	185.342	9.867	0.481	10.546
mean AB	812.416	1775.278	1665.178	206.295	9.748	0.477	10.647

Table 2 shows two series of successive calibrations performed on the same day with Ca^{2+} *Free* and Ca^{2+} *Sat* solutions prepared separately (A and B). The data obtained for R_{min} , R_{max} and β were reproducible both within and between the two calibration series and the calibration must be regarded as successful.

RESULTS

Figure 1 shows for the $[Ca^{2+}]_i$ response to carbachol in Fura-2 and Fura-2FF loaded pancreatic beta-cells. Hyperpolarizing medium containing 250 μ M diazoxide was used to prevent voltage-dependent Ca^{2+} influx and 20 mM glucose to ascertain that the intracellular stores were initially filled with Ca^{2+} . When 100 μ M carbachol was applied to Fura-2 loaded beta-cells in the absence of extracellular Ca^{2+} there was a pronounced $[Ca^{2+}]_i$ peak but no sustained increase (Figure 1A). In this situation addition of 5 mM Ca^{2+} induced a sustained elevation of $[Ca^{2+}]_i$ due to store-operated Ca^{2+} influx. In principle no major difference in basal $[Ca^{2+}]_i$ levels should be expected when using Fura-2 and Fura2FF. Nevertheless basal $[Ca^{2+}]_i$ was about 10-fold higher in Fura-2FF loaded cells even when using the lowest reported K_d (4 μ M, Hyrc et al. 2000) for the calculations. This difference would even be 8-fold greater if the highest reported K_d (31 μ M, Hatakeyama et al. 2006) was used. The reason for this discrepancy is unknown but it may be a reason why most data in the literature are presented as fluorescence excitation ratios. Another problem with the Fura2FF recordings was a high noise level. This effect may at least partially be explained by lower loading with Fura2-FF than with Fura-2. A third difficulty was a seeming increase of $[Ca^{2+}]_i$ with time. This phenomenon, which may be associated with loss of indicator from the cell, is sometimes seen also with Fura-2 but was much more pronounced with Fura-2FF. Also Fura-2FF reported the increase of $[Ca^{2+}]_i$ in response to carbachol in Ca^{2+} -free medium. Unexpectedly the low affinity indicator did not report a greater increase over baseline that did fura-2 at least not when using a K_d of 4 μ M (Figure 1B). The rest of the experiment with Fura 2FF in Figure 1B is difficult to interpret. Addition of 5 mM Ca^{2+} in the continued presence

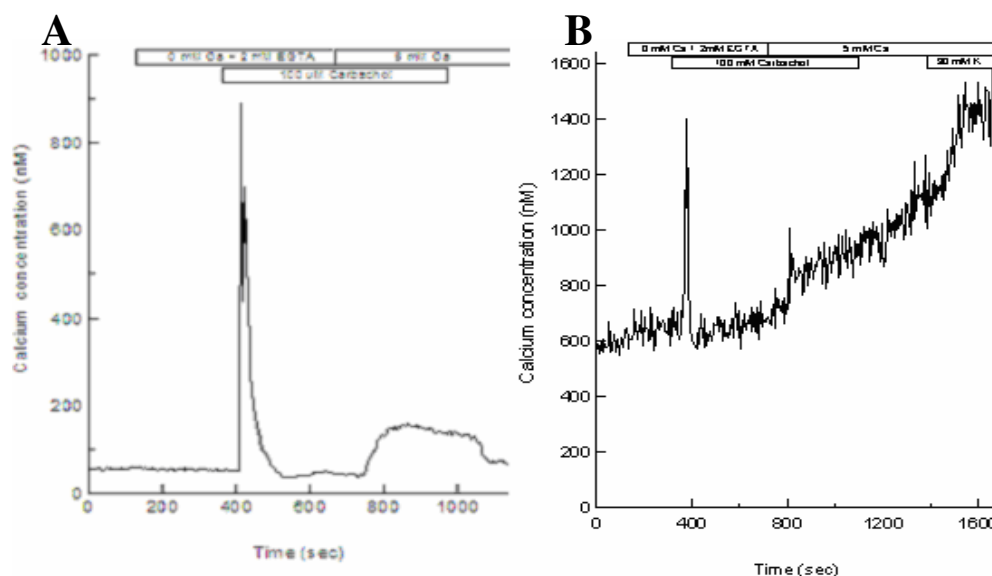


FIGURE 1 Effect of carbachol on elevation of $[Ca^{2+}]_i$ intracellular due to calcium release from ER, store-operated and voltage-dependent calcium influx due to K^+ depolarization in individual beta-cells. Pancreatic beta-cells were loaded with Fura-2 (A) or Fura-2FF (B) in hyperpolarizing medium containing 250 μ M diazoxide and 20 mM glucose that was kept throughout the experiment. The presence of 100 μ M carbachol (CARB) and 30 mM K^+ (30 mM K) are indicated by the lower bars.

of carbachol induced a rise of $[Ca^{2+}]_i$ as expected from store-operated entry. However, unlike the case with Fura-2 there was no decrease upon removal of carbachol and the effect of depolarization with 30 mM K^+ seemed marginal.

CONCLUSION

Although the *in vitro* calibration with Fura-2FF pentapotassium salt was technically successful, the relevance for this calibration for the living beta cell was questionable since the $[Ca^{2+}]_i$ levels were much higher than those reported by Fura-2 also under basal conditions. Fura-2FFAM did not load as well as Fura-2AM, producing a noisy signal. However, the most severe problem with Fura-2FF was the seemingly pronounced increase of $[Ca^{2+}]_i$ with time in all experiments. Future studies have to

clarify whether this effect is somehow related to loss of indicator with incompletely dissociated ester groups.

REFERENCES

Graves TK & Hinkle PM. Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} -Release in the Pancreatic β -Cell: Direct Evidence of Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Release. *Endocrinology*. 144:3565–3574, 2003.

Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260(6):3440-3450, 1985.

Hatakeyama H, Kishimoto T, Nemoto T, Kasai H & Takahashi N. Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in mouse pancreatic islets. *J. Physiol.* 570:271-282, 2006.

Hyrn HL, Brownick JM & Goldberg MP. Ionic selectivity of low-affinity ratiometric calcium indicators: mag-Fura-2, Fura-2FF and BTC. *Cell Calcium*. 27(2):75-86, 2000.

ZINC AND CALCIUM OSCILLATIONS

INTRODUCTION

In pancreatic beta cells, Zn^{2+} is necessary to maintain the crystalline structure of insulin in secretory granules. Zn^{2+} is released together with insulin and has been proposed to exert a negative feedback on hormone release (Dodson & Steiner 1998). This inhibition may result from opening of ATP-sensitive potassium channels (Prost et al. 2004). However, here we investigate whether zinc could somehow interfere negatively with cAMP, which potentiates Ca^{2+} -dependent exocytose of insulin from pancreatic beta-cells (Prentki & Matschinsky 1987).

METHODOLOGY

Cells

Pancreatic beta-cells were obtained from *C57/bl* mice. Islets of Langerhans were collagenase-isolated from pieces of pancreas and free cells were prepared by shaking the islets in a Ca^{2+} -deficient medium (Lernmark 1974).

Loading

Cells were loaded for 45 minutes with 0.5 μM Fura-2AM.

RESULTS

The influence of endogenous Zn^{2+} on beta cell function was studied by chelating this cation with the membrane permeable heavy metal chelator TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine). As seen in Figure 1, TPEN induced pronounced calcium transients on top of the glucose induced slow oscillations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Similar transients are induced by agents raising cAMP (Liu et al. 1996; Yaekura et al. 1996). Accordingly, after omission of TPEN, subsequent inhibition of cAMP

breakdown with IBMX induced similar transients. Since these transients

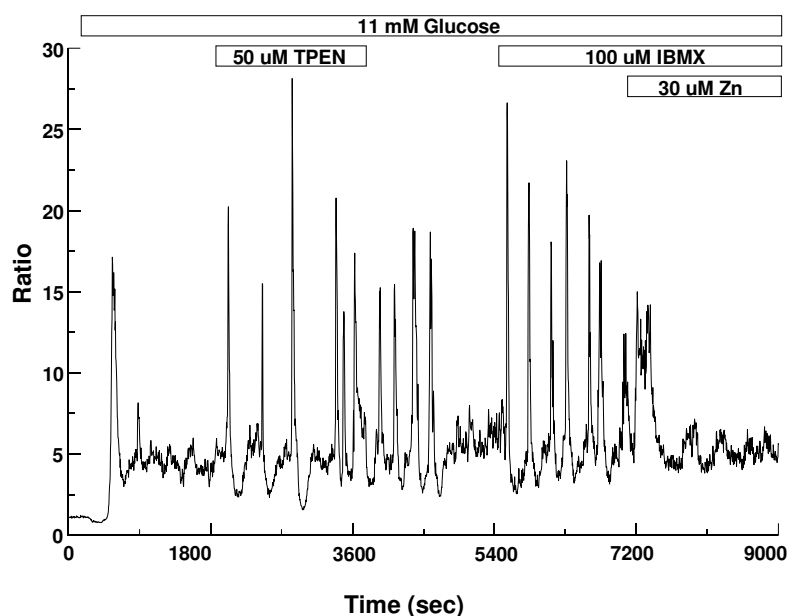


FIGURE 1 Intracellular calcium concentration in pancreatic beta-cells in response to 50 μ M TPEN, 100 μ M IBMX and 30 μ M zinc in the presence of high glucose (11 mM). This figure is not representative of all cells.

disappeared in the presence of 30 mM Zn^{2+} , it seems likely that the initial effect of TPEN was due to chelation of endogenous Zn^{2+} . This view is consistent with an effect of zinc in lowering intracellular levels of cAMP and will be further investigated through the use of inhibitors of adenylate cyclase, such as 2,5 – Dideoxyadenosine.

REFERENCES

Dodson G, Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8(2):189-94, 1998.

Dyachok O, Isakov Y, S  getorp J & Tengholm A. Oscillations of cyclic AMP in hormone-stimulated insulin-secreting beta-cells. *Nature*, 439(7074):349-352, 2006.

Liu YJ, Grapengiesser E, Gylfe E, & Hellman B. Crosstalk between the cAMP and inositol trisphosphate signalling pathways in pancreatic β -cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 334, 295-302, 1996.

Prentki M & Matschinsky FM. Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *FEBS Lett* 220(1):103-7, 1987.

Prost A, Bloc A, Hussy N, Derand R Vivaudou M. Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of KATP channel function. *J. Physiol.* 559(1):157-167, 2004.

Yaekura K, Kakei M & Yada T. cAMP-signaling pathway acts in selective synergism with glucose or tolbutamide to increase cytosolic Ca^{2+} in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 45(3):295-301, 1996.

APÊNDICE 2

ARTIGO PUBLICADO

ARTIGO PUBLICADO NO JOURNAL OF DIABETES AND ITS COMPLICATIONS
REFERENTE AO 1º ESTUDO DESTA TESE

Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats

Camila A.M. de Oliveira^{a,*}, Eliete Luciano^a,
Maria Cristina C.G. Marcondes^b, Maria Alice R. de Mello^a

^aDepartment of Physical Education, Unesp, Rio Claro, SP, Brazil

^bDepartment of Physiology and Biophysics, Unicamp, Campinas, SP, Brazil

Received 22 December 2005; received in revised form 6 June 2006; accepted 22 July 2006

Abstract

The present study was designed to determine the exercise intensity equivalent to the metabolic aerobic/anaerobic transition of alloxan diabetic rats, through lactate minimum test (LMT), and to evaluate the effects of swimming exercise at this intensity (LM) on the glucose and protein metabolism of these animals. Adult male Wistar rats received alloxan (SD, alloxan-injected rats that remained sedentary) intravenously (30 mg kg⁻¹ body weight) for diabetes induction. As controls (SC, vehicle-injected rats that remained sedentary), vehicle-injected rats were utilized. Two weeks later, the animals were submitted to oral glucose tolerance test (oGTT) and LMT. After the tests, some of the animals were submitted to swimming exercise training [TC (vehicle-injected rats that performed a 6-week exercise program) and TD (alloxan-injected rats that performed a 6-week exercise program)] for 1 h day⁻¹, 5 days week⁻¹, with an overload equivalent to LM determined by LMT, for 6 weeks. At the end of the experiment, the animals were submitted to a second LMT and oGTT, and blood and skeletal muscle assessments (protein synthesis and degradation in the isolated soleus muscle) were made. The overload equivalent to LM at the beginning of the experiment was lower in the SD group than in the SC group. After training, the overload equivalent to LM was higher in the TC and TD groups than in the SC and SD groups. The blood glucose of TD rats during oGTT was lower than that of SD rats. Protein degradation was higher in the SD group than in other groups. We conclude that LMT was sensitive to metabolic and physiologic alterations caused by uncontrolled diabetes. Training at LM intensity improved aerobic condition and the glucose and protein metabolism of alloxan diabetic rats.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Alloxan; Aerobic/anaerobic transition; Diabetes; Lactate minimum test; Rats; Swimming exercise

1. Introduction

Type 1 diabetes or insulin-dependent diabetes mellitus is a multifactorial autoimmune disease whose susceptibility is determined by a combination of genetic and environmental factors (Rossini, 2004). In this type of diabetes, T-cell-mediated destruction of pancreatic insulin-secreting cells (β cells) occurs. This autoimmune destructive process leads

to severe insulin depletion, which results in chronic hyperglycemia (Brownlee, 2001).

High blood glucose levels are toxic, causing serious microvascular and macrovascular damages. Therefore, diabetes is a leading cause of blindness, end-stage renal disease, atherosclerotic macrovascular disease, and a variety of debilitating neuropathies, reducing patients' quality of life and life expectancy (Eizirik 1995; Kelly, Rayner, Mijovic, & Barnett, 2003).

Animal models of diabetes have been used for a long time and allow a deeper assessment of the causes and consequences of diabetes, which are of great importance toward a better understanding of this pathology (Rossini, 2004). Studies with these models have demonstrated that

* Corresponding author. Departamento de Educação Física, IB, UNESP, Av. 24A, 1515, Rio Claro, SP CEP 13.506-900, Brazil. Tel.: +55 19 35264307; fax: +55 19 35260009.

E-mail address: camo@rc.unesp.br (C.A.M. de Oliveira).

physical activity counteracts disease complications, preventing cardiac dysfunctions (Villanueva, Poirier, Standley, & Broderik, 2003) and improving glucose tolerance and homeostasis (Luciano & Mello, 1998; Tancrède, Rousseau-Mignerot, & Nadeau, 1982). Despite this, the study of the metabolic effects of exercise on rats is frequently questioned due to lack of information about the intensity of effort exerted by animals during exercise.

The determination of aerobic/anaerobic transition (the highest exercise intensity at which blood lactate concentration does not increase beyond the initial transient value during constant-load exercise) (Tegtbur, Busse, & Braumann, 1993), which is also referred to as anaerobic threshold or lactate threshold, is a useful tool to evaluate effort intensity as a value of reference. It is used to measure the effectiveness of training (the higher is the threshold, the greater is the endurance capacity) and can also be used in clinical studies (Pilis et al., 1993). For this reason, recently in our laboratory, we established a protocol to determine the intensity of effort equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition during swimming exercise in rats (Voltarelli, Gobatto, & Mello, 2002), based on lactate minimum test (LMT) (Tegtbur et al., 1993). The application of this test to diabetic animals would enable a more precise analysis of the metabolic effects of exercise on these animals since exercise intensity would be known.

Hence, the aims of the present study were: (a) to identify the effort intensity equivalent to the aerobic/anaerobic metabolic transition (LM) of alloxan diabetic animals through LMT; (b) to verify if this test is sensitive to severe metabolic and physiological alterations imposed by diabetes and to alterations of aerobic condition caused by swimming training at the individual LM overload; and (c) to evaluate the effects of swimming exercise at the intensity equivalent to LM on glucose and protein metabolism.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The studies were carried out on adult (90-day-old) male Wistar rats, maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ on a 12-h light–dark cycle, with free access to standard rat chow and water. All experiments were performed in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Council of Europe no. 123, Strasbourg, 1985).

2.2. Diabetes induction

The rats intravenously received alloxan monohydrate (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.01 M citrate buffer (pH 4.5) at 30 mg kg^{-1} body weight after a 16-h fast (Luciano & Mello, 1998). As controls, same-age vehicle-injected (citrate buffer) rats were utilized.

Animals presenting with a fasting glucose level of 126 mg dl^{-1} or higher 2 weeks after alloxan administration were considered diabetic (in accordance with American Diabetes Association, 2005). Blood glucose level was determined by the glucose oxidase method (Laborlab Kit).

2.3. Experimental groups

Animals were randomly divided into four groups: SC=vehicle-injected rats that remained sedentary; TC=vehicle-injected rats that performed a 6-week exercise program; SD=alloxan-injected rats that remained sedentary; TD=alloxan-injected rats that performed a 6-week exercise program.

2.4. Body weight, food intake, and water intake

All animals had their body weight, food intake, and water intake recorded once a week during the experiment in order to characterize their diabetic conditions. Results are shown as area under the curve, calculated by the trapezoidal method (Mathews, Altman, Campbell, & Royston, 1990) with the software ORIGIN 6.0 (1999).

2.5. Oral glucose tolerance test (oGTT)

oGTT was performed 2 weeks after alloxan administration and after the 6-week training period. After a 15-h fasting, glucose solution (80%) was administered at the final dose of 2.0 g kg^{-1} body weight into the stomach of rats through a gastric catheter. Blood samples ($25 \mu\text{l}$) for serum glucose determination were collected before (T_0), 30 min after (T_{30}), 60 min after (T_{60}), and 120 min after (T_{120}) the administration of glucose solution. All blood samples were taken with graded capillary tubes from a cut at the tip of the tail. Blood glucose level was determined by the glucose oxidase method (Laborlab Kit). Results are shown as area under the blood glucose curve during oGTT, calculated by the trapezoidal method (Mathews et al., 1990) with the software ORIGIN 6.0 (1999).

2.6. LMT

The incremental exercise test protocol employed was based on LMT for human subjects (Jones & Doust, 1998; Tegtbur et al., 1993), as adapted to rats (Voltarelli et al., 2002). LMT consisted of a short period of supramaximal exercise to induce hyperlactemia before the start of an incremental exercise test. In order to produce hyperlactemia, the rats were induced to jump into the water for 6 min (30-s exercise interrupted by 30-s rest), carrying a load (lead fish sinkers strapped to the chest) of 50% of their body weight into a cylinder tank 50 cm deep, 25 cm diameter, and filled with water at a temperature of $31 \pm 1^\circ\text{C}$. After a 9-min recovery interval, blood samples were collected for lactate measurements. Then, the rats were submitted to a 25-min incremental

swimming test. The initial load (lead fish sinkers strapped to the chest) was 4.5% of body weight in the control group and 2.5% of body weight in the diabetic group, and a 0.5% body weight incremental increase was made at each 5 min (exercise at each load lasted 5 min). Blood samples were taken at the end of each exercise load for lactate measurements by an enzymatic method (Engel & Jones, 1978) and were followed by a 30-s rest. All blood samples (25 μ l) were collected with graded capillary tubes from a cut at the tip of the tail.

Since the progressive part of LMT starts when the rat shows a high level of blood lactate, a progressive test produces a characteristic “U”-shaped profile of blood lactate. Blood LM was defined as the load corresponding to the nadir of the blood-lactate-versus-workload curve as a percent of body weight. This minimum value corresponds, theoretically, to aerobic/anaerobic transition (Tegtbur et al., 1993).

Blood-lactate-versus-workload curves were obtained by an Order 2 polynomial adjustment using a computer program (ORIGIN 6.0) that enables the calculation of LM.

2.7. Exercise training

The exercise protocol consisted of swimming exercise (1 h day⁻¹, 5 days week⁻¹) for 6 weeks, with an overload (lead fish sinkers strapped to the chest) corresponding to the individual LM (aerobic/anaerobic metabolic transition) of animals obtained through LMT, in a swimming pool (100×80×100 cm) filled with water at a temperature of 32±1°C. The swimming exercise protocol was chosen since it is largely used in our laboratory and it has shown satisfactory results on the aerobic capacity of rats (Gobatto et al., 2001).

2.8. Sacrifice

After the 6-week training period (48 h after the final tests and without previous fasting), all animals were killed by decapitation for the collection of biological materials.

2.9. Biochemical analysis

2.9.1. Blood

At the moment of sacrifice, blood samples were collected for the evaluation of glucose, total protein levels (Laborlab Kit), and free fatty acids (FFA) (Nogueira, Strufaldi, Hirata, Abdalla, & Hirata, 1990) by colorimetric methods, and for the evaluation of insulin by radioimmunoassay (Herbert, Lau, Gotlieb, & Bleicher, 1965).

2.9.2. Skeletal muscle

2.9.2.1. Protein synthesis. Longitudinal strips from the soleus muscle (70 mg) were preincubated for 30 min in an RPMI 1640 medium (with glutamine, and without red phenol and sodium bicarbonate) supplemented with fat-free 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 100 μ U ml⁻¹

insulin saturated with a 95% O₂/5% CO₂ gas mixture. After this time, the strips were transferred to a new RPMI medium with the same supplementation, containing 0.05 μ Ci ml⁻¹ [¹⁴C]phenylalanine and incubated for two more hours. At the end of incubation, muscular strips were homogenized in 5% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 2000 rpm for 15 min at 4°C. TCA-insoluble material was washed thrice with 5% TCA. The resulting precipitate was dissolved for 30 min in 10% sodium dodecyl sulfate at room temperature to determine both protein content and the radioactivity incorporated into muscle proteins (Dardevet,

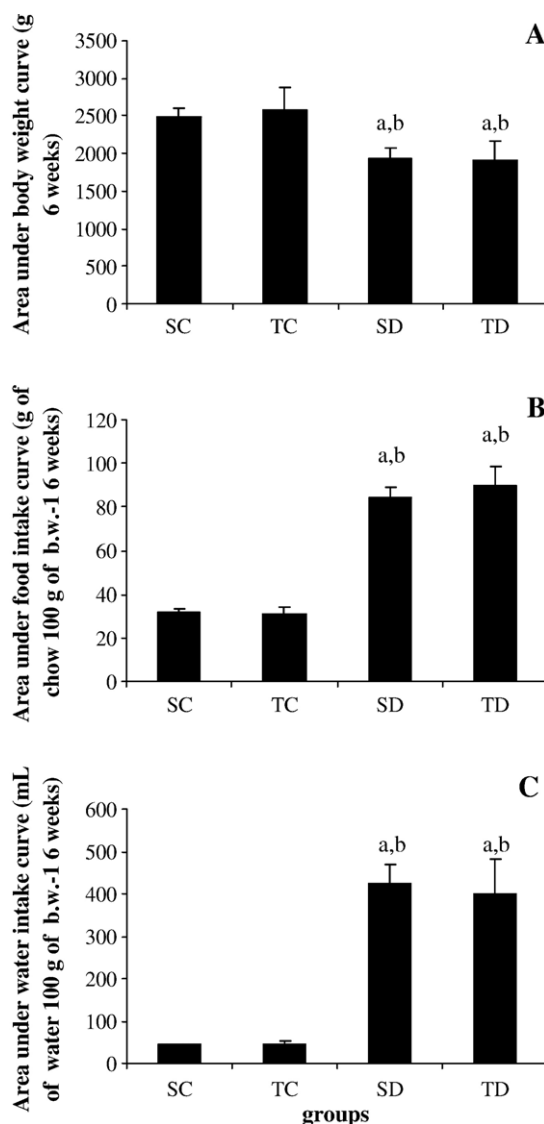


Fig. 1. Areas under the body weight (A), food intake (B), and water intake (C) curves of the animals during the experimental period. Results are expressed as mean±S.D. ($n=6$ animals in each group). Statistical tests: area under the body weight curve: two-way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test (at a statistical significance of $P<0.05$); areas under the food/water intake curves: Kruskal–Wallis rank test followed by Mann–Whitney U test (at a statistical significance of $P<0.01$). ^aNot equal to SC. ^bNot equal to TC. ^cNot equal to SD. Groups: SC=white square; TC=black square; SD=white triangle; TD=black triangle; SC=sedentary control; TC=trained control; SD=sedentary diabetic; TD=trained diabetic.

Sornet, Balage, & Grizard, 2000). Muscle protein content was determined by the folin phenol method (Lowry, Rosebrough, & Farr, 1951), and the radioactivity incorporated into muscle proteins was determined with a liquid scintillation counter. Protein synthesis was calculated by dividing the incorporated radioactivity by the specific phenylalanine radioactivity in the incubation medium, and was expressed as nanomoles of phenylalanine incorporated by milligrams of protein in 2 h.

2.9.2.2. Protein degradation. Tyrosine liberation by isolated muscles in the presence of cyclohexamide was employed as the protein degradation index. This method is based on the fact that the amino acid tyrosine is neither synthesized nor degraded by skeletal muscles. Longitudinal strips from the soleus muscle (70 mg) were preincubated in Krebs–Ringer buffer (NaCl, 1.2 mmol l⁻¹; KCl, 4.8 mmol l⁻¹; NaHCO₃, 25 mmol l⁻¹; CaCl₂, 2.5 mmol l⁻¹; KH₂PO₄, 1.2 mmol l⁻¹; MgSO₄, 1.2 mmol l⁻¹, pH 7.4) supplemented with 5.5 mmol l⁻¹ glucose, 1.34% BSA, 5 µU ml⁻¹ insulin, and 5.0 mmol l⁻¹ cyclohexamide, saturated with a 95% O₂/5% CO₂ gas

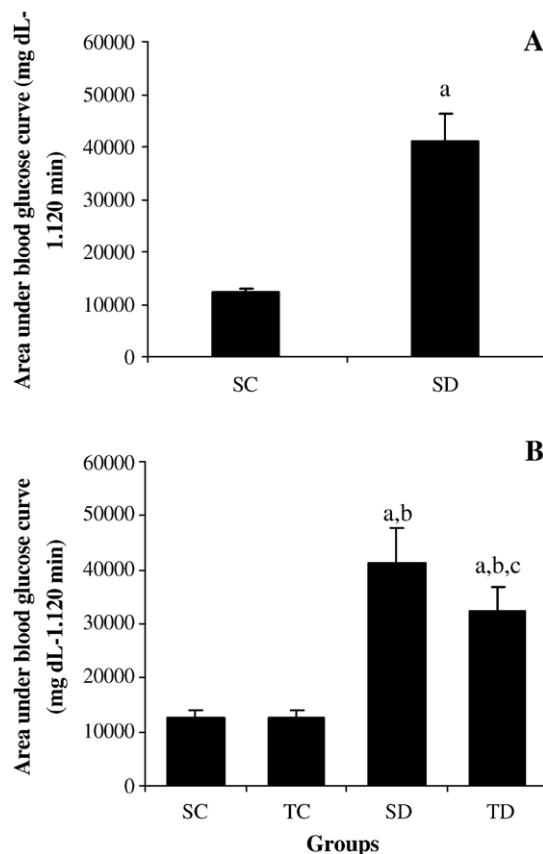


Fig. 2. Areas under the blood glucose curves of animals during oGTT at the beginning of the experiment (A) and after the 6-week period (B). Results are expressed as mean±S.D. ($n=16$ animals in each group at the beginning and $n=8$ animals in each group after the 6-week period). Statistical tests: Kruskal–Wallis rank test followed by Mann–Whitney U test (at a statistical significance of $P<.01$). ^aNot equal to SC. ^bNot equal to TC. ^cNot equal to SD. Groups: SC=white square; SD=white triangle; SC=sedentary control; SD=sedentary diabetic.

Table 1

Blood lactate (mmol l⁻¹) and load (% body weight) equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition (LM), as determined by LMT before and after the 6-week program

	Before		After	
	Lactate	Load	Lactate	Load
SC	6.89±0.63	4.84±0.21	7.88±0.72	5.11±0.19
TC	—	—	6.83±0.49 ^a	5.79±0.31 ^{a,b}
SD	6.79±0.89	3.42±0.19 ^a	7.92±0.52 ^c	3.72±0.23 ^{a,c}
TD	—	—	6.90±0.18 ^{a,b}	4.18±0.30 ^{a,b,c}

Results are expressed as mean±S.D.

Before: SC group, $n=13$ animals; SD group, $n=8$ animals. After: $n=8$ animals in each group.

Before: t test for independent samples for lactate and Mann–Whitney U test for load. After: Kruskal–Wallis rank test followed by Mann–Whitney U test (at a statistical significance of $P<.01$).

SC=sedentary control; TC=trained control; SD=sedentary diabetic; TD=trained diabetic.

^a Not equal to SC.

^b Not equal to SD.

^c Not equal to TC.

mixture. Consequently, the muscular strips were transferred to a new same-composition medium and incubated for two more hours. At the end of the incubation, the samples of the incubation medium were used for tyrosine determination (Seider, Kapp, Chen, & Booth, 1980).

2.10. Statistics

Results are shown as mean±S.D. Data were compared using t test for independent samples or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls post hoc

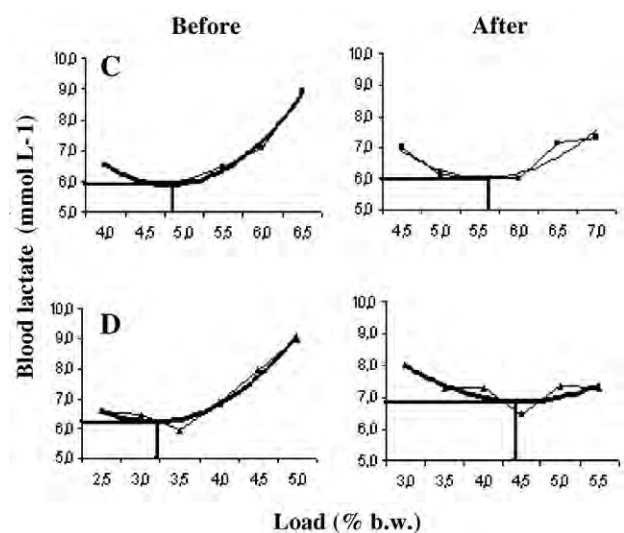


Fig. 3. Example of the blood-lactate-versus-load curve during the LMT of a control (C) rat and a diabetic (D) rat before and after the 6-week swimming training period at the intensity of aerobic/anaerobic metabolic transition (LM). The curves were obtained by an Order 2 polynomial fitting using a computer program (ORIGIN 6.0). The vertical line indicates the load that corresponds to LM, and the horizontal line indicates the blood lactate concentration interpolated. LM theoretically indicates aerobic/anaerobic metabolic transition.

Table 2

Plasma concentrations of glucose (mg dl⁻¹), insulin (ng ml⁻¹), total proteins (g dl⁻¹), and FFAs (μEq l⁻¹) of animals after sacrifice

	Glucose	Insulin	Total proteins	FFA
SC	121.61±14.80	0.53±0.09	5.79±0.26	422.56±78.47
TC	103.37±13.49	0.68±0.18 ^a	5.71±0.23	381.05±20.66
SD	691.54±118.96 ^{a,b}	0.16±0.03 ^{a,b}	6.32±0.49	410.30±43.68
TD	660.13±115.62 ^{a,b}	0.13±0.05 ^{a,b}	6.03±0.54	507.00±70.18 ^{a,b,c}

Results are expressed as mean±S.D. (*n*=8 animals in each group).Statistics for glucose and insulin: Kruskal–Wallis rank test followed by Mann–Whitney *U* test (at a statistical significance of *P*<.01). Statistics for total proteins and FFA: two-way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test (at a statistical significance of *P*<.05).

SC=sedentary control; TC=trained control; SD=sedentary diabetic; TD=trained diabetic.

^a Not equal to SC.^b Not equal to TC.^c Not equal to SD.

test. *P*<.05 was considered as the level of statistical significance for parametric tests. The corresponding non-parametric tests, Mann–Whitney *U* test and Kruskal–Wallis rank test, were used when normality (Levene's test of equality) and/or equality of variance (Shapiro–Wilk test) was not met. When a statistical difference was detected by Kruskal–Wallis rank test, a comparison of pairs was made through the Mann–Whitney *U* test, adopting a statistical significance of *P*<.01.

3. Results

During the study period, alloxan-treated animals (SD and TD) had a reduced body weight (*P*<.05) compared to other groups (Fig. 1A). In contrast, both SD and TD groups had comparatively higher food and water intake (*P*<.01) than SC and TC groups (Fig. 1B and C, respectively).

As expected, blood glucose and, consequently, the area under the blood glucose curve of diabetic rats (SD) were higher (*P*<.01) than those in control rats (SC) during the oGTT performed at the beginning of the experiment (Fig. 2A).

After the 6-week training period, another oGTT was performed. The area under the blood glucose curve of SD and TD animals was higher (*P*<.01) than that in the SC and TC groups. However, the diabetic rats trained at LM

intensity had a lower area under the blood glucose curve (*P*<.01) in oGTT than diabetic sedentary rats (Fig. 2B).

The mean values of blood lactate and the load supported by animals that correspond to aerobic/anaerobic transition (LM), according to LMT, before and after 6 weeks of training are shown in Table 1. Before training, the overload supported by animals (in percent body weight) corresponding to LM was comparatively higher (*P*<.01) in the control group (SC) than in the diabetic group (SD). Blood lactate concentration at LM load did not differ between groups. After the 6-week swimming training, the blood lactate concentration at LM intensity was lower (*P*<.01) in the trained groups than in their respective sedentary groups (TC<SC; TD<SD). In spite of that, the load equivalent to LM was significantly higher (*P*<.01) in the trained groups than in the sedentary groups (TC>SC; TD>SD). We still observed that the load equivalent to LM in the diabetic groups (SD and TD) was significantly lower (*P*<.01) than that in the control groups (SC and TC) (Table 1).

Fig. 3 presents an example of the blood-lactate-versus-overload curve during the LMT of a control (C) rat and a diabetic (D) rat before and after 6 weeks of swimming training at LM intensity. The mean values of blood lactate and overload during LMT, at the beginning of the experiment and 6 weeks later, are presented in Table 1.

Plasma concentrations of glucose, insulin, total proteins, and FFAs after sacrifice are shown in Table 2. The diabetic animals (SD and TD) had higher glucose levels (*P*<.01) and lower insulin levels (*P*<.01) than controls (SC and TC). No difference was observed in total proteins. FFAs were significantly higher (*P*<.05) in the TD group than in other groups.

Table 3 indicates that protein synthesis in the isolated soleus muscle did not differ among groups. On the other hand, protein degradation was comparatively higher (*P*<.05) in the SD group than in other groups.

Table 3

Protein synthesis and degradation (pmol mg⁻¹ h) in the isolated soleus muscle after sacrifice

	Synthesis	Degradation
SC	16.43±3.72	151.38±19.31
TC	17.90±3.81	171.54±15.54
SD	19.23±5.48	203.23±22.20 ^{a,b,c}
TD	17.09±3.51	160.08±28.36

Results are expressed as mean±S.D. (*n*=10 animals in each group).Statistics: two-way ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test (at a statistical significance of *P*<.05).

SC=sedentary control; TC=trained control; SD=sedentary diabetic; TD=trained diabetic.

^a Not equal to SC.^b Not equal to TC.^c Not equal to TD.

4. Discussion

Several studies with experimental diabetic animals have demonstrated that physical activity counteracts disease

complications, preventing cardiac dysfunctions (Villanueva et al., 2003) and improving glycemic tolerance and homeostasis (Luciano & Mello, 1998; Tancréde et al., 1982). However, the study of the metabolic effects of exercise on rats is frequently questioned due to lack of information about the intensity of effort performed by animals during exercise. Therefore, the present study was designed to determine the effort intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition (LM) during swimming exercise in alloxan diabetic animals through LMT and to verify if this test is indeed sensitive to physiological alterations caused by diabetes and swimming exercise training at individual LM.

The body weight, food intake, and water intake results show that our diabetic animals had major disease symptoms, such as body weight loss, polyphagia, and polydipsia. Besides, the oGTT performed at the beginning of the experiment confirmed diabetes onset since the alloxan-treated group had higher blood glucose levels at all points of the test and had higher area under the blood glucose curve.

Once diabetes had been confirmed, LMT was performed to determine the intensity of effort equivalent to metabolic transition, as proposed by Voltarelli et al. (2002). In accordance with these authors, there is stabilization of blood lactate concentration at the load in which the lowest lactate value occurs, and heavier loads lead to a continuous rise of the circulating level of this substrate. Hence, the load at which the lowest blood lactate concentration occurs during LMT (LM) coincides with the maximal lactate steady state (Voltarelli et al., 2002), the gold standard used to determine aerobic/anaerobic transition.

Gobatto et al. (2001), using the maximal lactate steady-state test in sedentary Wistar rats, observed the stabilization of blood lactate concentrations while the rats carried an overload of 5% and 6% of their body weight. These values are close to those found by Voltarelli et al. (2002) and Voltarelli, Mello, and Gobatto (2004) (applying LMT in sedentary same-specimen rats; mean values of 4.95 and 4.93, respectively) and close to that obtained in the SC group ($4.84 \pm 0.21\%$ body weight) in this study.

The mean overload equivalent to LM in the diabetic group was lower than that in the control group, although the lactate values at this intensity were similar between groups. This seems to indicate that the metabolic and physiological alterations incited by diabetes made these animals less tolerant to exercise.

At the end of the 6-week training period, trained rats (TC and TD) showed comparatively higher overload values and lower blood lactate values than their respective sedentary rats (SC and SD) at LM intensity during LMT. Thus, the swimming exercise at LM intensity improved aerobic capacity in both control and diabetic rats. Voltarelli et al. (2004) verified that swimming training at LM intensity improved the aerobic capacity of healthy animals. However, there has been no published literature on tests that may be used to evaluate the intensity of exercise, as well as changes in conditioning level, in diabetic animals.

After 6 weeks of training, the animals were submitted to another oGTT. In spite of similar blood glucose levels in the TC and SC groups, the TD group had blood glucose levels comparatively lower than those of the SD group during the whole test, which resulted in a reduced area under the blood glucose curve.

It is well known that physical activity improves glucose uptake from the circulation due to some adaptations in skeletal muscles, including the up-regulation of mRNA and Glut4 protein expression (protein responsible for glucose uptake in this tissue) and the increase in enzymatic capacity, muscle capillarization, and insulin sensitivity (Borghouts & Keizer 2000; Lee et al., 2002). Hence, the reduced blood glucose in the TD group, compared with that in the SD group, might be related to some of these adaptations.

The exercise performed at LM intensity also reduced the protein degradation rate in the soleus muscle of diabetic animals to values similar to those found in control animals. According to Charlton and Nair (1998), insulin appears to exert its anabolic effects on muscle tissues chiefly through the inhibition of protein breakdown. Since it has been well established that exercise increases insulin sensitivity (Borghouts & Keizer, 2000), this hormone may be involved in the reduction of protein degradation observed in TD animals compared with SD animals. Another possible mechanism through which exercise can reduce proteolysis is the reduction of the activity of the ubiquitin–proteasome pathway, the major nonlysosomal process responsible for the breakdown of most short-lived and long-lived proteins in eukaryotic cells, whose activity is increased in catabolic states (Taillandier et al., 2004). Since even a minor imbalance between protein synthesis and degradation can potentially have a long-term effect on cell metabolism and viability, we consider that the intensity of exercise used for training had an important beneficial effect on diabetic animals since it restored muscular protein degradation to normal rates.

From the results obtained, we can conclude that LMT was sensitive to severe metabolic and physiological alterations incited by uncontrolled diabetes. Even more, the test used was also sensitive to changes in the aerobic capacity of animals induced by swimming training at LM intensity, as demonstrated by the fact that even uncontrolled diabetic animals displayed an improvement in aerobic capacity due to swimming exercise at individual LM intensity. The swimming training for diabetic animals at LM intensity, apart from improving aerobic capacity, also improved glucose and protein metabolism.

Acknowledgments

This research was supported by the Brazilian foundations Capes, FAPESP (2005/02139-0), and CNPq (300270/2004-6).

References

- American Diabetes Association. (2005). Diagnosis and classifications of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 28, S37–S42.
- Borghouts, L. B., & Keizer, H. A. (2000). Exercise and insulin sensitivity: A review. *International Journal of Sports Medicine*, 21, 1–12.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813–821.
- Charlton, M., & Nair, K. S. (1998). Protein metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Nutrition*, 128, 323S–327S.
- Dardevet, D., Sornet, C., Balage, M., & Grizard, J. (2000). Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *Journal of Nutrition*, 130, 2630–2635.
- Eizirik, D. L. (1995). Insulin-dependent diabetes mellitus and gothic cathedrals. *Endocrinology and metabolism*, 2, 167–168.
- Engel, R. C., & Jones, J. B. (1978). Causes and elimination of erratic blank in enzymatic metabolic assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: Improved conditions for assay of L-glutamate, L-lactate and other metabolites. *Analytical Biochemistry*, 88, 475–484.
- Gobatto, C. A., Mello, M. A. R., Sibuya, C. Y., Azevedo, J. R. M., Santos, L. A., & Kokubun, E. (2001). Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130, 21–27.
- Herbert, V., Lau, K. S., Gotlieb, C. W., & Bleicher, S. T. (1965). Coated charcoals immunoassay of insulin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25, 1375–1384.
- Jones, A. M., & Doust, J. H. (1998). The validity of the lactate minimum test for determination of the maximal lactate steady state and physiological correlates to 8 km running performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30, 1304–1313.
- Kelly, M. A., Rayner, M. L., Mijovic, C. H., & Barnett, A. H. (2003). Molecular aspects of type 1 diabetes. *Molecular Pathology*, 56, 1–10.
- Lee, J. S., Bruce, C. R., Tunstall, R. J., Cameron-Smith, D., Hügel, H., & Hawley, A. (2002). Interaction of exercise and diet on glut-4 protein and gene expression in type I and type II rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 175, 37–44.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., & Farr, A. L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Luciano, E., & Mello, M. A. R. (1998). Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. *Revista Paulista de Educação Física*, 2, 202–209.
- Mathews, J. N. S., Altman, D. G., Campbell, M. J., & Royston, P. (1990). Analysis of serial measurements in medical research. *British Medical Journal*, 27, 230–235.
- Nogueira, D. M., Strufaldi, B., Hirata, M. H., Abdalla, D. S. P., & Hirata, R. D. C. (1990). Sangue:-parte I: Glicídios. In D. M. Nogueira, B. Strufaldi, M. H. Hirata, D. S. P. Abdalla, & R. D. C. Hirata (Eds.), *Métodos de bioquímica clínica* (pp. 153–168). São Paulo: Pancast.
- Pilis, W., Zarzeczny, R., Langfort, J., Kaciuba-Uscilko, H., Nazar, K., & Wojtyna, J. (1993). Anaerobic threshold in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106A, 285–289.
- Rossini, A. A. (2004). Autoimmune diabetes and the circle of tolerance. *Diabetes*, 53, 267–275.
- Seider, M. J., Kapp, R., Chen, C., & Booth, F. W. (1980). The effects of cutting or of stretching skeletal muscle in vitro on the rates of protein synthesis and degradation. *Biochemical Journal*, 188, 247–254.
- Taillandier, D., Combaret, L., Pouch, M. N., Samuels, S. E., Béchet, D., & Attaix, D. (2004). The role of ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 357–361.
- Tancrède, G., Rousseau-Mignerot, S., & Nadeau, A. (1982). Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes*, 31, 406–409.
- Tegtbur, U., Busse, M. W., & Braumann, K. M. (1993). Estimation of individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25, 620–627.
- Villanueva, D. S., Poirier, P., Standley, P. R., & Broderick, T. L. (2003). Prevention of ischemic heart failure by exercise in spontaneously diabetic BB Wor rats subjected to insulin withdrawal. *Metabolism*, 52, 791–797.
- Voltarelli, F. A., Gobatto, C. A., & Mello, M. A. R. (2002). Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 1389–1394.
- Voltarelli, F. A., Mello, M. A. R., & Gobatto, C. A. (2004). Limiar anaeróbico determinado pelo teste do lactato mínimo em ratos: Efeitos dos estoques de glicogênio muscular e do treinamento físico. *Revista Portuguesa de Ciências Desporto*, 4, 16–25.