

---

LICENCIATURA PLENA EM EDUCAÇÃO FÍSICA

---

**LEANDRO PEREIRA DE MOURA**

**DIABETES MELLITUS E ESTEATOSE  
HEPÁTICA EM RATOS: EFEITOS DE UM  
PROTOCOLO DE TREINAMENTO  
AERÓBIO**



Rio Claro

2010

LEANDRO PEREIRA DE MOURA

**DIABETES MELLITUS E ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS:  
EFEITOS DE UM PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBIO**

Orientadora: Maria Alice Rostom de Mello

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Licenciatura plena Educação Física.

Rio Claro  
2010

617.1027 Moura, Leandro Pereira de  
M929d Diabetes mellitus e esteatose hepática em ratos: efeitos de um  
protocolo de treinamento aeróbio / Leandro Pereira de Moura. - Rio Claro  
: [s.n.], 2010  
68 f. : il., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão (licenciatura - Educação física) - Universidade  
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Maria Alice Rostom de Mello

1. Medicina do esporte. 2. Exercício físico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

---

## **AGRADECIMENTOS**

Faço aqui meus sinceros agradecimentos, primeiramente a Deus, aos meus pais por me proporcionarem uma educação por toda a vida e com isso contribuindo com minhas vitórias. Agradeço também a minha professora, orientadora e, além de tudo, minha amiga Maria Alice Rostom de Mello por toda a ajuda, confiança, aprendizado, oportunidade e principalmente pela amizade que criamos. A toda equipe de alunos do Laboratório de Nutrição, Metabolismo e Exercício, por todo o aprendizado, ajuda e amizade.

Agradeço também o indispensável apoio dos técnicos do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP Campus Rio Claro: Clarice Sibuya, Eduardo Custódio e José Roberto Rodrigues e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo: Processo: 500211/2007-8) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2009/52191-9) pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	9
2- OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
3- REVISÃO DE LITERATURA.....	12
4- MATERIAS E MÉTODOS.....	16
5- RESULTADOS.....	19
6- DISCUSSÃO.....	21
7- CONCLUSÃO.....	23
8- REFERÊNCIAS.....	24
9- ANEXOS (Artigos).....	27
9.1- Anexo 1 (MOURA, L. P. ; GOMES, R. J. ; LEME, J.A.C.A. ; VOLTARELLI, F. A. ; MOURA, R. F. ; Araújo, M. B. ; RIBEIRO, C. ; Luciano. E. ; MELLO, M. A. R. . Hepatic steatosis markers in diabetic rats exercised at the aerobic/anaerobic metabolic transition (submitted). Life Sciences (1973) <sup>JCR</sup> , 2010.).....	26
9.2- Anexo 2 (MOURA, L. P. ; GOMES, R. J. ; LEME, J.A.C.A. ; VOLTARELLI, F. A. ; RIBEIRO, C. ; Araújo, M. B. ; Luciano. E. ; MELLO, M. A. R. . INSULINA PANCREÁTICA DE RATOS DIABÉTICOS TIPO 1 SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO INDIVIDUALIZADO (Submetido).. Motricidade (Santa Maria da Feira) <sup>JCR</sup> , 2009.).....	43

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em sua 3ª Reunião Extraordinária realizada no dia 03 de setembro de 2008, no Prédio do STI da Faculdade de Ciências da UNESP, Campus de Bauru, às 09h00, após análise do parecer emitido pelo relator **APROVA** o projeto "Protocolos de treinamento aeróbico intervalado e da periodização para natação com ratos", Processo nº 1501/46/01/08, sob responsabilidade do Professor Doutor Julio Wilson dos Santos, tendo como colaboradora a Professora Doutora Maria Alice Rostom de Mello.

Bauru (SP), 20 de outubro de 2008



**PROP. DR. PAULO NORONHA LISBOA FILHO**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

## DIABETES MELLITUS E ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS: EFEITOS DE UM PROTOCOLO DE TREINAMENTO AERÓBIO

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do exercício realizado na intensidade da transição aeróbica/anaeróbica sobre os marcadores da esteatose hepática não alcoólica (EHNA) em ratos diabéticos. Ratos *Wistar* adultos (60 dias) foram divididos em 4 grupos: Controle Sedentário (CS) - ratos que não realizaram exercícios físicos; Controle Treinado (CT) - ratos que realizaram um protocolo de exercícios de natação na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual; Diabéticos Sedentários (DS) - ratos diabéticos aloxânicos que não realizaram exercícios físicos e Diabéticos Treinados (DT) - ratos diabéticos aloxânicos que realizaram protocolo de exercícios de natação na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual. Para a indução do diabetes os ratos foram submetidos à uma dosagem de 32mg/Kg de aloxana e os grupos controles solução tampão pela veia peniano da animal. No início do experimento, todos os animais foram submetidos ao teste de máxima fase estável de lactato (MFEL) com o intuito de identificar a transição aeróbia/anaeróbia durante exercício de natação. Os grupos treinados foram submetidos à natação, suportando sobrecargas (% do peso corporal – p.c.) equivalentes à intensidade da MFEL, 1h/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas. Foi analisado: ALT e AST séricas, albumina, glicose, e ácidos graxos livres (AGL), peso corporal e lipídeos totais no fígado. Os grupos diabéticos mostraram aumento (ANOVA two-way,  $p < 0,05$ ) em glicose sérica (DS=200% e DT=150%) e perda de peso (DS= 15,0% e DT=8,5%) quando comparado com os grupos controles e o grupo DS mostrou maior concentração de glicose e perda de peso em relação ao DS. A sobrecarga (%p.c.) equivalente a MFEL foi menor para o grupo DT (4,7) em relação ao CT (5,6%). As enzimas marcadoras de EHNA (U/L) não se diferiram entre os grupos (AST: CS=  $81,6 \pm 15,0$ ; CT=  $87,0 \pm 23,2$ ; DS=  $69,8 \pm 47,3$  e DT=  $78,7 \pm 29,9$ ; ALT: CS=  $39,7 \pm 14,6$ ; CT=  $38,9 \pm 9,4$ ; DS=  $40,0 \pm 17,4$  e DT=  $44,6 \pm 17,0$ ). O mesmo foi observado nas concentrações de lipídeos totais hepáticos (mg/100mg) (CS=  $3,5 \pm 0,4$ ; CT=  $3,5 \pm 0,5$ ; DS=  $3,6 \pm 0,6$  e DT=  $3,7 \pm 0,8$ ) e nas concentrações de albumina (g/dL) (CS=

4,2 ± 0,4; CT=4,3 ± 0,5; DS= 4,0 ± 0,4 e D=4,0 ± 0,5). Por outro lado, os animais dos grupos diabéticos apresentaram um aumento de AGL sérico ( $\mu\text{Eq/L}$ ) (CS= 449,0 ± 20,0; CT= 432,0 ± 41,0; DS= 519,0 ± 8,0 e DT= 507,0 ± 30,0). Podemos concluir o treinamento físico realizado na intensidade da transição metabólica atenuou a perda de peso e controlou a glicemia decorrente do diabetes. Em adição foi visto que as enzimas AST e ALT parecem exercer marcadores adequados para aumento nas concentrações de lipídeos no fígado neste modelo animal.

Palavras chave: Diabetes Mellitus; Esteatose Hepática e Exercício Físico

## DIABETES MELLITUS AND HEPATIC STEATOSIS IN RATS: EFFECTS OF AN AEROBIC TRAINING PROTOCOL

### ABSTRACT

The present study aimed to analyze the effects of exercise performed at aerobic/anaerobic transition on non-alcoholic hepatic steatosis (NAHS) markers in diabetic rats. Adult (60 days) male *Wistar* rats were divided into 4 groups: sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary diabetic (i.v. alloxan injection) (SD) and trained diabetic (TD). At the beginning of the experiment, all the animals were submitted to maximal lactate steady state test (MLSS) in order to identify the aerobic/anaerobic metabolic transition during swimming exercise. The trained groups were submitted to swimming, supporting overloads (% of body weight – b.w.) equivalent to MLSS intensity, 1h/day, 5 days/week, during 8 weeks. We analyzed: serum ALT, AST, albumin, glucose and free fat acids (FFA), body weight and total lipid concentrations in the liver. The diabetic groups showed higher (ANOVA two-way,  $p < 0.05$ ) serum glucose (SD=200% and TD= 150%) and weight loss (SD= 15.0% and TD= 8.5%) compared to controls and the SD showed higher glucose concentration and weight loss when compared to TD. The work load (% b.w.) equivalent to the MLSS was lower in TD (4.7%) than in TC (5.6%) group. The NAHS markers (U/L) did not show differences between groups (AST: SC=  $81.6 \pm 15.0$ ; TC=  $87.0 \pm 23.2$ ; SD=  $69.8 \pm 47.3$  and TD=  $78.7 \pm 29.9$ ; ALT: SC=  $39.7 \pm 14.6$ ; TC=  $38.9 \pm 9.4$ ; SD=  $40.0 \pm 17.4$  and TD=  $44.6 \pm 17.0$ ). The same was observed in liver total lipid concentrations (mg/100mg) (SC=  $3.5 \pm 0.4$ ; TC=  $3.5 \pm 0.5$ ; SD=  $3.6 \pm 0.6$  and TD=  $3.7 \pm 0.8$ ) and in serum albumin concentrations (g/dL): SC ( $4.2 \pm 0.4$ ) TC ( $4.3 \pm 0.5$ ) SD ( $4.0 \pm 0.4$ ) e TD ( $4.0 \pm 0.5$ ). On the other hand, the diabetic animals presented increased serum FFA ( $\mu\text{Eq/L}$ ) (SC=  $449.0 \pm 20.0$ ; TC=  $432.0 \pm 41.0$ ; SD=  $519.0 \pm 8.0$  and TD=  $507.0 \pm 30.0$ ). The results suggest that physical training at the aerobic/anaerobic metabolic transition intensity attenuated the body weight loss as well as improved serum glucose homeostasis of diabetic animals. In addition, serum ALT and AST enzymes proved to be adequate markers of liver lipid levels in this animal model.

. Key words: Diabetes *Mellitus*; Hepatic Steatosis; Physical Trainin

## **INTRODUÇÃO**

O Diabetes Mellitus resulta da secreção e/ou da ação diminuída do hormônio insulina. Os diabéticos são classificados em dois grupos distintos, tomando-se por base se o diabetes é causado pela falta da insulina (tipo 1) ou pela resistência à sua ação (tipo 2).

O diabetes tipo 1, insulino-dependente (IDDM), é uma doença auto-imune e afeta, sobretudo, pessoas jovens. Como diabéticos tipo 1 não produzem insulina suficiente, são dependentes da insulina exógena para a manutenção da glicemia dentro dos limites da normalidade. Já o diabetes tipo 2, ocorre mais lenta e tardiamente do que o tipo 1 (geralmente após os quarenta anos de idade) e é considerado não insulino-dependente (NIDDM). O diabetes tipo 2 representa cerca de 90% de todos os diabéticos e pode ser desencadeado por vários fatores:

obesidade, dieta hipercalórica e falta de atividade física (POWERS & HOWLEY, 2000).

As complicações do diabetes são graves. A doença é uma das principais causas de cegueira, doença renal, doença macrovascular aterosclerótica, doença hepática e uma variedade de neuropatias debilitantes, diminuindo a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes (KELLY et al., 2003). Como consequência da diabetes mellitus tipo 1 é encontrado um desequilíbrio no perfil lipídico circulante (COLCA et al., 1991; SHARMA & RAGHURAM, 1990). De acordo com Carew et al., (1976), o desbalanço das concentrações das lipoproteínas séricas pode promover a remoção de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado para catabolismo e excreção. Caso essa transferência para o esse tecido seja elevada e a taxa de catabolismo seja baixa, pode ocorrer um acúmulo de gordura nesse órgão, acarretando a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

A DHGNA é quadro inicial de uma doença, caracterizada principalmente pela presença de macrogotículas de gordura no hepatócito (DIEHL et al., 1999). Refere-se a um espectro de alterações, variando desde esteatose hepática simples, sem evidências de inflamação, até manifestações mais severas necro-inflamatórias, incluindo esteato-hepatite, que em 50% dos casos pode evoluir para fibrose, em 15% para cirrose e em 3% para falência hepática (SHETH et al., 1997; MULHALL et al., 2002). Marcadores dessa doença, como elevação nas concentrações séricas das transaminases hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), têm sido usados em estudos epidemiológicos como indicadores dessa condição (MUKAI et al. 2002).

No tratamento do diabetes mellitus, o exercício físico tem sido considerado de grande importância (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003). Tal intervenção, comprovadamente, melhora a tolerância à glicose e reduz a resistência à insulina. Contudo, há muitas controvérsias quanto aos protocolos de exercício mais adequados para diabéticos.

Uma vez que existem limitações nas pesquisas com seres humanos, modelos animais oferecem condições mais adequadas ao estudo dessa questão. Porém, o estudo dos efeitos do exercício em animais de laboratório é frequentemente questionado pela falta de informação sobre a intensidade do esforço realizado pelos mesmos durante o exercício. Por essa razão, recentemente em nossos laboratórios, foi padronizado um protocolo para determinação da máxima fase estável de lactato de ratos durante exercício de natação, o que permitiu a estimativa da intensidade de esforço equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual desses animais nesse tipo de exercício (GOBATTO et al., 2001). Desta forma, uma avaliação mais precisa dos efeitos do exercício sobre o metabolismo de ratos diabéticos pode ser feita, uma vez que a intensidade do mesmo pode agora ser adequadamente identificada.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

O presente estudo visa analisar os efeitos do exercício na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia sobre marcadores de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) em ratos diabéticos aloxânicos.

### **Objetivos específicos**

1. Analisar a tolerância à glicose, pelo teste de tolerância à glicose oral, e a sensibilidade periférica à insulina, pelo teste de tolerância à insulina, de ratos wistar diabéticos;
2. Avaliar as concentrações hepáticas de lipídios totais e as concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST) Alanina aminotransferase (ALT), como marcadores de DHGNA;
3. Determinar a transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual desses animais durante exercício de natação pelo protocolo da Máxima Fase Estável de Lactato;

4. Avaliar os efeitos do treinamento físico na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia sobre o condicionamento aeróbio dos animais, os aspectos metabólicos e histológicos e os marcadores de DHGNA acima relacionados.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **Diabetes mellitus e exercício**

A atividade física é considerada de grande importância para o tratamento do DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006). Estudos usando técnicas de biologia molecular mostram que o treinamento físico induz aumento da atividade da tirosina-quinase dos receptores de insulina, aumento da translocação dos transportadores de glicose do músculo esquelético (GLUT-4), aumento da fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) e de sua associação à PI3-kinase independente da insulina, demonstrando que a contração muscular não necessita desse hormônio para absorver glicose circulante e promover melhora da homeostase glicêmica (CORTRIGHT, 1997; LUCIANO et al., 2002).

Programas de exercício físico tem-se mostrado eficientes no controle glicêmico de diabéticos, melhorando a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (CASTANEDA et al., 2002, CASTANEDA et al., 2001; SCHNEIDER & RUDERMAN, 1990). Geralmente recomenda-se a realização de exercícios aeróbios para os casos de diabetes (CASTANEDA, 2001; ERICSON & LINDGARDE, 1991; SCHNEIDER & RUDERMAN, 1990). No entanto, o exercício de força também mostrou efeitos benéficos no controle glicêmico desses indivíduos (WHELTON et al., 2002; ISHII et al., 1998; HONKOLA et al., 1997; DUNSTAN et al., 1998).

### **Esteatose hepática não alcoólica e diabetes mellitus**

Entre as doenças hepáticas não virais, a esteatose hepática parece ser a mais frequente na população em geral. Suas causas mais comuns incluem obesidade, diabetes mellitus, desnutrição, ingestão de álcool e toxicidade em

consequência de drogas. Sugeriu-se também que comprometimento do metabolismo lipídico, especialmente hipertrigliceridemia, causa esteatose hepática (RODEN et al., 1996).

O acúmulo de gordura no fígado, sem a presença de álcool ou outros agentes externos, é denominada doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Esse acúmulo representa mais que 5% do peso normal do fígado (LUDWING et al., 1980; GAUDIO et al., 2000), podendo ser acarretada pelo desequilíbrio de lipoproteínas circulantes e pelo desbalanço entre catabolismo e o depósito de gorduras no fígado. Dessa forma ocorre a diminuição de oxidação das gorduras pelo fígado e redução de exportação dos triglicerídeos (TG) pelas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) a partir do órgão.

Dentro a denominação geral, designa-se esteatose hepática (EH) a DHGNA sem sinais de hepatite e de esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), a DHGNA com hepatite. A EH pode levar à EHNA, que através de necro-inflamações pode evoluir para fibrose, cirrose e falência hepática (MULHALL et al., 2002).

Até o presente momento, não existem procedimentos para a predição de quais portadores de EH desenvolverão EHNA e demais complicações associadas. Além disso, os fatores que desencadeiam essa progressão ainda são pouco conhecidos. Assim, é importante que pacientes diabéticos sejam investigados para a presença de EH e EHNA. Como a prática de exercícios regulares é ferramenta útil no tratamento do diabetes, é de interesse investigar seus efeitos sobre a DHGNA diabética.

A DHGNA é diagnosticada na clínica através de biópsia hepática, técnica não pode ser aplicada em estudos epidemiológicos. Contudo, indivíduos portadores de DHGNA tipicamente apresentam concentrações séricas elevadas de marcadores de lesão hepática, incluindo aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (MUKAI et al., 2002) e sugeriu-se que a DHGNA seja a causa mais comum da elevação crônica das concentrações séricas das transaminases hepáticas (CLARK et al., 2003 a). Essas observações indicam que

marcadores de lesão hepática podem ser também marcadores confiáveis de DHGNA em estudos epidemiológicos (MUKAI et al., 2002), embora a magnitude das alterações séricas não permita a diferenciação entre EH e EHNA (REIS et al., 2001).

Uma vez que existem limitações nas pesquisas com seres humanos, modelos animais mostram-se úteis para o estudo da questão da DHGNA no diabetes. Embora animais tratados com aloxana desenvolvam diabetes tipo 1, com acentuada perda de peso e mobilização dos estoques de lipídios corporais, constatou-se concentrações hepáticas de lipídios totais (NEWAIRY et al., 2002), triglicerídeos (MEIER et al., 1972; NEWAIRY et al., 2002) colesterol total, LDL e VLDL (NEWAIRY et al., 2002; TUOMILEHTO et al., 1979) elevadas em ratos diabéticos aloxânicos. Triglicerídeos e lipídios totais também mostraram-se elevados em cabras tratadas com aloxana (SCHWALM & SCHULTZ, 1976). Já foi relatado que ratos diabéticos por administração de estreptozotocina (DOMINGO et al., 1992, WAKAME, 1999) ou aloxana (AWADALLAH, EL-DESSOUKEY, 1977; KIM et al., 2006) apresentam aumento na atividade sérica das enzimas AST e ALT. Dessa forma, é de interesse verificar os efeitos do exercício físico sobre o acúmulo de lipídios no fígado nesse modelo animal de diabetes.

### **Transição metabólica aeróbia /anaeróbia no exercício**

O fornecimento de adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção do exercício pode ser proveniente dos metabolismos aeróbio e anaeróbio. Durante o exercício moderado, as respostas fisiológicas estabilizam-se rapidamente e o oxigênio supre de maneira satisfatória a demanda energética. Em intensidades mais elevadas, a via metabólica predominante é a anaeróbia, o que resulta na redução abrupta do pH muscular em consequência da produção de lactato. Isso dificulta a manutenção do exercício por tempo prolongado, já que ocorre a inibição da atividade enzimática e redução da atividade do  $Ca^{++}$  a troponina (McARDLE et al., 1998).

Existe uma zona de transição a partir da qual ocorre a mudança da predominância aeróbia para a anaeróbia, sendo essa zona de exercício extremamente importante para o condicionamento físico, treinamento e rendimento

desportivo. Por essa razão, diversas investigações a cerca dessa zona de transição vêm sendo realizadas nas últimas décadas, resultando em diferentes protocolos de avaliação. Dentre os mais utilizados, destacam-se o limiar ventilatório observado por Wasserman e Mcilroy (1964), a concentração de lactato sanguíneo para identificar o limiar anaeróbio (LAN), proposto por Kinderman et al., (1979), o limiar anaeróbio obtido pela concentração fixa de 4,0 mM de lactato sanguíneo (OBLA), inicialmente sugerido por Sjodin & Jacobs (1981), o modelo de potência crítica não invasivo e exaustivo proposto por Monod e Scherer (1969), entre outros.

Grande parte desses protocolos de avaliação utiliza a resposta do lactato sanguíneo devido à fidedignidade dessa variável sanguínea na mensuração da intensidade de transição metabólica bem como excelente resposta ao treinamento físico, permitindo além da caracterização do esforço, acompanhamento da eficiência do treinamento.

O limiar anaeróbio (LAn) foi definido como a carga de trabalho na qual o lactato sanguíneo começa a acumular desproporcionalmente durante o exercício, com cargas progressivas (WASSERMAN & McILROY, 1964) e, teoricamente, indica a máxima fase estável de lactato (MFEL) (MADER & HECK, 1986). A MFEL equivale a mais alta concentração sanguínea de lactato onde sua entrada na circulação é recuperada pela remoção durante o exercício com carga constante (HECK et al., 1985). O pressuposto de que o LAn coincide com MFEL mostrou-se verdadeiro em diferentes tipos de exercício, como corrida em esteira rolante e ciclo ergometria (STEGGMAN & KINDERMAN, 1982; HECK et al., 1985), entretanto a carga de exercício MFEL parece diferir do LAN na ergometria de braço (KRUGER et al., 1990) e no remo (BENEKE, 1995).

A MFEL também já foi utilizada para determinação da transição metabólica em ratos. Há algum tempo, nosso grupo de pesquisa (GOBATTO et al., 2001) desenvolveu um estudo para a determinação da MFEL de ratos durante o exercício de natação. Nesse estudo, a MFEL foi obtida na carga de 6% do peso corporal à concentração sanguínea de lactato foi de 5,5 mmol/L de sangue.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Animais**

Foram utilizados 60 ratos adultos da linhagem Wistar, com 60 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, medindo 37 x 31 x 16 (cinco ratos por gaiola), e mantidos à temperatura ambiente de 21° C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, alimentados com ração balanceada padrão Purina e água “*ad libitum*”.

### **Aspectos éticos**

Este estudo fez parte de um projeto mais amplo, intitulado “Protocolos de treinamento aeróbio, intervalado e da periodização para natação com ratos” que foi analisado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista, UNESP processo n° 1501/48/01/08.

### **Indução ao diabetes**

Para indução do diabetes experimental, os ratos, em jejum, receberam Aloxana monoidratada Sigma (32mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5, injetada na veia peniana. Após este procedimento, foram recolocados nas gaiolas recebendo, nas primeiras 24h pós-aloxana, solução de água e glicose (15%), além de ração “*ad libitum*” (LUCIANO & LIMA, 1997). Cinco dias após a administração da droga, foi realizado um teste de glicemia para comprovação do estado diabético dos animais, foram incluídos no estudo os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL. Como controles, foram usados ratos injetados com veículo (tampão citrato), para simulação do estresse sofrido pelos animais aloxânicos.

### **Grupos experimentais**

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: Controle Sedentário (CS) - ratos que não realizaram exercícios físicos; Controle Treinado

(CT) - ratos que realizaram um protocolo de exercícios de natação na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual; Diabéticos Sedentários (DS) - ratos diabéticos aloxânicos que não realizaram exercícios físicos e Diabéticos Treinados (DT) - ratos diabéticos aloxânicos que realizaram protocolo de exercícios de natação na intensidade da transição metabólica aeróbia/anaeróbia individual.

### **Adaptação ao meio líquido**

Todos os animais foram adaptados ao meio líquido. Aqueles designados aos grupos treinados, nos cinco dias que antecederam o início do período de treinamento. Aqueles designados aos grupos sedentários, nos cinco dias que antecederam aos testes de esforço. A adaptação consistiu em manter o animal na água rasa a uma temperatura de  $31 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 60 minutos, durante uma semana. O propósito da adaptação é reduzir o estresse que o treinamento causa no animal.

### **Teste de esforço**

A transição metabólica aeróbia/anaeróbia durante a natação bem como a avaliação do condicionamento aeróbio dos animais foi efetuada pelo protocolo de Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL). A MFEL equivale a mais alta concentração de lactato sanguíneo onde sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante exercícios com cargas constantes (HECK et al., 1985) e sua determinação tem se mostrado útil na prescrição de exercícios e na avaliação do condicionamento aeróbio. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu um protocolo para a determinação da MFEL para ratos durante exercício de natação (CONTARTEZE et al., 2008, GOBATTO et al., 2001), que foi usado no presente estudo.

Resumidamente, os animais, após serem adaptados ao meio líquido, foram submetidos a vários testes de natação suportando sobrecargas constantes e crescentes em relação ao peso corporal, com intervalos de 48 horas entre eles, até que não seja mais possível estabilização das concentrações de lactato sanguíneo durante a sessão de exercício. Cada teste consistiu de 25 minutos de natação contínua suportando uma carga atada ao tórax do animal, com coleta de sangue, por corte na extremidade da cauda a cada cinco minutos para a determinação das

concentrações de lactato. A determinação das concentrações sanguíneas de lactato foi efetuada pelo método enzimático (ENGEL & JONES, 1978). O critério de estabilização empregado foi diferença igual ou inferior a 1,0mM de lactato sanguíneo entre 10 e 20 minutos de exercício (MADER & HECK, 1986).

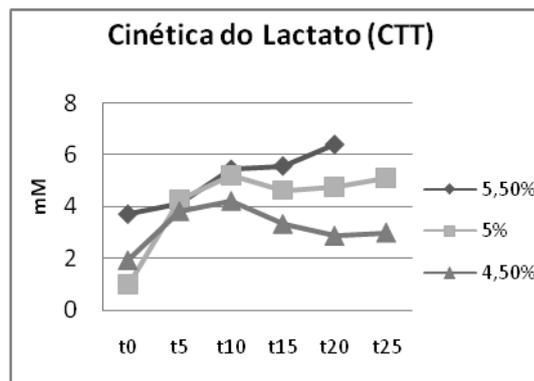


Figura1. Concentração de lactato de um rato, como exemplo, durante testes de natação para identificar a Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL). Para isto o animal foi submetido a três testes suportando sobrecargas de 5,0; 5,5 e 6,0% de seu peso corporal. Cada teste consistiu em 25min de natação contínua na intensidade previamente estabelecida ou até a exaustão, com coleta de sangue no início (em repouso) e durante o teste. A MFEL foi definida com a maior sobrecarga aonde a concentração de lactato não variou 1Mmol/L entre 10 e 20min de exercício. Para este específico rato, a MFEL foi determinada em 5,5% do peso corporal com a concentração de lactato em 4,5.

### Protocolo de treinamento

O protocolo de treinamento consistiu de natação por 60 minutos diários, 5 dias por semana, durante 8 semanas consecutivas. Após um período de adaptação de 5 dias, os animais suportaram sobrecarga, atada ao tórax, equivalente à transição metabólica individual determinada pela MFEL. As sessões de natação foram realizadas em recipiente de amianto com 100cm de comprimento, 70cm de largura e 60cm de altura, contendo água numa profundidade de 40cm no sentido de evitar que os animais apoiassem a cauda no fundo do recipiente e saltassem. A temperatura da água foi controlada e mantida em  $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## **Avaliações gerais e marcadores de esteatose hepática**

O peso dos animais foi analisado semanalmente durante todo o experimento, e no momento do sacrifício os animais foram mortos por decapitação, após 48 horas depois da última sessão de treinamento para as coletas das transaminases hepáticas séricas AST e ALT, albumina, usando kits comerciais (LABORLAB KIT) e determinação de ácidos graxos livres (AGL) (NOGUEIRA et al., 1990). Amostras do fígado foram extraídas para determinação de lipídios (NOGUEIRA et al., 1990).

## **Análise estatística**

Os resultados foram expressos com média e desvio padrão, avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) de uma entrada, com aplicação do teste “*post-hoc*” de Bonferroni, onde apropriado. Em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

A concentração da glicose dos animais diabéticos foi maior quando comparada aos grupos controles uma queda do grupo treinado (DT) em relação ao sedentário (DS) (Tabela 1). O peso corporal dos animais foi registrado semanalmente e os grupos diabéticos apresentaram uma redução significativa quando comparado aos grupos controles e o grupo DT apresentou uma menor perda em relação ao DS (Tabela 1). A identificação da MFEL foi efetuada para cada rato ao início do experimento. Não foi evidenciada diferença entre os grupos no que diz respeito à concentração sanguínea de lactato na intensidade equivalente à transição metabólica aeróbia/anaeróbia determinada pelo teste da MFEL (Figura 2), bem como para concentrações de lipídios totais no fígado e para as atividades séricas das enzimas AST, ALT (Tabela 2). No entanto, foi encontrado um aumento de AGL sérico nos animais diabéticos se comparados aos animais controles (Tabela 1) bem como redução da carga de trabalho equivalente à MFEL (Figura 2).

Tabela 1. Albumina sérica, glicose, concentrações de AGL e peso corporal no final do experimento.

	CT	CS	DT	DS
<b>Albumina sérica (g/dL)</b>	4,3 ± 0,5	4,2 ± 0,4	4,0 ± 0,5	4,0 ± 0,4
<b>Glicose sérica (mg/dL)</b>	105,0 ± 9,0	102,0 ± 13,0	301,0 ± 13,0**	323,0 ± 12,0*
<b>Peso corporal (g)</b>	452,0 ± 73,0	449,0 ± 41,0	324,3 ± 41,0**	252,0 ± 51,0*
<b>AGL sérico (μEq/L)</b>	432,0 ± 41,0	449,0 ± 20,0	507,0 ± 30,0*	519,0 ± 8,0*

Resultados expressos com média ± desvio padrão de 10 animais por grupo.

CT= Controle Treinado; CS= Controle Sedentário; DT= Diabético Treinado; DS= Diabético Sedentário.

\*Diferença significativa (ANOVA,  $P < 0,05$ ) em relação aos grupos controles (n=10)

\*\* Diferença significativa (ANOVA,  $P < 0,05$ ) dentro do grupo diabético (n=10)

Tabela 2 – Marcadores de esteatose hepática ao final do experimento.

	CT	CS	DT	DS
<b>AST sérica (U/L)</b>	87,0 ± 23,2	81,6 ± 15,0	78,7 ± 29,9	69,8 ± 47,3
<b>ALT sérica (U/L)</b>	38,9 ± 9,4	39,7 ± 14,6	44,6 ± 17,0	40,0 ± 17,4
<b>Concentrações de lipídios totais do fígado (mg/100mg)</b>	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,4	3,7 ± 0,8	3,6 ± 0,6

Resultados expresso com média ± desvio padrão de 10 animais por grupo.

CT= Controle Treinado; CS= Controle Sedentário; DT= Diabético Treinado; DS= Diabético Sedentário.

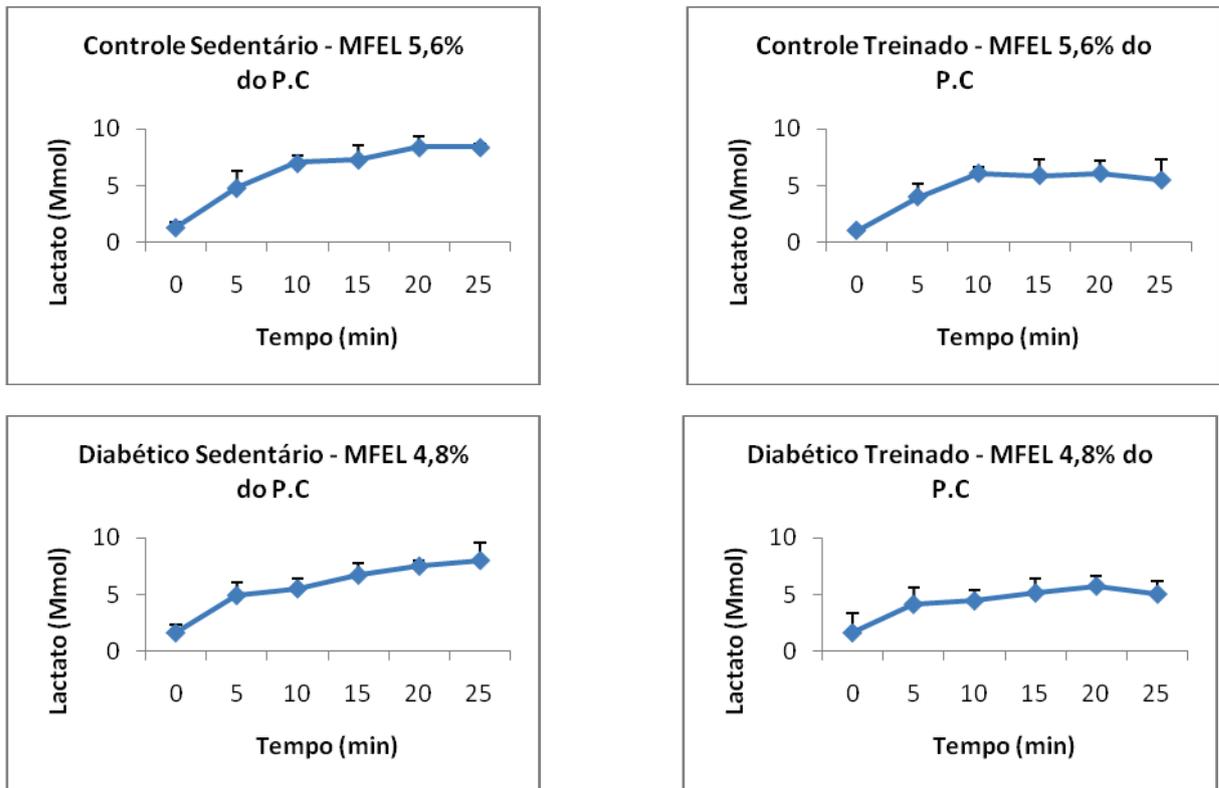


Figura 2. Cinética do lactato sanguíneo durante o exercício de natação na intensidade da máxima fase estável de lactato (MFEL). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão de 10 animais por grupo.

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi constatado nos ratos, devido à administração de aloxana, um quadro de diabetes semelhante ao encontrado em humanos, apresentando sintomas como hiperglicemia e redução da massa corporal, em conformidade com estudos realizados por Luciano & Lima (1997).

Com a intenção de verificar a condição de hidratação dos animais, a albumina sérica foi mensurada. O Aumento da albuminemia é comumente observado no estado de desidratação, causado pela excessiva perda de água ou privação da ingestão de água, gerando hemoconcentração (PETERS et al., 1982). No presente estudo, nenhuma diferença foi observada entre os grupos, indicando que o grupo

diabético não se encontrava em estado de desidratação. A possível perda de água, de forma crônica, ainda que sem causar desidratação, bem como a redução da massa muscular, visto que a insulina exerce papel fundamental sobre a entrada de aminoácidos nas células, facilitando a síntese protéica e inibindo a proteólise, podem ter contribuído efetivamente para o emagrecimento dos animais diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2006; GUYTON & HALL 1996).

A resposta do lactato sanguíneo durante o teste de esforço permitiu determinar a MFEL nos ratos controles e diabéticos. Gobatto et al., (2001) relataram que em ratos eutróficos a MFEL ocorreu quando os animais exercitaram-se suportando sobrecargas equivalentes a 5-6% do peso corporal à concentrações médias de lactato de 5,5 mmol/L. Valores semelhantes foram observados nos ratos controles do presente estudo.

Por outro lado, as cargas de trabalho correspondentes à MFEL foram menores nos ratos diabéticos em relação aos grupos controles, o que indica que os primeiros tiveram sua capacidade aeróbia prejudicada. Durante exercício na carga de trabalho referente à MFEL, ratos controles e diabéticos apresentaram respostas fisiológicas similares quanto à cinética de lactato. Pode-se, portanto, inferir que os mecanismos de produção e/ou remoção do lactato não foram afetados ou de alguma maneira contrabalanceados.

Outro aspecto a ser destacado é que embora o protocolo de treinamento aqui empregado não tenha sido eficiente em reduzir o AGL sérico, aumentados pelo diabetes, o mesmo foi eficiente em melhorar o quadro glicêmico e evitar e minimizar a perda de peso dos animais. Sabidamente, o exercício físico aumenta a sensibilidade à insulina, melhorando assim, a captação de glicose (HOWLETT et al., 2002). Esta prática tem como efeito crônico o aumento da sensibilidade celular à insulina, potencializando sua ação junto à fosforização do substrato do receptor de insulina-2 (IRS-2) aumentando, por consequência, a atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (HOWLETT et al., 2002). Quando ocorre contração muscular, há um aumento na atividade da enzima mitogen-activated protein kinase (MAP) e proteína quinase ativa (AMPK), junto com um aumento de cálcio e óxido nítrico (NO). Estes promovem a translocação de vesículas que contém GLUT-4 para a periferia das

células ajudando com isso na entrada da glicose para o interior das células musculares (JESSEN & GOODYEAR, 2005).

A concentração de lipídios no fígado não foi diferente entre os grupos controles e diabéticos, o mesmo ocorrendo com as enzimas indicadoras de EHNA. Indivíduos portadores de diabetes mellitus, resistentes à insulina tendem a desenvolver a EHNA pelo fato de apresentarem uma maior ativação das enzimas lípases e com isso aumentando o aporte de ácidos graxos para fígado levando a uma maior retenção de triglicerídeos nos hepatócitos (SASS, 2005). Posteriormente, o estresse oxidativo, decorrente do desequilíbrio enzimático entre pró-oxidantes e anti-oxidantes favorecendo um aumento da peroxidação lipídica, ativação das células estelares e um padrão anormal na produção de citocinas, podendo levar a injúria celular e à fibrose (YOUNOSSI, 2002). Isso não foi observado no presente estudo, pois, provavelmente, os AGLs foram usados como substrato energético, em função de os animais apresentarem diabetes descompensado. Mais pesquisas acerca deste aspecto são necessárias, para que se possa tirar uma conclusão.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui obtidos, conclui-se que, embora o treinamento físico efetuado na intensidade equivalente à transição metabólica tenha sido eficaz em melhorar o quadro glicêmico, não evitou o comprometimento do condicionamento aeróbio dos ratos diabéticos. Além disso, os marcadores de EHNA mostraram-se fidedignos quando comparados aos teores hepáticos de gordura de ratos diabéticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Diabetes Association. (2003). ADA stand position: physical activity/exercise and diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26,573-7.
2. American Diabetes Association. (2006). Position Statement: diabetes mellitus and exercise. *Diabetes Care*, 25,S64-S68.
3. American Diabetes Association Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. (2006). *Diabetes Care*, 29, S43-S48.
4. Beneke, R. (2003). Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *Eur J Appl Physiol*, 89,95-9.
5. Beneke, R.;Leithäuse,r R.M.; Hütler, M. (2001). Dependence of the maximal lactate steady state on the motor pattern of exercise. *Br J Sports Méd*, 35,192-196.
6. Bugianesi, E.; Leone, N.; et al., (2002). Expanding the natural history of non-alcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 123,134–40.
7. Brooks, G. A. (1986). The lactate shuttle during exercise and recovery. *Med Sport Sci*, 18,360-368,
8. Contarteze, R.V.; Machado, F.D.; Gobatto, C.A.; Mello, M.A. (2008). Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 151,415-22
9. Clark, J.M.; Brancati, F.L; et al., (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 122,1649–57.
- 10.de Marco, R.; Locatelli, F.; et al., (1999). Cause-specific mortality in type 2 diabetes. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care*, 22,756–61.
- 11.Doumas, B. T.; Watson, W. A.; Biggs, H. G. (1971). Albumin standarts and the measurements of serum albumin bromocresol green. *Clinica Chimica Acta*, 31,87-96.
- 12.Engels, R.C. & Jones, J. B. (1978). Causes and elimination of erratic bLanc 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.

13. Ferreira, J.C; Rolim, N.P; Bartholomeu, J.B; Gobatto, C.A; Kokubun, E.; Brum, P.C. (2007). Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34,760-5.
14. Gobatto, A.C. et al., (2001). Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise Comparative Biochemistry and Physiology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 130,21-7.
15. Guyton A.C, Hall JE. (2006). Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan.
16. Heck, H.; Mader, A.; Hess, G.; Mucke, S.; Muller, R.; Hollmann W. (1985). Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med*, 6,117-30.
17. Howlett, K.F; Sakamoto, K.; Hirshman, M.F.; Aschenbach, W.G.; Dow, M.; White, M.F.; Goodyear, L.J. (2002). Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice. *Diabetes*, 51(2),479-483.
18. Jessen, N.; Goodyear, L.J. (2005). Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 99,330-7.
19. Kelly, M. A.; et al., (2003). Molecular aspects of type 1 diabetes. *Molecular Pathology*, 56,1-10.
20. Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 2,216-26.
21. Luciano, E; Lima, F.B. (1997). Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício. *Rev. cienc. biomed.*, 18,47-60.
22. McCullough, A.J.; Farrell, G.C.; George, J.; Hall, P.; et al., (2005). The epidemiology and risk factors of NASH. *Fatty liver disease: NASH and related disorders*, 23–37.
23. Mukay, M.; et al., (2002). Liver disorder and related physical conditions and life style. *Digestive Disorders and Sciences*, 47,549-555.
24. Mulhal, P.B.; Ong, .J.P.; Younossi, Z.M. (2002). Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17,1136-43.
25. Nogueira, A.R.; et al., (1990). Colesterol e outros fatores de risco cardiovasculares nos servidores da UFRJ. Prevalência e influência de variáveis. *Arq. bras. Cardiol.*, 55,227-32.
26. Peters, T.; Biamont, G.T.; Doumas, B.T. (1982). Albumin in serum. Em Faulkner WR. Meites S, eds. *Selected Methods of Clinical Chemistry*, 9,319.

27. Randle, P.J.; Kerbey, A.L.; Espinal, J. (1988). Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones. *Diabetes Metab Rev.*, 4,623-38.
28. Harrison, S.; Neuschwander-Tetri, B. (2004). Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease*, 8,861-879
29. Sas, D.A.; Chang, P.; Chopra, K.B. (2005). Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci.*, 50,171-80.
30. Ten, S.; Malaren, N. (2004). Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89, 2596-39.
31. Tominagata, K.; Kurata, J.H.; Chen, Y.K.; Fujimoto, E.; Miyagawa, S.; Kusano, Y. (1995). Prevalence of fatty liver in japanese children and relationship to obesity: an epidemiological ultrasonographic survey. *Dig Dis Sci.*, 40,2002-9.
32. 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(11),1389-94.
33. Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 27,1047-53

**ANEXOS:**

Seguem em anexo ao trabalho de conclusão de curso, dois artigos científicos resultantes da pesquisa realizada no presente estudo.

Anexo 1:

## **Hepatic steatosis markers in diabetic rats exercised at the aerobic/anaerobic metabolic transition**

Leandro Pereira Moura<sup>a</sup>; Ricardo J Gomes<sup>b</sup>; José A Leme<sup>a</sup>; Fabrício A Voltarelli<sup>c</sup>; Rodrigo F Moura<sup>a</sup>; Michel B Araújo<sup>a</sup>; Carla Ribeiro<sup>a</sup>; Eliete Luciano<sup>a</sup>; Maria Alice R Mello<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>UNESP, SÃO PAULO STATE UNIVERSITY, RIO CLARO, SP, BRAZIL

<sup>b</sup>UNIFESP, SÃO PAULO FEDERAL UNIVERSITY, SANTOS, SP, BRAZIL

<sup>c</sup>UFMT, MATO GROSSO FEDERAL UNIVERSITY, CUIABÁ, MT, BRAZIL

Department of Physical Education, São Paulo State University (UNESP), Avenida 24A n° 1515, Caixa Postal 199, Bela Vista, Rio Claro, CEP 13506-900, SP, Brazil.

Correspondence to: Leandro Pereira de Moura. Department of Physical Education, São Paulo State University (UNESP), Avenida 24A n° 1515, Caixa Postal 199, Bela Vista, Rio Claro, CEP 13506-900, SP, Brazil. Fone/FAX: +(55) (19) 35264308.

E-mail: leandropereiram@hotmail.com

## ABSTRACT

**Aims:** The present study aimed to analyze the effects of exercise performed at aerobic/anaerobic transition on non-alcoholic hepatic steatosis (NAHS) markers in diabetic rats. **Main methods:** Adult (60 days) male Wistar rats were separated into four groups: sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary diabetic (i.v. alloxan injection) (SD) and trained diabetic (TD). At the beginning of the experiment, all animals were submitted to maximal lactate steady state tests (MLSS) in order to identify the aerobic/anaerobic metabolic transition during swimming exercise. The trained groups swam, supporting workloads equivalent to the MLSS intensity, one hour/day, five days/week, during eight weeks. Body weight, serum albumin, glucose, free fat acids (FFA) concentrations, NAHS markers (serum aspartate aminotransferase AST and alanine aminotransferase ALT) and liver total lipid concentrations were analyzed. **Key findings:** The diabetic groups showed higher serum glucose concentration and weight loss compared to controls, although TD group was less affected than SD group (ANOVA two-way,  $p < 0.05$ ). Training decreased serum glucose in trained diabetic rats. The NAHS markers, liver total lipid and serum albumin concentrations did not differ among groups. On the other hand, the diabetic animals presented higher serum FFA when compared to controls. **Significance:** The results suggest that physical training at the aerobic/anaerobic metabolic transition intensity attenuated the body weight loss as well as improved serum glucose homeostasis of diabetic animals. In addition, serum ALT and AST enzymes proved to be adequate markers of liver lipid levels in this animal model.

**Keywords:** Diabetes mellitus; Hepatic steatosis; Physical training.

## INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) result from the reduction of either secretion or action of insulin and causes impairment in glucose storage and use by cells. According to World Health Organization (WHO), in 2002 there were about 170 million diabetics around the world and the prediction is that until the year 2030 this number might double (Wild et al. 2004).

DM1 may include serious complications which reduce life quality and life expectation (Kelly et al. 2003). Among these complications are: retinopathy, renal disease, atherosclerotic macrovascular disease, debilitating neuropathies and hepatic diseases, such as hepatic steatosis (HS).

HS is characterized by the accumulation of fat in the liver, exceeding 5% of total weight (Leclercq et al. 1998), due to alcohol consumption or not (Alba and Lindor 2003). The non-alcoholic hepatic steatosis (NAHS) is one of the most common causes associated to chronic hepatic diseases, followed by hepatitis C and alcoholic HS.

Imbalance of the lipid profile is a consequence of DM1 (Colca et al. 1991; Sharma and Raghuram 1990). According to Carew et al. (1976), the imbalance of serum lipoproteins concentration promotes clearance of cholesterol from peripheral tissues to liver, for catabolism and excretion. When this transfer to the liver is high and the rate of catabolism is low, fat accumulation may occur in the organ, resulting in NAHS. Markers of this condition, such as the rise of the serum concentrations of the hepatic transaminases aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), are used in epidemiological studies as indicators of DM (Mukai et at. 2002).

With the intention of reverting the clinical condition installed by the NAHS, a lot of proposals of drugs were developed. However, due to the lack of specific drugs aiming the treatment of NAHS, the patients are instructed both to reduce the amount of lipids and carbohydrates in the diet and to practice regular physical activity, seeking to increase the daily energy expenditure (Ten and Malaren 2004).

In the treatment of diabetes mellitus, physical exercise has been considered of great importance (American Diabetes Association 2003). Such intervention is known to improve glucose tolerance and lipid profile because muscle contraction activates the insulin signaling pathway (Cortright and Dohm 1997; Luciano et al. 2002) and promotes glucose uptake even in the absence of insulin, therefore improving glucose and lipid metabolism.

On the other hand, there are many controversies concerning the most adequate exercise protocols for diabetics. This is evident in a study performed by Harrison and Harrison (2004), in which in exercise-trained individuals that presented gradual and healthy weight loss, there was an improvement of the diabetic NAHS symptoms from a histological point of view. On the other hand, in other studies performed by the same authors, it was observed that sharp weight loss led the clinical condition of the patients to worsen, predisposing to hepatic fibrosis. Taken into account these information, the present study aimed to analyze the effects of physical exercise at the intensity of the aerobic/anaerobic metabolic transition on NAHS markers in diabetic rats.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Young (60 days old at the start of the experiment, 10 per group) male Wistar rats were obtained from the animal facilities of UNESP - Sao Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil. During the experiment, the rats had free access to food (Purina® balanced chow) and water and were housed (5 rats per cage) on a 12 h light/dark cycle at room temperature of 21°C. All the procedures involving the animals were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (CEUA-IB-UNESP/Rio Claro, Protocol number: 008/2009)

#### Induction of diabetes

For the induction of the experimental diabetes, the rats received monohydrated alloxan Sigma (32mg/kg of body weight) dissolved in citrate buffer 0.01M, pH 4.5, after one night fasting, injected in the penile dorsal vein (Luciano and Lima, 1997). After this procedure, the animals were placed in collective cages (5 rats per cage) receiving, in the first 24 hours post alloxan, a solution of water and glucose (15%) to avoid the complications of the aloxanic hypoglycemia (Lenzen, 2008). Five days after the administration of the drug, an evaluation of the serum glucose was performed, with rats in the fed state. Rats that were not diabetic (< 250 mg/dL) or that were extremely diabetic (> 650 mg/dL) were excluded from the study. Rats injected with vehicle (citrate buffer) were used as controls.

#### Experimental groups and design

The animals were divided into four groups of 10 animals each: Sedentary Control (SC) – healthy rats that did not perform physical exercise; Trained Control (TC) – healthy rats which performed a protocol of physical exercise ; Sedentary Diabetic (SD) – alloxanic diabetic rats which did not perform physical exercise and Trained Diabetic (TD) – alloxanic diabetic rats which performed a protocol of physical exercise.

### Adaptation to the water

All rats were adapted to the water before the beginning of exercise tests. The adaptation consisted of keeping the animals in shallow water at  $31 \pm 1^\circ\text{C}$  for 60 min, 5 days/week for 2 weeks. The purpose of the adaptation was to reduce stress without promoting exercise training adaptations (Voltarelli et al. 2002).

### Aerobic/anaerobic metabolic transition and aerobic conditioning

Immediately after diabetes induction, all animals were subjected to an effort trial to determine their individual exercise intensity necessary to reach the aerobic/anaerobic metabolic transition, following the Maximal Lactate Steady State protocol (MLSS). This method was designed to detect the highest blood lactate concentration at which the entrance of lactate into the blood stream was counterbalanced by its removal, maintaining a stable concentration during exercises at constant intensity (Heck et al. 1985). This has proved to be useful in prescribing exercises as well as to determine the aerobic capacity of humans (Beneke et al. 2001), rats (Contarteze et al. 2008) and mice (Ferreira et al. 2007). Our research group has designed a MLSS protocol for rats during swimming exercises (Gobatto et al. 2001), which was employed in this study. In short, to determine the MLSS, series of 25 min swimming exercises were performed, in which the rats supported increasing overloads in relation to body weight (starting with 5% and increases of 1% after each test), fixed in each series, with intervals of 48h between them. Blood samples (25 $\mu\text{L}$ ) were taken every 5 min, from a cut on the tail tip, for lactate determination. The blood lactate concentration equivalent to MLSS was considered at the highest workload in which there was no variation in the blood lactate above 1.0 mmol/L between 10 and 25 min of exercise (Gobatto et al. 2001; Beneke et al. 2003).

Blood lactate concentration was determined by the enzymatic method proposed by Engels and Jones (1978). (Figure 1).

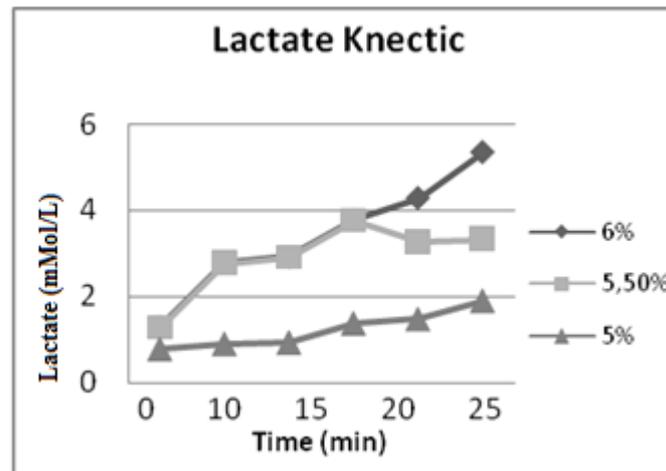


Figure 1. Blood lactate concentration of one rat, as example, during swimming tests to identify the Maximal Lactate Steady State (MLSS). The animal was subjected to three tests supporting overloads of 5.0; 5.5 and 6.0% of the body weight. Each test consisted of 25min of continuous swimming exercise at the intensity previously by established or until exhaustion, with blood collection in rest and each 5 min of exercise. MLSS was defined as the highest workload at which blood lactate concentration did not varied by more than 1mmol/L between 10 and 20min of exercise. For this specific rat, the MLSS occurred supporting the load of 5.5 % of the body weight at a blood lactate concentration of  $3.34 \pm 0.60$ .

#### Exercise protocol

Trained animals were subjected to swimming exercise 1h/day, 5 days/week, supporting the workload equivalent to the aerobic/anaerobic metabolic transition, as estimated by the MLSS tests (Gobatto et al. 2001).

#### General evaluations and hepatic steatosis markers

Serum glucose (Laborlab Kit, Guarulhos – SP/Brazil) was analyzed at the beginning and at the end of the experiment and all the animals had the body weight registered once a week. Data were analyzed by the total area under the curve of body weight during eight weeks of experiment, using the trapezoidal method (Matthews et al. 1990), with aid of the software

origin 6.0®. At the end of the experiment, all animals were killed by decapitation 48 hours after the last exercise session and blood was collected for serum hepatic aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), Free Fat Acids (FFA) and albumin determinations, using commercial kits (Laborlab Kit, Guarulhos – SP/Brazil). Samples of the liver were extracted for determination of total lipids concentration (Nogueira et al. 1990).

#### Statistic analysis

Results are presented as means  $\pm$  standard deviation and were analyzed by two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test, in appropriate cases. Statistica 7.0® was used to perform the analyzes and significance level was established at 5%.

## RESULTS

Serum glucose concentration of the diabetic animals increased when compared to controls and a significant decrease was observed in the trained group (TD) when compared to the sedentary group (SD) (Table I). Serum albumin concentrations did not differ among the groups (Table 1).

It was possible to indentify the individual MLSS for all animals. No difference was observed among the groups in relation to the blood lactate concentration at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition determined by the MLSS test. However, the workload equivalent to the MLSS in the diabetics groups was lower when compared to the control groups (Figure 2).

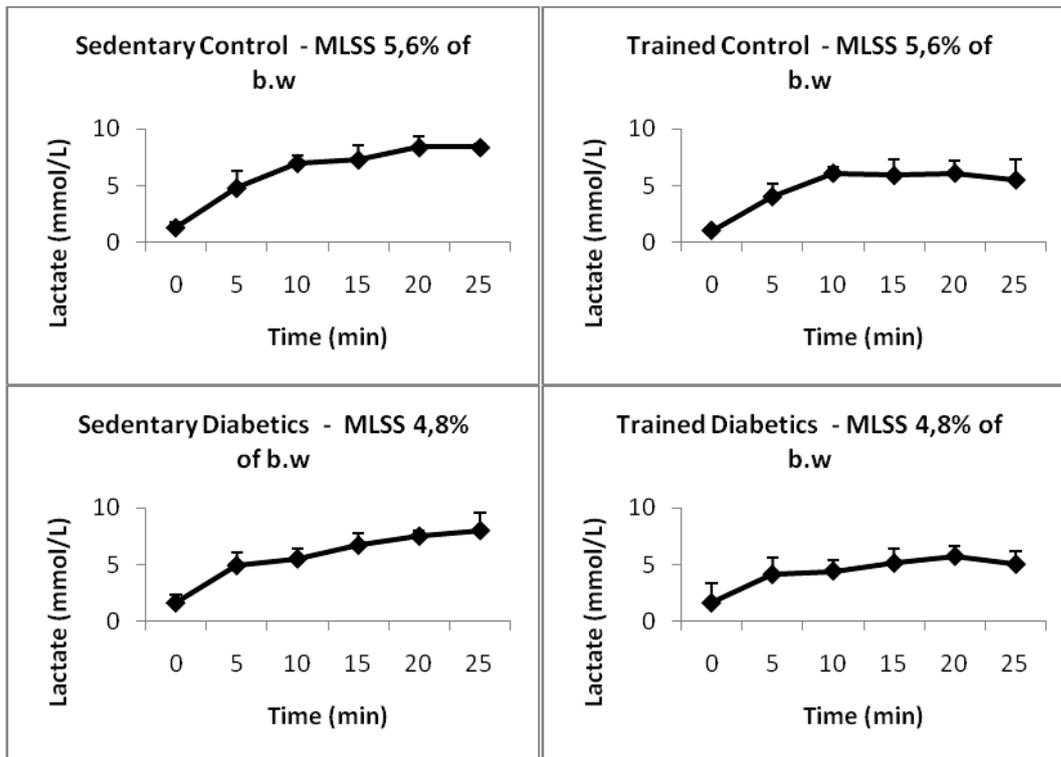


Figure 2. Blood lactate kinetics during swimming exercise at MLSS intensity. Values expressed a mean  $\pm$  standard deviation of 10 rats per group. At the top of each panel, the workload equivalent to the MLSS, in percentage of body weight, is shown.

The body weight of the animals was weekly registered and analyzed the area under the curve.

The diabetic groups showed a significant reduction in the body weight when compared to the control groups, although TD group was less affected than SD group (Table I).

Total lipid concentration in the liver as well as serum AST and ALT activity did not differ among the groups (Table II). On the other hand, an increase of serum FFA was observed in the diabetics groups in relation to control groups (Table I).

Table I - Serum albumin, glucose and FFA concentrations at the end of experiment and area under the curve of body weight during the experiment.

	<b>TC</b>	<b>SC</b>	<b>TD</b>	<b>SD</b>
<b>Serum Albumin (g/dL)</b>	4.3±0.5	4.2±0.4	4.0±0.5	4.0±0.4
<b>Serum Glucose (mg/dL)</b>	105.0±9.4	102.7±13.2	301.4±13.9**	323.2±12.1*
<b>Serum FFA (μEq/L)</b>	432.0±41.3	449.3±20.8	507.8±30.0*	510.0±8.2*
<b>Body Weight (g x 8 weeks)</b>	5383.5±314.9	5270.7±198.3	4774.8±645.4**	3424.8±349.9*

TC= Trained Control; SC= Sedentary Control; TD= Trained Diabetics; SD= Sedentary Diabetics

\* Different from control groups (Anova p<0.05).

\*\*Different from SD (Anova p<0.05).

Table II – Markers of non- alcoholic hepatic steatosis at the end of experiment.

	<b>TC</b>	<b>SC</b>	<b>TD</b>	<b>SD</b>
<b>Serum AST (U/L)</b>	87.0±23.2	81.6±15.0	78.7±29.9	69.8±47.3
<b>Serum ALT (U/L)</b>	38.9±9.4	39.7±14.6	44.6±17.0	40.0±17.4
<b>Liver total lipid concentrations (mg/100mg)</b>	3.5±0.5	3.5±0.4	3.7±0.8	3.6±0.6

TC= Trained Control; SC= Sedentary Control; TD= Trained Diabetics; SD= Sedentary Diabetics

## DISCUSSION

In the present study, a diabetic condition similar to human type 1 diabetes was observed in the alloxan injected rats, which presented symptoms such as hyperglycemia and reduction of body mass, in conformity with studies performed by Luciano and Lima (1997).

With the intention of verifying the hydration state of the animals, serum albumin concentrations were determined. The increase in albuminemia is commonly observed in the

dehydrated state, caused by the excessive loss of water or water intake privation, generating hemoconcentration (Peters et al. 1982). In the present study, no differences were observed among the groups, indicating that the diabetic rats were not dehydrated.

In order to determine the exercise intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition, at the beginning of the experiment, a maximal lactate steady state (MLSS) swimming protocol was performed. The analyzes of the blood lactate kinetics during swimming exercise allowed the determination of the workload equivalent to MLSS intensity in the control and diabetic rats. Gobatto et al. (2001) reported that in eutrophic rats the MLSS occurred when the animals carried out workloads equivalent to 5-6% of body weight at 5.5mmol/L of mean blood lactate concentration. Similar values were observed in the control rats of the present study. On the other hand, the workload equivalent to the MLSS intensity was lower in diabetic rats if compared to control rats, indicating that the first had their aerobic capacity impaired. During exercise at MLSS intensity, control and diabetic rats presented similar physiological responses when analyzed the blood lactate kinetics.

The weight loss of diabetic groups is due to the insulin deficit, because this hormone is responsible for anabolism and plays important roles on carbohydrate, amino acids and fat metabolism (American Diabetes Association, 2006; Guyton and Hall, 1996). Exercise training may attenuate body weight loss, since physical activity increases insulin sensitivity as well as decreases the serum glucose concentrations (Aronson et al. 1997; Hardin et al. 1995). In the present study we found less weight loss in DT group in relation to DS group.

Another aspect to be highlighted is that, even though the training protocol used was not efficient in reducing serum FFA, increased by the diabetes, it was efficient in improving the glycemic control of the animals. It is known that physical exercise increases insulin sensitivity,

therefore improving glucose uptake (Howlett et al. 2002). A chronic effect of this practice is the increase in cell sensitivity to insulin, increasing the effect of the hormone at the phosphorylation of the substrate-2 of the insulin receptor (IRS-2), and the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) activity (Howlett et al. 2002). When muscle contraction takes place, there is an increase both in the mitogen-activated protein kinase (MAP) enzyme activity and the AMP activated protein kinase (AMPK), followed by an increase of calcium and nitric oxide (NO). These events promote a translocation of vesicles containing GLUT-4 to the periphery of the cells and, thus, allowing the entrance of glucose into the muscle fibers (Jessen and Goodyear 2005).

The total lipid content in the liver was not different when compared to the control and diabetic groups. The same was observed in relation to NAHS marker enzymes AST and ALT. Diabetic individuals, who present insulin resistance, tend to develop NAHS due to a greater activation of the lipases, followed by an increase in the transport of fatty acids to the liver, leading to a significant uptake of triglycerides by hepatocytes (Sass et al. 2005). This was not observed in the present study, at least in part, due to the fact that FFAs were probably previously consumed as energy substrate, as the animals presented uncompensated diabetes. Further studies are required on liver metabolism in this type 1 diabetes rats model.

In summary, exercise training at the aerobic/anaerobic metabolic transition attenuate body weight loss and reduced serum glucose concentrations of the diabetic rats. Liver total lipids as well as serum NAHS markers were not affected by alloxan diabetes or by the exercise training.

## CONCLUSIONS

The results suggest that physical training at the metabolic transition intensity attenuated the body weight loss as well as improved serum glucose homeostasis of diabetic animals. In addition, serum ALT and AST proved to be adequate markers of liver lipid levels in this animal model.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio and José Roberto R. Silva for technical assistance. This research is supported by Brazilian foundation FAPESP, CNPq and CAPES.

## REFERENCES

1. Alba LM, Lindor K. Review article: non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* (17),977-86, 2003.
2. American Diabetes Association Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* (29), S43-S48, 2006.
3. American Diabetes Association. ADA stand position: physical activity/exercise and diabetes mellitus. *Diabetes Care* (26),573-7, 2003.
4. American Diabetes Association. Position Statement: diabetes mellitus and exercise. *Diabetes Care* (25),S64-S68, 2006.
5. Aronson D, Violan MA, Dufresne SD, Zangen D, Fielding RA & Goodyear LJ. Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation* (99), 1251–1257, 1997.
6. Beneke R, Leithäuser RM, Hütler M. Dependence of the maximal lactate steady state on the motor pattern of exercise. *British Journal of Sports Medicine* (35),192-196, 2001.
7. Beneke R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *European Journal of Applied Physiology* (89),95-9, 2003.
8. Carew TE, Koschinsky T, Mayers SB, Steinberg D. A mechanism by which high-density lipoproteins may slow the atherogenic process. *Lancet* 1976, 1, 1315–1317.
9. Colca JR, Dailey CF, Palazuk BJ, Hillimen RM, Dinh DM, Melchior GW, Spilman CH. Pioglitazone hydrochloride inhibits cholesterol absorption and lowers plasma cholesterol concentrations in cholesterol-fed rats. *Diabetes* 40 (12), 1669–1674, 1991.

10. Contarteze RV, Manchado FD, Gobatto CA, Mello MA. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* (151),415-22, 2008.
11. Cortright RN, Dohm GL. Mechanisms by which insulin and contraction stimulate glucose transport. *Canadian Journal Applied Physiology* (22), 519 530, 1997.
12. Engels RC, Jones JB. Causes and elimination of erratic blanc 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, 1978.
13. Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (34),760-5, 2007.
14. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos, LA, Kokubun. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* (130),21-7, 2001.
15. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2006.
16. Hardin DS, Azzarelli B, Edwards J, Wigglesworth J, Maianu L, Brechtel G et al. Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: effects on blood flow and differential expression of GLUT 4 in skeletal muscles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (80), 2437–2446, 1995.

17. Harrison S, Neuschwander-Tetri B. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease* (8),861-879, 2004.
18. Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *International Journal Of Sports Medicine* (6),117-30, 1985.
19. Howlett, KF, Sakamoto K, Hirshman MF, Aschenbach WG, Dow M, White MF, Goodyear LJ. Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice. *Diabetes* 51(2),479-483, 2002.
20. Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* (99),330-7, 2005.
21. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Molecular Pathology* (56),1-10, 2003.
22. Leclercq I, Horsmans Y, Desager J P. Reduction in hepatic cytochrome P-450 is correlated to the degree of liver fat content in animal models of steatosis in the absence of inflammation.; *Journal of Hepatology* (28),410-416; 1998.
23. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* (2),216-26, 2008.
24. Luciano E, Lima FB. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício. *Revista de Ciências Biomédicas* (18),47-60, 1997.
25. Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CRO, Carvalheira JBC, Peres SB, Reis MAB, Saad MJA, Boschero AC, Velloso LA. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *European Journal of Endocrinology* (147),149-157, 2002.

26. Matthews JN, Douglas GA, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *British Medical Journal* (300),230-235, 1990.
27. Mukai M, Ozasa K, Hayashi K, Kawai K. Liver disorder and related physical conditions and life style. *Digestive Disorders and Sciences* (47),549-555, 2002.
28. Nogueira AR, Alves PM, Miranda RF, Boechat NL. Colesterol e outros fatores de risco cardiovasculares nos servidores da UFRJ. Prevalência e influência de variáveis. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* (55),227-32, 1990.
29. Peters T, Biamont GT, Doumas BT. Albumin in serum. Em Faulkner WR. Meites S, eds. *Selected Methods of Clinical Chemistry* (9),319, 1982.
30. Sas DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Digestive Diseases and Sciences* (50),171-80, 2005.
31. Sharma RD, Raghuram TC. Hypoglycemic effect of fenugreek seeds in noninsulin dependent diabetic subject. *Nutrition Research* (10), 731–739, 1990.
32. Ten S, Malaren N. Insulin resistance syndrome in children. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (89), 2596-39, 2004.
33. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35(11),1389- 94, 2002.
34. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* (27),1047-53, 2004.

Anexo 2:

**INSULINA PANCREÁTICA DE RATOS DIABÉTICOS TIPO 1 SUBMETIDOS A UM  
PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO INDIVIDUALIZADO**

**Título resumido**

**Insulina pancreática, diabetes e exercício**

Leandro Pereira de Moura<sup>1</sup>, Ricardo José Gomes<sup>1,2</sup>, José Alexandre Curiacos de Almeida Leme<sup>1</sup>, Fabrício Azevedo Voltarelli<sup>1,3</sup>, Carla Ribeiro<sup>1</sup>, Rodrigo Ferreira de Moura<sup>1</sup>, Michel Barbosa de Araújo<sup>1</sup>, Eliete Luciano<sup>1</sup> e Maria Alice Rostom de Mello<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista, Departamento de Educação Física – Rio Claro/SP, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Educação Física – Santos/SP, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Educação Física – Cuiabá/MT, Brasil.

Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida 24ª n° 1515, Caixa Postal 199, Bela Vista, Rio Claro, CEP: 13506-900, SP, Brasil.

Correspondência para: Leandro Pereira de Moura. Departamento de Educação Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida 24ª n° 1515, Caixa Postal 199, Bela Vista, Rio Claro, CEP: 13506-900, SP, Brasil.

## RESUMO

Visto que o diabetes *mellitus* é considerado um problema de saúde pública mundial, o presente estudo objetivou avaliar tolerância à glicose oral (TTGo) e concentrações de insulina pancreática (CIP) de ratos diabéticos tipo 1 submetidos a um protocolo de treinamento físico individualizado. Foram utilizados 40 ratos Wistar adultos, onde metade foi induzida ao diabetes por meio de injeção endovenosa de aloxana (32mg/Kg), divididos em quatro grupos (10/grupo): Controle Sedentário (CS); Controle Treinado (CT); Diabético Sedentário (DS) e Diabético Treinado (DT). O treinamento físico consistiu de natação, 1h/dia, 5dias/semana, durante 8 semanas, com sobrecarga equivalente à 90% da transição metabólica aeróbia/anaeróbia determinada no início do experimento. Os ratos dos grupos DS e DT apresentaram redução de peso corporal em relação aos controles, a qual foi menos acentuada no grupo DT. As ingestões hídrica e alimentar aumentaram nos grupos diabéticos em relação aos controles. Durante o TTGo, os valores de área sob a curva glicêmica dos grupos diabéticos foram superiores aos dos controles. O treinamento físico atenuou esta elevação. Os grupos diabéticos apresentaram CIP reduzida quando comparados aos grupos controles. O protocolo de treinamento físico empregado, embora não tenha alterado a CIP, melhorou a homeostase glicêmica e atenuou a perda de peso corporal dos animais diabéticos.

Palavras – chaves: diabetes *mellitus*, treinamento físico, insulina pancreática.

## PANCREATIC INSULIN OF TYPE I DIABETIC RATS SUBJECTED TO AN INDIVIDUALIZED EXERCISE-TRAINING PROTOCOL

## **ABSTRACT**

Since diabetes *mellitus* is considered a world public health problem, the present study aimed to evaluate oral glucose tolerance (TTGo) and pancreatic insulin concentration (PIC) of type I diabetic rats subjected to an individualized exercise training protocol. A total of 40 adult Wistar rats were used, half of which induced to diabetes by alloxan (32mg/kg) endovenous injection, and divided into four groups (10/group): Sedentary Control (SC); Trained Control (TC); Sedentary Diabetic (SD); and Trained Diabetic (TD). The physical training consisted of swimming, 1h/day, 5days/week, during 8 weeks, supporting overload equivalent to 90% of the individual anaerobic/aerobic metabolic transition determined at the beginning of the experiment. The rats of SD and TD groups presented body weight reduction in relation to controls, which was less accentuated in TD group. Water and food ingestion increased in the diabetic groups in relation to controls. The areas under the serum glucose curve during the GTTo of diabetic groups were higher than the controls. Physical training attenuated this elevation. The diabetic groups showed reduced PIC when compared to both control groups. The physical training protocol employed improved glucose homeostasis and attenuated the body weight loss of diabetic animals but did not alter pancreatic insulin concentration.

Key words: diabetes mellitus, physical training, pancreatic insulin

**INSULINA PANCREÁTICA DE RATOS DIABÉTICOS TIPO 1 SUBMETIDOS A UM  
PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO INDIVIDUALIZADO**

## INTRODUÇÃO

De acordo com a organização mundial de saúde, em 2009 havia cerca de 170 milhões de diabéticos em todo o mundo e a estimativa para 2030 é que esse número dobre (Chan e tal., 2009). O diabetes *mellitus* (DM) é caracterizado pela elevação da concentração de glicose circulante, em função da deficiência na secreção (diabetes *mellitus* tipo 1 - DM1) ou comprometimento na ação periférica da insulina (diabetes *mellitus* tipo 2 - DM2) (The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1997).

A insulina é um hormônio anabólico que, após interação com seu receptor de membrana específico, estimula a captação de glicose pelas células por meio de proteínas integrais de membrana, denominadas GLUTs. Tal evento regula a homeostase glicêmica, estimula a lipogênese hepática e nos adipócitos, reduz a lipólise bem como regula o *turnover* proteico (Sabetsky & Ekblom, 2010). A caracterização do DM1, ou insulinopenia, deu-se início na década de 1950, quando Wrenshall observou que o pâncreas de jovens com menos de 20 anos de idade, acometidos pelo diabetes, apresentava cerca de 40-50% menos insulina em relação aos indivíduos normais (White, 1997).

Pelo fato de existirem limitações nas pesquisas com seres humanos, modelos animais tornaram-se importantes no estudo do diabetes, por permitir avaliações mais profundas e detalhadas das causas e das consequências da doença. Para a indução química do DM1 em ratos, a aloxana é comumente utilizada no meio científico, uma vez que essa droga age de maneira eficaz na destruição das células beta pancreáticas, causando significativa diminuição de insulina circulante nos animais (Boquist, 1977; Lenzen, 2007; Szkudelski, 2001).

A atividade física é considerada de grande importância para o tratamento do DM (American Diabetes Association, 2006). Estudos usando técnicas de biologia molecular mostram que o treinamento físico induz aumento da atividade da tirosina-quinase dos receptores de insulina, aumento da translocação dos transportadores de glicose do músculo esquelético (GLUT-4), aumento da fosforilação dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) e de sua associação à PI3-kinase independente da insulina, demonstrando que a contração muscular não necessita desse hormônio para absorver glicose circulante e promover melhora da homeostase glicêmica (Cortright, 1997; Luciano et al., 2002).

A identificação da intensidade de esforço no exercício é de extrema importância para a prescrição de atividade física. Um dos principais biomarcadores empregados para a determinação dessa intensidade é a concentração sanguínea de lactato. No início do exercício existe elevação da concentração de lactato, até que o metabolismo aeróbio tenha condições de suprir as necessidades energéticas do exercício. Após esse ponto, em exercício moderado, a concentração sanguínea de lactato se estabiliza, sugerindo que as taxas de produção muscular do substrato e de remoção do sangue circulante encontram-se em equilíbrio. Esta fase de equilíbrio entre produção e remoção de lactato foi denominada máxima fase estável de lactato (MFEL), e indica a maior intensidade de esforço onde o metabolismo aeróbio é o principal responsável pela energia necessária ao esforço (Mader & Heck, 1986; Harnish et al., 2001). A MFEL é considerada, por muitos autores, a identificação individual mais fidedigna da transição da predominância dos metabolismos aeróbio e anaeróbio durante o exercício (Billat et al., 2003; Beneke, 2003).

Estudos dos efeitos metabólicos do exercício em ratos são frequentemente questionados, devido à falta da informação sobre a intensidade do esforço executado pelos

animais durante o exercício. Por esta razão, em nosso laboratório, foi estabelecido um protocolo para a determinação individual da intensidade de esforço equivalente à MFEL durante exercício de natação em ratos eutróficos (Gobatto et al., 2001).

São escassas, na literatura, informações sobre qual o melhor protocolo de exercício a ser empregado para portadores de DM1. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de um protocolo de treinamento individualizado de natação, em intensidade equivalente a 90% da MFEL, sobre tolerância à glicose e concentrações de insulina pancreática e sérica de ratos diabéticos aloxânicos.

## **Materiais e Método**

### Animais

Todos os experimentos envolvendo animais, no presente estudo, seguiram as resoluções impostas pelos procedimentos para o uso científico de animais (Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008). Foram utilizados 40 ratos adultos da linhagem Wistar, com 60 dias no início do experimento, provenientes do Biotério Central da UNESP - Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu e mantidos no biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física, Instituto de Biociências da UNESP – Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro-SP à temperatura ambiente de 21 °C e fotoperíodo de 12 horas de claro/escuro, em gaiolas de polietileno (cinco ratos por gaiola), alimentados com ração balanceada Purina® e água “*ad libitum*”.

### Indução do diabetes

Para indução do diabetes, os ratos, após jejum de 12 horas, receberam aloxana monoidratada Sigma (32mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5

injetada na veia dorsal peniana (Luciano & Lima, 1997). Após este procedimento, os animais foram colocados em gaiolas coletivas (cinco ratos por gaiola) recebendo, nas primeiras 24 horas, uma solução de água e glicose (15%) para evitar as complicações da hipoglicemia aloxânica (Lenzen, 2007). Sete dias após a administração da droga foi realizada uma avaliação da glicemia, a fim de se comprovar o estado diabético dos animais. Foram considerados diabéticos apenas aqueles animais que apresentaram valores de glicemia entre 200 e 600mg/dL. Os animais que apresentaram valores glicêmicos fora desse intervalo foram descartados. Como controles, foram usados ratos injetados com veículo (tampão citrato), para simulação do estresse sofrido pelos animais aloxânicos.

#### Grupos experimentais

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente, de acordo com a presença do diabetes e/ou realização do treinamento físico, nos seguintes grupos: Controle Sedentário (CS) - ratos não submetidos ao treinamento físico; Controle Treinado (CT) - ratos submetidos ao protocolo de treinamento físico de natação; Diabéticos Sedentários (DS) - ratos diabéticos aloxânicos não submetidos ao treinamento físico e Diabéticos Treinados (DT) - ratos diabéticos aloxânicos e submetidos ao protocolo de treinamento físico de natação.

#### Adaptação ao meio líquido

Todos os animais foram adaptados ao meio líquido, sendo os Grupos Treinados nos 15 dias que antecederam o início do período de treinamento e os Grupos Sedentários nos 15 dias que antecederam os testes de esforço para determinação da Máxima Fase Estável de Lactato. A adaptação consistiu em manter o animal na água rasa a uma temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 60 minutos, cinco dias por semana, durante duas semanas. O propósito da adaptação foi

reduzir o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado na água (Voltarelli et al., 2002).

#### Máxima Fase Estável de Lactato

A Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) equivale à mais alta concentração de lactato sanguíneo onde sua entrada na circulação é compensada pela remoção durante exercícios com cargas constantes (Heck et al., 1985). Sua determinação tem sido útil na prescrição de exercícios e na avaliação do condicionamento aeróbio, tanto de seres humanos como de modelos animais. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu um protocolo para a determinação da MFEL para ratos durante exercício de natação (Gobatto et al., 2001, Mota et al., 2008), o qual foi utilizado por nós no presente estudo.

Para tal determinação, os animais previamente adaptados ao meio líquido foram submetidos a vários testes de natação suportando sobrecargas constantes e crescentes em relação ao peso corporal, (4%, 5% e 6% p.c), em dias separados, com intervalos de 48 horas entre eles, até que não fosse mais observada estabilização das concentrações de lactato sanguíneo durante a sessão de exercício. Cada teste consistiu de 25 minutos de natação contínua com sobrecarga atada ao dorso do animal (mochila contendo chumbo) e de coleta sanguínea (25 $\mu$ L) utilizando capilares heparinizados e calibrados, por meio de pequeno e único corte na extremidade da cauda do animal, a cada 5 minutos, para a determinação das concentrações de lactato sanguíneo. A concentração de lactato sanguíneo foi determinada pelo método enzimático, proposto por Engels (1978). O critério de estabilização empregado foi a diferença entre os valores de concentração de lactato sanguíneo entre 10 e 25 minutos de exercício igual ou inferior a 1,0mM (Gobatto et al., 2001).

### Protocolo de treinamento

O protocolo de treinamento consistiu de exercício de natação por 60 minutos diários, cinco dias por semana, durante oito semanas ininterruptas. Após um período de adaptação de 15 dias, os animais nadaram suportando uma sobrecarga de chumbo atada ao tórax, equivalente a intensidade de 90% da transição metabólica individual obtida pelo teste da MFEL ao início do experimento. As sessões de natação foram realizadas em recipiente de amianto (100cm de comprimento, 70cm de largura e 60cm de altura), contendo água numa profundidade de 40cm com o intuito de evitar que os animais apoiassem a cauda no fundo do recipiente e/ou saltassem. A temperatura da água foi controlada por meio de um aquecedor elétrico e mantida em  $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### Avaliações gerais:

Todos os animais tiveram peso corporal e ingestões alimentar e hídrica registrados uma vez por semana e os resultados foram analisados através do cálculo das áreas sob as curvas dessas variáveis ao longo de todo o experimento pelo método trapezoidal (Mathews et al., 1990) ( *software* ORIGIN® 6.0).

### Teste de tolerância à glicose -TTGo

O TTGo foi realizado com os animais na última semana do experimento, após um período de 15 horas de jejum. Uma primeira coleta de sangue foi feita por meio de um único corte na extremidade da cauda do animal (tempo 0). Em seguida, uma solução de glicose a 20% (2 g/Kg de peso) foi administrada aos ratos através de sonda gástrica de polietileno. Amostras de sangue foram coletadas após 30, 60 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados (25 $\mu\text{L}$ ), visando a determinação das concentrações de glicose. As concentrações de

glicose sanguínea foram determinadas pelo método glicose-oxidase, utilizando *kits* comerciais (Laborlab®). Os resultados foram analisados através da determinação das áreas sob as curvas glicêmicas durante o teste pelo método trapezoidal (Matthews, 1990) ( *software* ORIGIN® 6.0).

#### Obtenção de material biológico

Ao final do experimento e transcorridas 48 horas após a última avaliação "in vivo" e em repouso, os animais foram anestesiados com CO<sub>2</sub> e subsequentemente exsanguinados para que fossem coletadas amostras de sangue visando a separação do soro para dosagens de: glicose, pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase (Henry et al., 1974), e insulina, por radioimunoensaio (Herbert et al., 1965). O pâncreas foi extirpado por inteiro para pesagem, macerado e utilizado para a determinação da concentração de insulina (Malaisse, 1967).

#### Análise estatística

O tratamento estatístico foi realizado primeiramente pela análise de normalidade da distribuição dos dados (SHAPIRO-WILK) seguido de análise de variância (ANOVA) de uma entrada, com aplicação de teste “*post-hoc*” de Bonferroni, onde apropriado. Em todos os casos, o nível de significância foi estabelecido em 5%.

## **RESULTADOS**

#### Resultados após a indução ao diabetes

Com o intuito de adotar uma linha de base em relação ao peso corporal e ingestões hídrica e alimentar entre os grupos, logo após a indução ao diabetes, os devidos dados foram

analisados. Observou-se que os grupos diabéticos apresentaram valores de peso corporal menores em relação aos grupos controles. No que refere as ingestas alimentar e hídrica, os grupos diabéticos apresentaram valores maiores quando comparados aos grupos controles, mas os grupos Diabéticos (DS e DT) assim como os Controles (CS e CT) não diferiram entre si (Tabela 1).

No que se refere à determinação da MFEL dos animais ao início do experimento, não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 1. Peso corporal (gramas), ingestão hídrica (ml/100g de rato) e alimentar (g/100g de rato) após a indução ao diabetes.

	<b>CS</b>	<b>CT</b>	<b>DS</b>	<b>DT</b>
<b>Peso corporal</b>	439,96 ± 31,18	468,85 ± 42,99	340,14 ± 39,57 <sup>a</sup>	342,2 ± 34,23 <sup>a</sup>
<b>Ingestão hídrica</b>	9,51 ± 2,01	6,33 ± 0,47	61,20 ± 23,54 <sup>a</sup>	57,33 ± 9,69 <sup>a</sup>
<b>Ingestão alimentar</b>	6,33 ± 0,26	5,50 ± 0,39	12,06 ± 4,21 <sup>a</sup>	15,07 ± 2,57 <sup>a</sup>

Resultados expressos com média ± desvio padrão (n= 10 animais/grupo). CS: Controle Sedentário, CT: Controle Treinado, DS: Diabético Sedentário e DT: Diabético Treinado. Diferença estatística (ANOVA, p<0,05). <sup>a</sup> : diferente dos grupos controles.

Tabela 2. Concentração sanguínea de lactato (Mmol/L) e sobrecarga (% do peso corporal) equivalente à Máxima Fase Estável de Lactato no início do experimento.

	<b>Controle</b>	<b>Diabético</b>
--	-----------------	------------------

<b>Lactacidemia</b>	4,0 ± 0,60	4,5 ± 0,50
<b>Sobrecarga</b>	6,4 ± 0,4	5,5 ± 0,4

Resultados expressos com média ± desvio padrão (n= 10 animais/grupo). Não foi observada diferença entre os grupos (teste t *student* não pareado; p<0,05)

### Resultados ao final de oito semanas de experimento

Os animais pertencentes aos grupos diabéticos apresentaram redução do peso corporal durante o experimento quando comparados aos controles. O grupo DT mostrou redução menos acentuada se comparado ao DS (Figura 1). Em relação às ingestões hídrica e alimentar, os grupos diabéticos apresentaram valores maiores quando comparados aos grupos controles (Figuras 2 e 3, respectivamente).

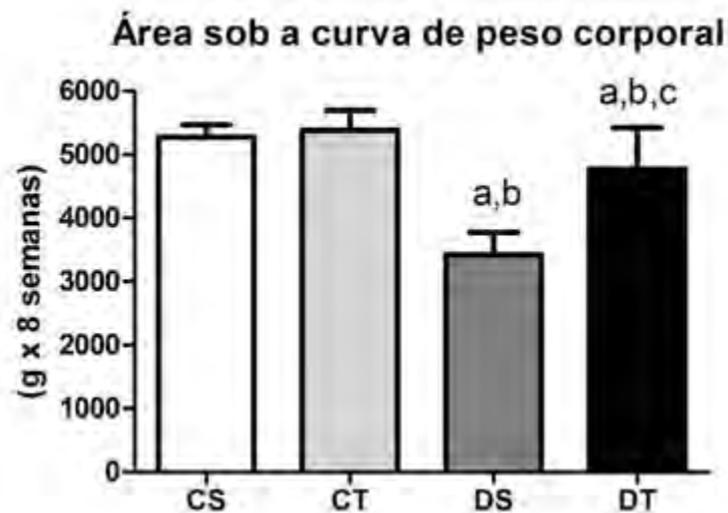


Figura 1. Área sob a curva de peso corporal durante oito semanas de experimento. Resultados expressos com média ± desvio padrão (n= 10 animais por grupo). CS: Controle Sedentário, CT: Controle Treinado, DS:

Diabético Sedentário e DT: Diabético Treinado. Diferença estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>: diferente de CS, <sup>b</sup>: diferente de CT, <sup>c</sup>: diferente de DS.

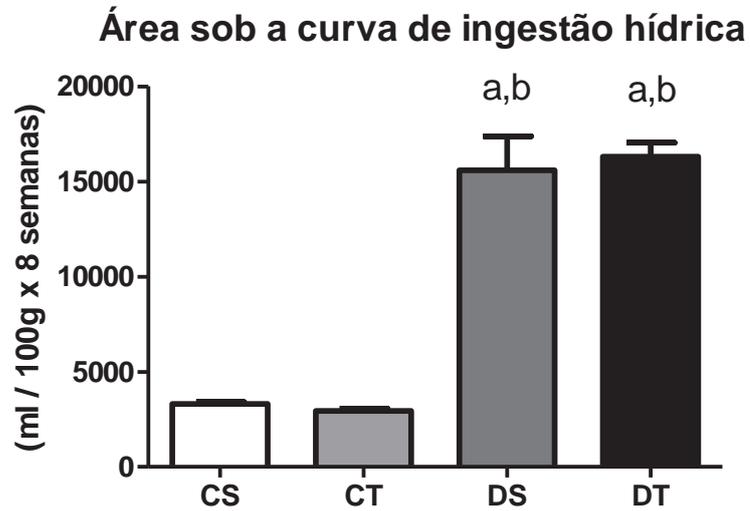


Figura 2. Área sob a curva de ingestão hídrica durante as oito semanas de experimento. Resultados expressos com média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 10$  animais por grupo). CS: Controle Sedentário, CT: Controle Treinado, DS: Diabético Sedentário e DT: Diabético Treinado. Diferença estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>: diferente de CS, <sup>b</sup>: diferente de CT.

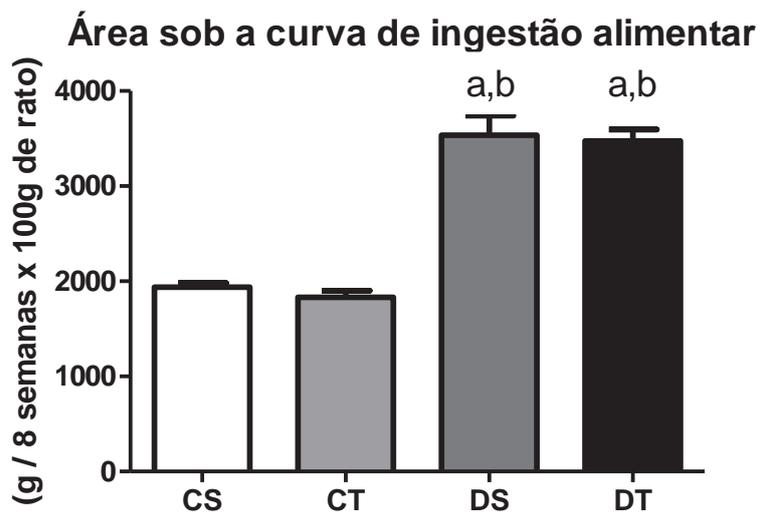


Figura 3. Área sob a curva de ingestão alimentar durante as oito semanas de experimento. Resultados expressos com média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 10$  animais por grupo). CS: Controle Sedentário, CT: Controle Treinado, DS:

Diabético Sedentário e DT: Diabético Treinado. Diferença estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>: diferente de CS, <sup>b</sup>: diferente de CT.

Em relação ao teste de tolerância à glicose oral (TTGo), a área sob a curva de glicose sérica dos animais diabéticos mostrou-se superior se comparados aos controles. Quando a comparação foi feita apenas entre os grupos diabéticos, os animais sedentários apresentaram maiores valores de área sob a curva de glicose em relação aos animais treinados. (Figura 4).

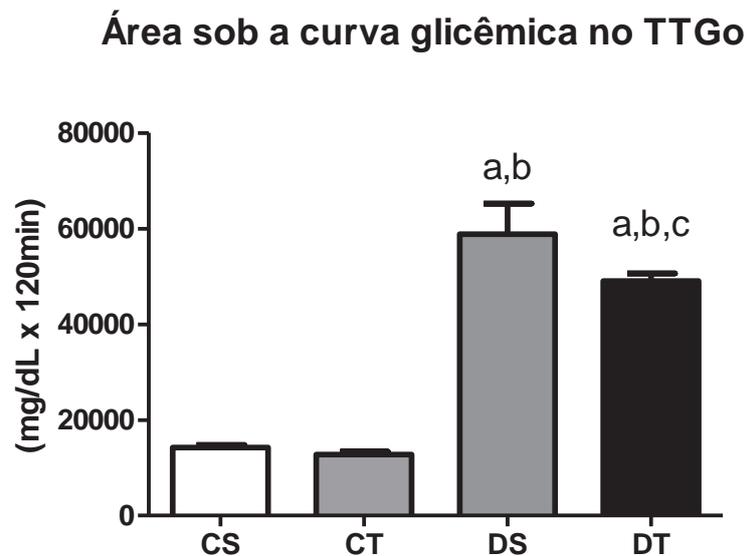


Figura 4. Área sob a curva glicêmica durante teste de tolerância oral à glicose (TTGo) ao final das oito semanas de experimento. Resultados expressos com média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 10$  animais por grupo). CS: Controle

Sedentário, CT: Controle Treinado, DS: Diabético Sedentário e DT: Diabético Treinado. Diferença estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>: diferente de CS, <sup>b</sup>: diferente de CT, <sup>c</sup>: diferente de DS.

A insulina sérica dos animais diabéticos, ao final do experimento, mostrou-se mais baixa em relação aos controles (Tabela 3). A glicemia dos ratos diabéticos foi superior à dos controles, sendo que o grupo DT apresentou redução em comparação ao DS (Tabela 3).

Tabela 3. Insulina ( $\mu\text{U/L}$ ) e glicemia séricas ( $\text{mg/dL}$ ) ao final do experimento.

	CS	CT	DS	DT
<b>Insulina</b>	663,70 $\pm$ 223,10	821,20 $\pm$ 332,60	63,40 $\pm$ 16,30 <sup>a</sup>	66,20 $\pm$ 26,10 <sup>a</sup>
<b>Glicose</b>	102,00 $\pm$ 10,00	105,00 $\pm$ 9,00	323,00 $\pm$ 12,00 <sup>a</sup>	301,00 $\pm$ 13,00 <sup>a</sup> b

Resultados expressos com média  $\pm$  desvio padrão (n= 10 animais/grupo). CS: Controle Sedentário, CT: Controle Treinado, DS: Diabético Sedentário e DT: Diabético Treinado. Diferença estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>: diferente dos grupos controles, <sup>b</sup>: diferente do grupo DS.

Os animais pertencentes aos grupos diabéticos apresentaram concentrações de insulina pancreáticas mais baixas se comparados aos grupos controles (Figura 5).

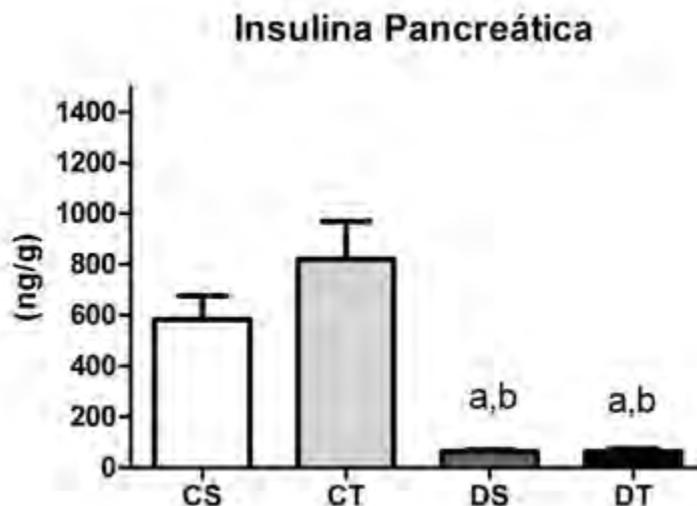


Figura 5. Insulina Pancreática ao final das oito semanas de experimento. Resultados expressos com média  $\pm$  desvio padrão (n= 10 animais por grupo). CS: Controle Sedentário, CT: Controle Treinado, DS: Diabético Sedentário e DT: Diabético Treinado. Diferença estatística (ANOVA,  $p < 0,05$ ). <sup>a</sup>: diferente de CS, <sup>b</sup>: diferente de CT.

## DISCUSSÃO

De acordo com Lenzen (2007), a administração de aloxana em ratos provoca quadro diabético semelhante ao encontrado em humanos, incluindo hiperglicemia, perda de peso, polifagia e polidipsia. No presente estudo, a administração de aloxana através da veia peniana dorsal do animal seguiu o procedimento preconizado por Luciano & Lima (1997), o qual se mostrou bastante eficiente na indução do quadro diabético.

No presente estudo, verificou-se que os animais pertencentes aos grupos diabéticos apresentaram perda acentuada de peso em relação aos controles, após a indução ao diabetes como no final do experimento. Tal fato pode ser devido, pelo menos em parte, ao hipoinsulinismo, o qual conduz a um estado catabólico de proteínas e gorduras, além de implicar em glicosúria associada à poliúria (kimbal., 1994).

A Associação Americana de Diabetes (2006) enfatiza que a falta de controle da homeostase glicêmica pode levar, em longo prazo, a diversas disfunções, tais como: retinopatia, nefropatia, neuropatias periféricas autonômicas, cetoacidose e síndrome hiperosmolar não-cetótica. Esta última gera aumento excessivo da ingestão hídrica, fato observado em nosso estudo desde o início até o final do experimento e que não foi revertido pelo treinamento físico. No presente estudo, foram utilizados animais apresentando características do diabetes tipo 1 e não tratados com insulina. A hipoinsulinemia eleva de forma excessiva a ingestão alimentar, pois credita-se à insulina uma inibição da atividade

neuronal no núcleo arqueado do hipotálamo, o qual coexpressa tanto neuropeptídeo Y como peptídeos relacionados à cepa agouti (AGRP), moléculas estas que potencialmente estimulam o consumo alimentar (Asakawa et al., 2007). Outra hipótese para a elevação excessiva da ingestão alimentar, observada no presente estudo, pode ser a ocorrência de hipoleptinemia, tanto em termos de concomitância com a hipoinsulinemia quanto de sobreposição (Hidaka et al., 2001).

Estudos realizados por Dong et al., (2006) mostraram que o hormônio leptina aumentou a expressão de neuropeptídeo Y (NPY) bem como reduziu a expressão do hormônio estimulador dos melanócitos ( $\alpha$ -MSH) em ratos diabéticos induzidos por estreptozitocina. Além disto, em ratos *knock-out* para grelina, a indução de diabetes não aumentou a expressão de NPY. Ainda, a utilização deficiente de glicose pelas células do núcleo ventromedial do hipotálamo também contribui para a hiperfagia diabética. Quando a utilização de glicose no núcleo ventromedial do hipotálamo é baixa, sua atividade é diminuída, acarretando em sensação de fome. Os animais pertencentes aos grupos diabéticos, em nosso estudo, apresentaram hiperfagia diabética desde o início do experimento até seu final, ao passo que o treinamento físico realizado não foi capaz de reverter essa condição.

A determinação da MFEL foi necessária, no início do experimento, para que a intensidade do esforço durante os treinos fosse estabelecida. A MFEL equivale à mais alta concentração sanguínea de lactato onde sua entrada na circulação é equivalente à remoção durante o exercício com carga constante (Heck et al., 1985). Há algum tempo, nosso grupo de pesquisa (Gobatto et al., 2001) desenvolveu um estudo para a determinação da MFEL de ratos saudáveis durante o exercício de natação e permanece utilizando-o extensivamente. Nesse estudo, a MFEL foi obtida na carga de 6% do peso corporal à concentração sanguínea de lactato de

5,5 mmol/l de sangue. O mesmo foi observado no presente estudo. Ainda, Oliveira et al., (2007), determinaram a transição aeróbia/anaeróbia de ratos diabéticos pelo método do lactato mínimo e encontraram valores médios de lactato em 6,9 mmol/L, os quais não corroboram os resultados obtidos no presente estudo, onde o limiar foi encontrado em valores próximos de 4,5 mmol/L. Isso pode ser explicado, pelo menos em parte, pela utilização de diferentes protocolos de teste (MFEL *versus* lactato mínimo). A MFEL utiliza vários testes, realizados em dias diferentes, com intensidades distintas, mas fixas a cada teste (4%, 5% e 6% p.c), até que se atinja a estabilização da concentração de lactato sanguíneo entre o 10º e o 25º minuto de exercício (Gobatto et al., 2001).

Para diagnosticar o diabetes, em seres humanos, é realizado o teste de tolerância à glicose oral (TTGo), o qual fornece indicativos quanto à tolerância à glicose. Pacientes diabéticos apresentam menor tolerância à glicose, ao passo que a prática de atividade física regular pode amenizar esse quadro. Em relação aos resultados obtidos no presente estudo, observou-se intolerância à glicose nos grupos diabéticos se comparados aos controles. Por outro lado, os animais pertencentes ao grupo DT apresentaram maior tolerância à glicose em relação aos animais diabéticos sedentários, mostrando o efeito positivo do exercício físico sobre a doença (Eriksson, 1997; Luciano & Mello, 1998). Em contrapartida, em estudo desenvolvido por Oliveira et al., (2007), onde ratos diabéticos aloxânicos foram treinados por natação na intensidade da transição metabólica determinada pelo teste do lactato mínimo, nenhum efeito do treinamento sobre a tolerância à glicose foi observado. Isso reforça a importância do estabelecimento da adequada intensidade do esforço durante o exercício no treinamento de diabéticos.

Numa tentativa de ampliar as informações sobre os efeitos do treinamento individualizado em intensidade equivalente a 90% da MFEL, analisamos a concentração de insulina no pâncreas dos animais ao final do experimento. Os resultados referentes à concentração de insulina pancreática dos animais diabéticos (DS e DT) confirmam que a administração de aloxana resultou em destruição das células beta, conduzindo à insulinopenia (Lenzen, 2007). O treinamento físico aplicado para os animais diabéticos não foi capaz de alterar esse quadro.

Resumidamente, o treinamento físico em intensidade equivalente a 90% da MFEL, embora não tenha alterado os estoques pancreáticos de insulina, foi eficaz em melhorar a homeostase glicêmica, fazendo com que os tecidos utilizem a glicose como substrato energético na ausência de insulina e auxiliar na manutenção do peso corporal dos animais diabéticos, evitando a perda de peso acentuada.

## **CONCLUSÃO**

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo mostram que o treinamento físico realizado a 90% da intensidade da Máxima Fase Estável de Lactato:

- Não foi capaz de alterar os estoques pancreáticos de insulina tanto de ratos diabéticos como eutróficos;
- Atenuou a perda de peso corporal dos animais diabéticos;
- Foi eficaz em melhorar a homeostase glicêmica dos ratos diabéticos.

**REFERÊNCIAS:**

1. American Diabetes Association. (2006). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 29, S43–8
2. Asakawa, A., Toyoshima, M., Inoue, K., Koizume, A. (2007). *Ins2<sup>Akita</sup>* mice exhibit hyperphagia and anxiety behavior via the melanocortin system. *International Journal of Molecular Medicine*, 19, 649-652.
3. Beneke, R. (2003). Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *European Journal of Applied Physiology*, 89, 95-9.

4. Billat, V.L. Siverent, P., PY G., Korallsztein, J-P., Mercier J. (2003). The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *International Journal of Sports Medicine*, 33, 407-26.
5. Boquist, L. (1977). The endocrine pancreas in early alloxan diabetes. Including study of the alloxan inhibitory effect of feeding and some hexoses. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 85A, 219-29.
6. Chan, J.C., Malik, V., Jia, W. (2009). Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *JAMA*. 301, 2129-2140.
7. Cortright, R.N., Dohm, G.L. (1997). Mechanisms by which insulin and contraction stimulate glucose transport. *Canadian Journal Applied Physiology, Champaign*, 22, 519-30.
8. Dong, J. et al. (2006). Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology*, 147, 2634 - 42.
9. Engels, 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.
10. Eriksson, J., Taimela, S., Koivisto, V.A. (1997). Exercise and the metabolic syndrome. *Diabetologia*, 40, 125-35.
11. Gobatto, C.A., de Mello, M.A.R., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R.M., dos Santos, L.A., Kokubun E. (2001). Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming

- exercise *Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Biochemistry Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, 130,21-7.
12. Harnish, C.R., Swensen, T.C., Pate, R.P. (2001). Methods for estimating the maximal lactate steady state in trained cyclists. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 33, 1052-55.
  13. Heck, H., Mader, A., Hess, G., Mücke, S., Müller, R., Hollmann, W. (1985). Justification of the 4 mM/l lactate threshold. *International Journal of Sports Medicine*, 6, 117-30.
  14. Henry, R.J.W., O'Connell, R.F., Smith, Ed.R., Chanmugam, G., Rajagopa, A.K.I. (1974). Energy spectrum of H<sup>-</sup> in a strong magnetic field. *The American Physical Society*, 9, 329-31.
  15. 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.
  16. Hidaka, S., Yoshimatsu, H., Kondou, S., Oka, K., Tsuruta, Y., Sakino, H., Itateyama, E., Noguchi, H., Himeno, K., Okamoto, K., Teshima, Y., Okeda, T., Sakata, T. (2001). Hypoleptinemia, but not hypoinsulinemia, induces hyperphagia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Neurochemistry*, 77, 993-1000.
  17. Kimball, S.R., Vary, T.C., Jefferson, L.S. (1994). Regulation of protein synthesis by insulin. *Annual Review of Physiology*, 56, 321-48.
  18. Lenzen, S. (2007). Alloxan and streptozotocin diabetes. In: Peschke E (ed) *Endokrinologie III Vorträge im Rahmen des Projektes 'Zeitstrukturen endokriner*

- Systeme'. [Endocrinology III lectures within the 'time structures of endocrine systems' project framework]. Abhandlung der Sächs. Akad. Wiss., Mathnaturwiss Klasse, Verlag der Sächsischen Akademie der Wissenschaften, Leipzig, commissioned by S. Hirzel Verlag, Stuttgart/ Leipzig, 119–138.
19. Luciano, E., Carneiro, E.M., Carvalho, C.R.O., Carvalheira; J.B.C., Peres, S.B., Reis, M.A.B., Saad M.J.A., Boschero, A.C., Velloso, L.A. (2002). Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *European Journal of Endocrinology*, 147, 149-57.
  20. Luciano, E., Lima, F.B. (1997). Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício. *Revista de ciencias biomédicas.*, 18,47-60.
  21. 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.
  22. Mader, A., Heck, H. (1986). A theory of metabolic origin of the anaerobic threshold. *International Journal of Sports Medicine*, 7, 45-65.
  23. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Wright, P.H. (1967). Effect of fasting upon insulin secretion in the rat. *American Journal of Physiology*, 213, 843-848.
  24. 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.
  25. Mota, C.A., Ribeiro, C., Araujo, G.G., Araújo, M.B., Manchado, F.B., Voltarelli, F.A., Oliveira, C.A.M., Luciano, E., Mello, M.A.R. (2008). Exercise training in the

- aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. *BMC Endocrine Disorders (Online)*, 8, 11-24.
26. Oliveira, C.A.M., Luciano, E., Gomes-Marcondes, M.C.C., Mello, M.A.R. (2007). Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. *Journal of Diabetes Complications*, 21, 258-64.
27. Sabetsky, V., Ekblom, J. (2010). Insulin: a new era for an old hormone. *Pharmacological Research*, 61, 1-4.
28. Szkudelski, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*, 50, 536-546.
29. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. (1997). Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 20,1183-97.
30. Voltarelli, F.A., Gobatto, C.A., Mello, M.A.R. (2007). Determinação da transição metabólica através do teste do lactato mínimo em ratos desnutridos. *Revista da Educação Física (UEM)*, 18, 33-39.
31. 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, 1389-94.
32. White, M.F. (1997). The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia*, 40, 2-17.

33. Wrenshall, G.A., Bogoch, A., Ritchie, R. (1952). Extractable insulin of pancreas; correlation with pathological and clinical findings in diabetic and nondiabetic cases. *Diabetes*, 1, 87-107.

---

Maria Alice Rostom de Mello  
(Orientadora)

---

Leandro Pereira de Moura  
(Orientando)