



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Nathália Cristine Dias de Macedo

**AVALIAÇÃO DA PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO (NATAÇÃO) DE
INTENSIDADE MODERADA NO ESTRESSE OXIDATIVO, HORMÔNIOS
SEXUAIS E PROLIFERAÇÃO PANCREÁTICA DE RATAS DIABÉTICAS
PRENHES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (área de concentração: Tocoginecologia; com ênfase em Fisioterapia).

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

**Botucatu
2016**

Nathália Cristine Dias de Macedo

**AVALIAÇÃO DA PRÁTICA DE EXERCÍCIO FÍSICO
(NATAÇÃO) DE INTENSIDADE MODERADA NO ESTRESSE
OXIDATIVO, HORMÔNIOS SEXUAIS E PROLIFERAÇÃO
PANCREÁTICA DE RATAS DIABÉTICAS PRENHES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia (área de concentração: Tocoginecologia; com ênfase em Fisioterapia).

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Macedo, Nathália Cristine Dias.

Avaliação da prática de exercício físico (natação) de intensidade moderada no estresse oxidativo, hormônios sexuais e proliferação pancreática de ratas diabéticas prenhes / Nathália Cristine Dias Macedo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno
Capes: 40101150

1. Diabete. 2. Exercícios físicos. 3. Rato. 4. Prenhez. 5. Stress oxidativo. 6. Pâncreas - Doenças. 7. Natação.

Palavras-chave: Diabete; Exercício; Pâncreas; Prenhez; Rata.

Reze como se tudo dependesse de Deus. Trabalhe como se tudo dependesse de você!

(Cardeal Shellman)

**Dedico este trabalho aos meus pais e minhas irmãs, fontes de toda a
minha inspiração e vontade de vencer!**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que iluminou meus caminhos, me ajudou a vencer mais essa etapa e colocou em minha direção pessoas tão especiais. Sem Ele não sou nada!

Aos meus pais, Marcos Aurélio de Macedo e Elisa Angela Mendes Dias de Macedo, meus maiores incentivos, meus exemplos de vida. Muito obrigada pela generosidade, por cada palavra de carinho e ânimo, por cada oração feita a meu favor e por nunca desistirem de me ensinar o caminho correto. Essa vitória é de vocês!

Às minhas irmãs, Thaís, Carolina e Tauany, fontes da minha vontade de ser cada dia melhor. Vocês são o melhor da minha vida. Sem vocês eu nunca teria chegado até aqui.

Agradeço ao meu noivo, Rafael, que, com todo carinho, me incentivou a seguir em frente e superar mais essa etapa. Muito obrigada por todo amor, paciência e compreensão que tem me dedicado em todos esses anos e por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

Aos meus avós paternos, Joana Chaves de Macedo (in memorian) e Benedito Mario de Macedo (in memorian), e maternos, Maria das Dores Mendes Dias e Militão Máximo Dias, modelos nos quais procuro me espelhar sempre, a eles dedico um amor incondicional e eterno. Obrigada por me terem me ensinado a humildade em sua essência e, na sua simplicidade, me mostraram como ser nobre!

À toda minha família, avós, tios, primos, muito obrigada pelo carinho e pela alegria de todos os dias.

À minha grande amiga, Tuany, que, apesar da distância, está comigo em pensamento e orações e torceu por mim nesse percurso, obrigada por me acolher nos momentos de cansaço e me incentivar quando ficava mais difícil.

Aos meus amigos, Giovana, Ana Paula, Thyego, Fernanda e Luana, vocês são especiais! Obrigada por estar comigo nos momentos de angústia e sucesso. Vocês são parte dessa vitória!

Minha eterna gratidão á professora Dra. Ana Paula Morbio, que foi a primeira a acreditar no meu potencial e, não só me inspirou a seguir a carreira acadêmica durante a graduação, mas também me incentivou e me abriu muitas portas.

À minha orientadora, professora Dra. Débora Cristina Damasceno, que se tornou para mim uma referência de mulher, mãe e profissional. Muito obrigada pela confiança, pelo tempo e esforço dispensados, pelas palavras de incentivo. Você abriu as portas do seu laboratório e da sua casa para mim e eu tenho orgulho em dizer que um dia convivi com você e sua família. Sua paixão pela pesquisa é inspiradora!

À Dra. Yuri Karen Sinzato, uma pessoa ímpar, na qual busco inspirações para me tornar melhor em tudo faço e irei fazer daqui para frente. Muito obrigada pela confiança, pela paciência e por todos os ensinamentos.

Às “meninas da nataçãõ”, Ma. Aline Netto e Ma. Franciane Quintanilha Gallego, obrigada pela paciência, por toda a ajuda e pelos momentos que dividimos juntas. Vocês sabem exatamente como foi difícil, mas, enfim, veio a recompensa.

Às ex-alunas do laboratório Dra. Bruna Dallaqua Jacquie, Dra. Gabriela Marini Prata, Dra. Silvana Barroso Corvino e Dra. Isabela lessi, pelos ensinamentos, orientações, incentivo, amizade e dedicação. Muito obrigada pelo tempo dispensado em favor da minha formação.

Aos amigos do laboratório Aline Bueno, Ana Paula Martins de Campos, Bianca Cassettari, Fernanda Piculo, Joyce Vernini, Mariana Alvarez Arantes, Meire Camargo, Rafael Bottaro

Gelaleti, Rafayanne Queiroz e Thaigra Soares. Muito obrigada pelas conversas, risadas, ajuda, companheirismo e convivência de todos os dias.

Ao amigo Dr. Carlos Eduardo Meirelles dos Santos pela arte da estrutura dos tanques de natação, pela confecção do aparelho de anestesia, pela amizade e formação espiritual que, com tanto carinho e dedicação, me ofereceu durante esses anos.

Aos funcionários e amigos Talisia Moreto Colachiti, Carlos Roberto Gonçalves de Lima, Vitor Souza e Danilo Chaguri, obrigada pela amizade, ajuda técnica e auxílio na manutenção dos animais.

À Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia e ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela acolhida e concessão das dependências, ao Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO) em função do espaço físico e utilização dos aparelhos durante a realização deste trabalho e à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) pela atenção, apoio e profissionalismo.

Aos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Aparecida Benedita Vasques, Ligia Maria da Silva Rodrigues, Regina Célia Gamito e à Solange Sako Cagliari (secretária do programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia) pela dedicação e auxílios prestados.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação Janete Aparecida Herculano Nunes da Silva, Lilian Cristina Nunes, Diego Cezario Bovolim de Oliveira, Bruna Quirino Jorgetto, Vanessa Mores Braitte e Andreia Paula Longo Devede pela dedicação e serviços prestados.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP de Botucatu pela atenção, pelo auxílio na pesquisa bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

Ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP), especialmente ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente pela contribuição nas análises estatísticas.

Ao Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP de Botucatu pela acolhida e disponibilidade do espaço físico e equipamentos para a realização da técnica de imunoistoquímica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro e por acreditar no potencial desse estudo.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Nathália Cristine Dias de Macedo

**AVALIAÇÃO DA PRÁTICA DE NATAÇÃO DE INTENSIDADE
MODERADA NA PROLIFERAÇÃO PANCREÁTICA E NO
ESTRESSE OXIDATIVO DE RATAS DIABÉTICAS PRENHES**

(Título que será utilizado no artigo que será submetido à publicação)

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Botucatu
2016

RESUMO

Objetivo: Avaliar os marcadores de glicemia, proliferação e estresse oxidativo de ratas com diabetes moderado submetidas ao exercício físico (natação) de intensidade moderada durante a prenhez.

Método: Foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar*. O diabetes moderado foi induzido em recém-nascidos (RN) fêmeas no primeiro dia de vida (100 mg de *Streptozotocin*[®]/kg de peso corpóreo, via subcutânea). Para compor o grupo não diabético, os RN receberam o veículo em volume e período similares ao grupo diabético. Na fase adulta, todos os animais foram submetidos ao acasalamento e, confirmada a prenhez, foram distribuídos em quatro grupos: não diabético não exercitado, não diabético exercitado, diabético não exercitado e diabético exercitado. As ratas dos grupos submetidos à natação de intensidade moderada durante a prenhez carregaram cargas equivalentes a 4% do peso corpóreo. No 18º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas e mortas para análise do desempenho reprodutivo, marcadores bioquímicos e de estresse oxidativo e análises morfométrica e imunoistoquímica do pâncreas materno.

Resultados: A natação alterou o metabolismo glicêmico de forma positiva e melhorou a capacidade de defesa antioxidante em ratas não diabéticas, contribuindo para o bom desempenho reprodutivo materno. Em animais diabéticos, a natação não alterou a função pancreática, aumentou danos musculares, diminuiu a defesa antioxidante, causou estresse oxidativo, mas não causou prejuízo ao desenvolvimento fetal.

Conclusão: Portanto, a natação de intensidade moderada para ratas não diabéticas foi benéfica. Essa mesma condição de exercício estabelecida para animais saudáveis, no entanto, não deveria ser aplicada a ratas diabéticas frente às diferentes respostas do organismo apresentadas em nosso estudo após a aplicação do exercício físico.

Palavras-chave: diabetes; prenhez; rata; exercício; estresse oxidativo; pâncreas.

ABSTRACT

Objective: To evaluate glycemic, proliferation and oxidative stress markers in moderate diabetic rats submitted to moderate intensity swimming during pregnancy.

Methods: Wistar rats were used. At birth, female rats were assigned either to control or diabetic group (100 mg of streptozotocin/Kg, subcutaneously). At adulthood, the female rats were mated and confirmed the pregnancy, were divided into four groups: nondiabetic non exercised, nondiabetic exercised, diabetic non exercised and diabetic exercised. The exercised groups carried loads equivalent to 4% of body weight. The rats were used for analysis of reproductive performance, oxidative stress biochemical markers and morphometric and immunohistochemical analysis of endocrine pancreas.

Results: Swimming altered carbohydrate metabolism positively and improved the antioxidant defense in nondiabetic rats, which contributes to good maternal reproductive performance. In diabetic animals, swimming did not affect pancreatic function, increased muscle damage, decreased antioxidant defense, but did not cause damage to fetal development.

Conclusions: Therefore, swimming moderate exercise was beneficial to nondiabetic rats. This same exercise conditions established for healthy animals, however, should not be applied to diabetic rats because it have different responses presented in our study after the implementation of the exercise.

Keywords: diabetes; pregnancy; rat; exercise; oxidative stress; pancreas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sequência experimental de ratas <i>Wistar</i> . A. Antes da prenhez; B. Durante a prenhez.....	20
Figura 2. Fluxograma do número de animais utilizados no experimento. A. Grupo não diabético; B. Grupo de ratas com diabete moderado.....	24
Figura 3. Teste oral de tolerância à glicose no 17 ^º dia de prenhez de ratas não diabéticas (A) e diabéticas (B) submetidas ou não ao exercício físico de natação. (C) Área sob a curva de glicemia durante o teste oral de tolerância à glicose.....	25
Figura 4. Desempenho reprodutivo materno de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez.....	26
Figura 5. Área das ilhotas pancreáticas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez.....	27
Figura 6. Imunomarcção para insulina no pâncreas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez.....	28
Figura 7. Imunomarcção para glucagon no pâncreas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez.....	29
Figura 8. Imunomarcção para PDX-1 no pâncreas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez.....	30
Figura 9. Imunomarcção para KI-67 no pâncreas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biomarcadores do metabolismo de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez.....	32
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
MATERIAIS E MÉTODO	18
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	37
AGRADECIMENTOS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

INTRODUÇÃO

O pâncreas endócrino é um “pequeno órgão” que é essencial para a homeostase da glicose. Possui cinco tipos de células, sendo que a célula beta (β) é a mais importante. Esta célula sintetiza e secreta a quantidade necessária de insulina para um ótimo controle da homeostase da glicose. O pâncreas era considerado um órgão estático e lento, mas é reconhecido que as células β respondem de forma dinâmica ao aumento sistêmico na demanda de insulina, ou seja, à demanda metabólica aumentada, e a massa dessas células é determinada pelo seu número e tamanho (Rieck & Kaestner, 2010). O aumento da demanda de insulina leva à expansão da massa funcional de células β em roedores e possivelmente em humanos, como mostrado na gravidez (Sorenson & Brielje, 1997), obesidade (Kloppel, 1985), resistência à insulina (Bruning, 1997) e idade avançada (Matveyenko *et al.*, 2008). As mudanças compensatórias na massa de células β são controladas pelo aumento no tamanho das células e ajustes na proporção entre a proliferação e apoptose de células β pancreáticas. Com relação à sobrevivência das células β , existe um fator de transcrição denominado *Pancreatic Duodenal Homeobox 1* (PDX-1) que possui papel central nestas células, já que é um dos reguladores-chave da expressão de genes da insulina e é essencial para o desenvolvimento do pâncreas, mais provavelmente pela determinação na maturação e diferenciação de células precursoras pancreáticas que são comuns ao desenvolvimento do intestino (Jonsson *et al.*, 1994; Kim & Hebrok, 2001).

Evidências sugerem que uma diminuição na taxa proliferativa é uma característica essencial na patogênese do diabete. Na gravidez, se houver falta de reserva funcional adequada no pâncreas endócrino, manifesta-se o *Diabetes mellitus* (DM) gestacional ou exacerba-se o DM tipo 1 e o tipo 2 (Parsons *et al.*, 1992; Butler *et al.*, 2010). Pelo fato da hiperglicemia oriunda do diabete tornar-se crônica, a glicose em excesso leva a efeitos deletérios nas estruturas e funções de órgãos, dentre eles as ilhotas pancreáticas. Diversas vias bioquímicas e mecanismos de ação da glicotoxicidade têm sido sugeridos, como a auto-oxidação da glicose, glicação de proteínas, formação de sorbitol, metabolismo das hexosaminas e fosforilação oxidativa, os quais podem causar danos às células β . De forma geral, todas estas vias apresentam em comum a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, em excesso, resulta em estresse oxidativo (Robertson, 2004). Entretanto, em níveis não tóxicos, algumas vias de formação de ERO podem promover a proliferação e a sobrevivência celular (Chiarugi & Fiaschi, 2007; Blanchetot & Boonstra, 2008).

Para controlar a hiperglicemia, a associação dieta e insulina é o recurso terapêutico mais utilizado. No entanto, a prática de exercício físico associado à dieta passou a ter destaque na terapia anti-hiperglicemiante do binômio DM e gravidez (Brankston *et al.*, 2004). Dentre os marcadores bioquímicos mais utilizados para se estudar os efeitos metabólicos decorrentes da prática de exercício físico, a enzima citrato sintase é empregada para estimar a eficácia do treinamento aeróbio (Newsholme & Leech, 1989; Henriksson, 1992; Kriketos *et al.*, 1995) e para avaliar o metabolismo oxidativo (Basset & Howley, 2000). A citrato sintase realiza o processo de catalisação da primeira reação do Ciclo de Krebs na mitocôndria, na qual ocorre a condensação do acetil coenzima A com o oxaloacetato formando citrato e coenzima A. O aumento da atividade das enzimas oxidativas mitocondriais é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbio (Halliwell & Gutteridge, 1998). Outro marcador utilizado é a creatina quinase (CK), uma enzima que caracteriza danos musculares quando encontrada em altas concentrações no soro (Clarkson & Hubal, 2002). Essa enzima tem papel fundamental na formação de adenosina trifosfato (ATP) nas células musculares (Katirji & Al-Jaberi, 2001). Esta enzima é citoplasmática e não tem capacidade de atravessar a membrana sarcoplasmática (Melin *et al.*, 1997; Nosaka & Newton, 2002; Poprzecki *et al.*, 2004), sendo assim, qualquer aumento nas concentrações séricas de CK pode ser utilizado como indicativo de dano nesta membrana (Smith *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1997; Close *et al.*, 2005; Nosaka *et al.*, 2005).

Com relação às repercussões do exercício físico na prenhez de animais de experimentação, foi verificado aumento na secreção de insulina em ratas prenhes que foram submetidas à caminhada de intensidade moderada em esteira durante quatro semanas (Leandro *et al.*, 2012). Em outro estudo, no qual ratas prenhes foram submetidas à sessão de 30 minutos de natação durante 45 dias antes da prenhez e 19 dias na prenhez, foi concluído que estas ratas apresentaram maior estabilidade nas concentrações de glicose e de triglicérides plasmáticos e não houve alteração no desenvolvimento da prole (Lazo-Osório *et al.*, 2009). No entanto, a relação entre exercício físico, prenhez e morfologia pancreática é praticamente nula.

Nosso grupo de pesquisa já realizou diversos trabalhos relacionando prenhez, diabetes e exercício (Volpato *et al.*, 2006; 2009; Damasceno *et al.*, 2013; Volpato *et al.*, 2015). Volpato *et al.* (2006) mostraram que a prática de exercício de natação em ratas com diabetes grave não controlou a hiperglicemia, mas auxiliou no controle da dislipidemia e não prejudicou o catabolismo proteico. O exercício também não alterou o número de fetos vivos e diminuiu as mortes embrionárias (reabsorções), mostrando melhora no desempenho reprodutivo materno (Volpato *et al.*, 2009).

Frente aos dados já existentes na literatura e a hipótese de que o exercício físico de intensidade moderada, aplicado a ratas prenhes com diabetes moderado, é eficaz para reduzir a hiperglicemia e melhorar o desempenho reprodutivo, a capacidade pancreática materna e o quadro de estresse oxidativo, o objetivo desse trabalho foi avaliar os marcadores de glicemia, proliferação de células endócrinas pancreáticas e estresse oxidativo de ratas com diabetes moderado submetidas ao exercício físico de natação de intensidade moderada durante a prenhez.

MATERIAIS E MÉTODO

Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem *Wistar* adquiridos do Centro de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP e foram adaptados e mantidos no Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia - UNESP sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50\pm 10\%$), ciclo claro/escuro de 12 horas e água e ração à vontade. Esses animais foram acasalados para obtenção de recém-nascidos (RN) que foram utilizados nesse estudo. Todos os procedimentos experimentais aplicados nesse projeto foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e foram aprovados sob o número de protocolo 1088/2014.

Sequência experimental (Figura 1)

Indução do diabetes moderado

O diabetes moderado foi induzido por droga beta-citotóxica (*Streptozotocin*[®] – STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, Millstone, EUA) nos recém-nascidos fêmeas no primeiro dia de vida (D0) por via subcutânea no dorso (100 mg de STZ/kg de peso corpóreo) (Sinzato *et al.*, 2011). Os filhotes fêmeas do grupo não diabético receberam volume do veículo (tampão citrato) em condições similares às do grupo que recebeu a droga diabetogênica. No 4^o dia após a administração de STZ e veículo, foi aferida a glicemia por incisão na ponta da cauda dos filhotes. Foram consideradas ratas hiperglicêmicas aquelas que apresentaram glicemia igual ou superior a 400 mg/dL e, para o grupo não diabético, foram incluídas as fêmeas que apresentaram glicemia inferior a 120 mg/dL. Esses animais foram mantidos em nosso biotério até a idade adulta.

Adaptação ao meio líquido

Em torno do 100º dia de vida dos animais incluídos nos grupos de estudo, foi iniciada a fase de adaptação ao meio líquido. Para isso, todas as ratas foram colocadas individualmente em tanques de policloreto de vinil (100 cm de profundidade x 30 cm de diâmetro) contendo nível máximo de 10 cm de água à temperatura de $31\pm 1^\circ\text{C}$. Esta atividade foi praticada por 10 dias antes do período de acasalamento e até o 7º dia de prenhez, durante 10 minutos em horário fixo (entre 8h e 11h) visando adaptar os animais à água sem promover um condicionamento físico (Netto & Damasceno, 2016).

Período de acasalamento e prenhez

Após os 10 dias de adaptação ao meio líquido, iniciou-se a fase de acasalamento que teve duração máxima de 15 dias, que corresponde a três ciclos estrais. Cada conjunto de três ratas foi colocado na presença de um rato macho não diabético durante o período noturno. Na manhã subsequente, os machos foram retirados das caixas e os esfregaços vaginais das fêmeas colhidos pela introdução de Cotonete® umedecido em solução fisiológica. O material obtido foi depositado em lâminas histológicas para análise em microscópio de luz. O fator indicativo de prenhez foi a presença de espermatozoides (Damasceno *et al.*, 2008) e este foi considerado o dia zero de prenhez (D0).

Grupos experimentais

As ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais:

- Não diabético não exercitado (ND)
- Não diabético exercitado (NDEx)
- Diabetes moderado não exercitado (D)
- Diabetes moderado exercitado (DEx)

Prática do exercício físico (natação)

Do 7º ao 12º e do 14º ao 18º dia de prenhez, as ratas dos grupos NDEx e DEx foram submetidas à natação, 30 minutos por dia, com tanque contendo 80 cm de água a $31\pm 1^\circ\text{C}$. Nos dias 13 e 17 de prenhez, os animais não foram submetidos à natação. A aplicação do programa de natação durante a prenhez foi estabelecida de acordo com a tese de Doutorado de Netto & Damasceno (2016), que demonstraram que, de acordo com o limiar anaeróbio avaliado, uma carga fixa de 4% do peso corpóreo corresponde à intensidade moderada durante a prática de natação.

As ratas dos grupos não exercitados foram colocadas diariamente nos tanques contendo 10 cm de água, permitindo assim exposição aos fatores estressogênicos de forma similar aos grupos exercitados sem proporcionar condicionamento físico (Volpato *et al.*, 2006).

Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado no 17º dia de prenhez em todos os grupos para avaliação de alterações do metabolismo glicêmico. Após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue por uma pequena incisão na ponta da cauda para determinação glicêmica (tempo zero) utilizando glicosímetro convencional (*One Touch Ultra, Johnson & Johnson®*, Milpitas, Califórnia, EUA). Logo após, as ratas receberam solução de glicose via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Após 30, 60 e 120 minutos da administração da solução de glicose, as glicemias foram novamente mensuradas (Sinzato *et al.*, 2012). Após obtenção das glicemias em função dos tempos, foi estimada a área total sob a curva (AUC) usando matematicamente o método trapezoidal (Tai, 1994; Tietz, 2005; de Campos *et al.*, 2007).

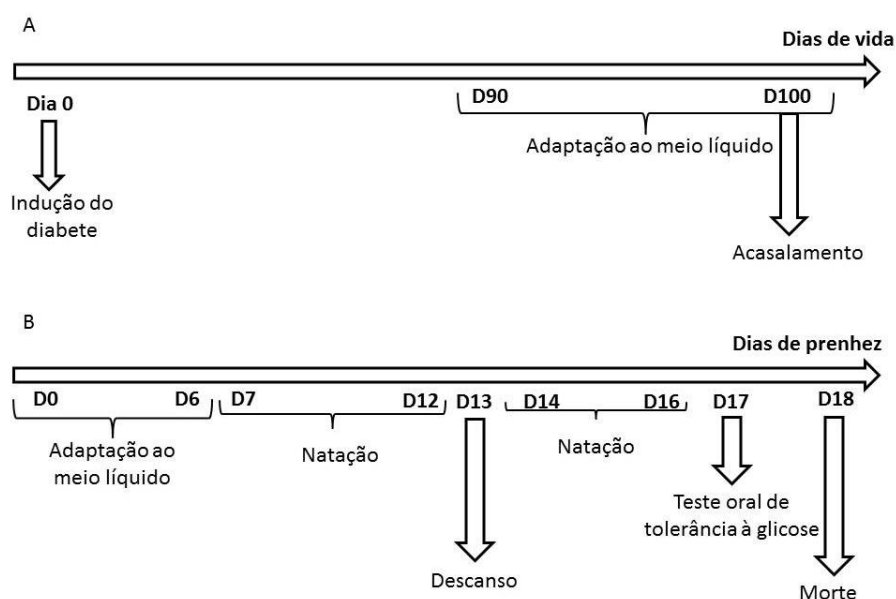


Figura 1. Sequência experimental de ratas *Wistar*. **A.** Antes da prenhez; **B.** Durante a prenhez.

Coleta e processamento de amostras de sangue para análise dos marcadores do estresse oxidativo

Na tarde do dia 18 de prenhez, as ratas foram submetidas à anestesia inalatória com isoflurano (Isoforine®, 1 mL/min) e decapitadas para obtenção de amostras de sangue. Parte das amostras foi coletada em tubos com anticoagulante (heparina) e outra parte em tubos secos. As amostras de sangue coletadas em tubos com heparina foram processadas pela

técnica de hemácias lavadas para determinação de marcadores de estresse oxidativo [atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e concentração de grupos tióis reduzidos e de malondialdeído (MDA)] (de Souza *et al.*, 2010 – modificado).

Coleta e processamento de amostras de soro para análise de insulina e creatina quinase (CK)

As amostras de sangue coletadas em tubos secos foram processadas para obtenção de soro para determinação da concentração de insulina (Crystal Chem Inc.®) e atividade da enzima creatina quinase (*EnzyChrom™ Creatine Kinase Assay Kit*® - ECPK 100) através de leitura em microplacas por espectrofotometria de acordo com as instruções do fabricante.

Desempenho reprodutivo materno

Após obtenção das amostras de sangue, as ratas já decapitadas foram submetidas à laparotomia para exposição dos cornos uterinos para contagem dos números de implantações, reabsorções (mortes embrionárias), fetos vivos e mortos. A taxa de perda pós-implantação embrionária foi calculada pela fórmula: número de implantações – número de fetos vivos x 100 / número de implantações (Damasceno *et al.*, 2008). Visto que, em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa observou que a taxa de perda pós-implantação em ratas não diabéticas varia entre 7±3%, foram apresentados os resultados da porcentagem de ratas que exibiram perda pós-implantação maior que 10% em cada grupo estudado. Após a retirada dos cornos uterinos, foi determinada a pesagem da ninhada.

Análise da frequência de anomalias externas fetais

Os fetos foram retirados dos cornos uterinos e examinados quanto à conformação craniana, implantação das orelhas, presença de olhos (fechados) e boca (fenda labial, macroglossia), membros anteriores e posteriores (ausência ou excesso de dedos, posição, tamanho), regiões torácicas, abdominal e dorsal (hemorragia, hematoma e defeito de fechamento do tubo neural) e presença de perfuração anal (Damasceno *et al.*, 2008).

Coleta e processamento do pâncreas materno para análise morfológica

O pâncreas materno foi coletado e fixado em formalina 10% por 24 horas, foi lavado por uma hora e, em seguida, acondicionado em etanol a 70%. As amostras foram emblocadas em parafina e cortadas em micrótomo no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu - UNESP. As lâminas foram confeccionadas e o tecido foi corado com hematoxilina-eosina para análise morfométrica da área (mm²) utilizando sistema computadorizado de

imagem (software KS-300, versão 3.0, Zeiss®), que recebe imagem por câmera digital (CCD-IRIS/RGB, Sony®), acoplada a microscópio (DMR, Leica®). Outras lâminas contendo tecido pancreático foram cortadas para análise imunoistoquímica (IHQ) no Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica (FMVZ) - UNESP, Botucatu. Para isso, secções de tecido de 5µm foram desparafinizadas em xilol e reidratadas por meio de banhos em soluções de gradientes decrescentes de etanol. Os anticorpos primários utilizados foram anti-insulina (*Mouse monoclonal [D6C4] to Insulin*, Abcam®, cód.: ab8304), anti-PDX-1 (*Rabbit polyclonal to PDX-1*, Abcam®, cód.: ab47267) e anti-GLP-1/glucagon (*Rabbit polyclonal to GLP-1*, Abcam®, cód.: ab39072). Para a avaliação do índice proliferativo, foi utilizado o anticorpo anti-KI-67 (*Monoclonal mouse AntiHuman, Clone MIB-1*, Dako® Denmark). O procedimento IHQ incluiu as seguintes etapas: (1) recuperação antigênica do tecido com solução de citrato (pH 6,0) em panela de pressão Pascal (Dako®), exceto para o anticorpo anti-PDX-1 que não passou pelo processo de recuperação; (2) bloqueio da peroxidase endógena pela incubação com solução de peróxido de hidrogênio pronto para uso (*Spring®*, cód.: DHP-125); (3) bloqueio de proteínas inespecíficas com *Protein Block* (Dako®) para todos os anticorpos; (4) incubação com anticorpo primário com diluição de 1:5000 para anti-insulina, 1:1000 para PDX-1 e 1:100 para glucagon, todos estes por duas horas em estufa a 27°C e diluição 1:100 para anti-KI-67 período *overnight* em geladeira a 8°C; (5) incubação com anticorpo secundário *Histofine® (Simple Stain Max Po. Universal Immuno-peroxidase Polymer/Anti-Mouse and Rabbit)* por 30 minutos à temperatura de 27°C para todos os anticorpos; (6) revelação da peroxidase através do cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina); (7) contra-coloração com hematoxilina de Mayer e montagem da lâmina para visualização em microscópio.

A avaliação IHQ foi realizada pela relação entre número de células marcadas pelo número total de células (marcadas e não marcadas) x 100. Foram observadas dez ilhotas por lâmina e cinco lâminas por grupo experimental.

Coleta e processamento do músculo gastrocnêmio para análise da atividade da enzima citrato sintase

Após a coleta do pâncreas, o músculo gastrocnêmio foi retirado para análise da atividade da enzima citrato sintase. Para isso, o tecido foi homogeneizado e centrifugado. A determinação da atividade máxima da enzima baseou-se no protocolo modificado de Alp *et al.* (1976), a partir do complexo amarelo formado entre Coenzima A liberada na reação com o DTNB [*5,5-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)*]. As amostras foram analisadas por espectrofotometria a 412 nm e o resultado foi dado em nM/minuto/mg de proteína.

Análise estatística

Respeitando que a homogeneidade entre as unidades experimentais é uma das bases do desenho experimental e considerando que ratas não diabéticas e diabéticas são organismos biologicamente diferentes, as comparações entre ratas ND *versus* NDEx; ND *versus* D; NDEx *versus* DEx; D *versus* DEx foram realizadas. Os resultados foram estatisticamente analisados por comparação entre as médias das variáveis dos grupos usando Distribuição Gama seguida de medidas repetidas e Teste de Student Newman-Keuls para comparação 2x2 entre os grupos específicos mencionados acima. Para comparação entre as proporções, foi empregada a Distribuição de Poisson e Binomial Negativa. Foi considerado $p < 0,05$ como limite de significância estatística.

RESULTADOS

A Figura 2 ilustra o fluxograma do número de animais que iniciaram o experimento e de animais que foram inclusos durante a execução do mesmo. No grupo não diabético, das 41 ratas que iniciaram o experimento, 36 apresentaram diagnóstico positivo de prenhez. Destas, 30 chegaram ao 18º dia de prenhez (15 ratas no grupo ND e 15 no grupo NDEx) e 6 ratas não mantiveram a prenhez até o dia 18 e, por isso, foram excluídas. No grupo de ratas com diabetes moderado, das 420 ratas que receberam STZ, 178 apresentaram glicemias de acordo com o critério de inclusão (glicemia ≥ 400 mg/dL no 5º dia de vida). Dessas, 57 chegaram à idade adulta, das quais 49 tiveram diagnóstico positivo de prenhez. Das 49 ratas prenhes, 19 não mantiveram a prenhez até o dia 18 e, por isso, também foram excluídas do experimento. Das 30 ratas diabéticas que chegaram até o 18º dia de prenhez, 15 foram inclusas no grupo DE e 15 no DEx.

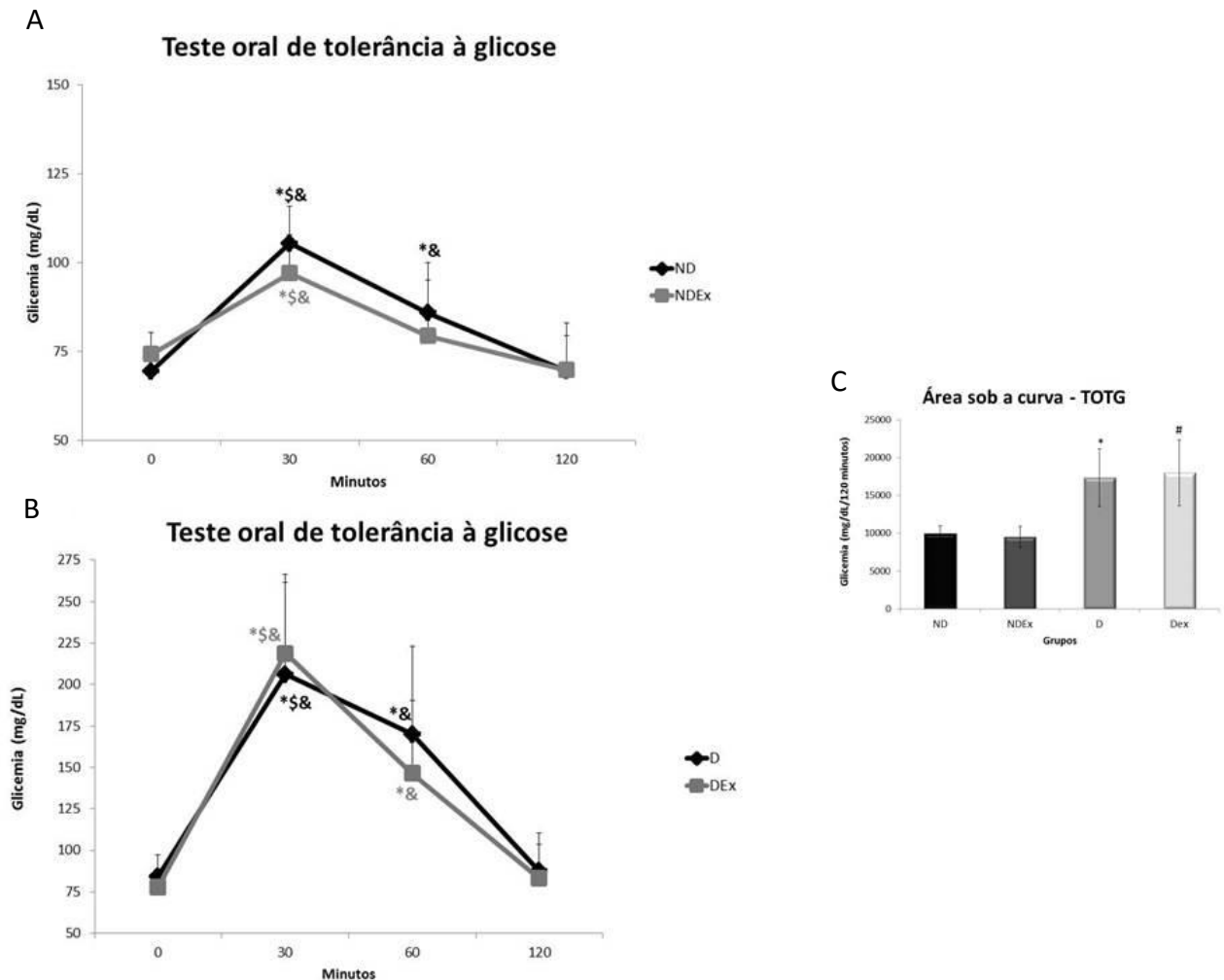


Figura 3. Teste oral de tolerância à glicose no 17º dia de prenhez de ratas não diabéticas (**A**) e diabéticas (**B**) submetidas ou não ao exercício físico de natação. (**C**) Área sob a curva de glicemia durante o teste oral de tolerância à glicose.

Legenda: ND: não diabético não exercitado; NDEx: não diabético exercitado; D: diabético não exercitado; DEx: diabético exercitado.

Dados apresentados como média±desvio padrão.

Figuras A e B: * $p < 0,05$ – comparado ao tempo 0; $^{\$}p < 0,05$ – comparado ao tempo 60; $^{\&}p < 0,05$ – comparado ao tempo 120 (Distribuição Gama seguido de Medidas Repetidas).

Figura C: * $p < 0,05$ – comparado ao grupo ND; $^{\#}p < 0,05$ – comparado ao grupo NDEx (Teste de Student Newman Keuls).

Na figura 4 (A, B e C), são apresentados os resultados de desempenho reprodutivo materno. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ND e NDEx em todos os parâmetros avaliados com relação à performance reprodutiva materna. Por outro lado, foi verificado aumento no número de fetos vivos (Figura 4A) e maior peso da ninhada (Figura 4B) no grupo DEx comparado aos do grupo D. Os grupos D e DEx tiveram aumento na porcentagem de ratas apresentando perda pós-implantação maior que 10% (Figura 4C) em relação às dos grupos ND e NDEx, respectivamente.

Não foi observada presença de anomalias externas fetais nos diferentes grupos estudados (dados não mostrados).

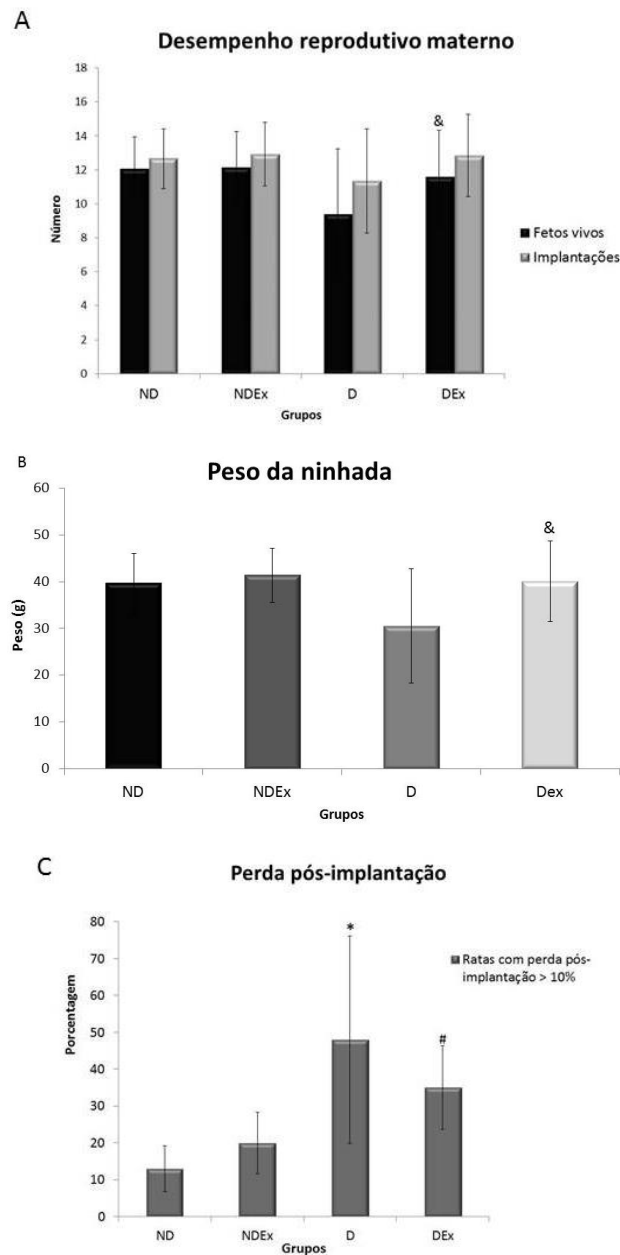


Figura 4. Desempenho reprodutivo materno de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez. **A.** Número de fetos vivos e de implantações; **B.** Peso da ninhada; **C.** Porcentagem de ratas que apresentaram perda pós-implantação maior que 10%.

Legenda: ND: não diabético não exercitado; NDEx: não diabético exercitado; D: diabético não exercitado; DEx: diabético exercitado.

Figura A: &p<0,05 – comparado ao grupo D (Distribuição de Poisson)

Figura B: *p<0,05 – comparado ao grupo ND; #p<0,05 – comparado ao grupo NDEx (Distribuição binominal negativa)

Figura C: &p<0,05 – comparado ao grupo D (Teste de Student Newman Keuls)

Os dados da análise morfológica do pâncreas estão apresentados nas figuras de 5 a 10 (A e B). Na análise morfométrica do pâncreas materno (Figura 5 A e B), foi verificada diminuição da área das ilhotas dos grupos diabéticos quando comparado à dos não diabéticos, independentemente da prática de exercício. Com relação à marcação imunoistoquímica para insulina (marcação citoplasmática) e PDX-1 (marcação nuclear) (Figuras 6 e 8, respectivamente) no pâncreas materno, houve redução no número de células imunomarcadas para ambos nos grupos diabéticos em relação ao dos não diabéticos, independentemente da prática de exercício. A imunomarcação celular de glucagon (marcação citoplasmática) (Figura 7) foi aumentada dos grupos diabéticos em relação à dos grupos não diabéticos. Não foi observada diferença estatisticamente significativa com relação à marcação imunoistoquímica para KI-67 (marcação nuclear) (Figura 9).

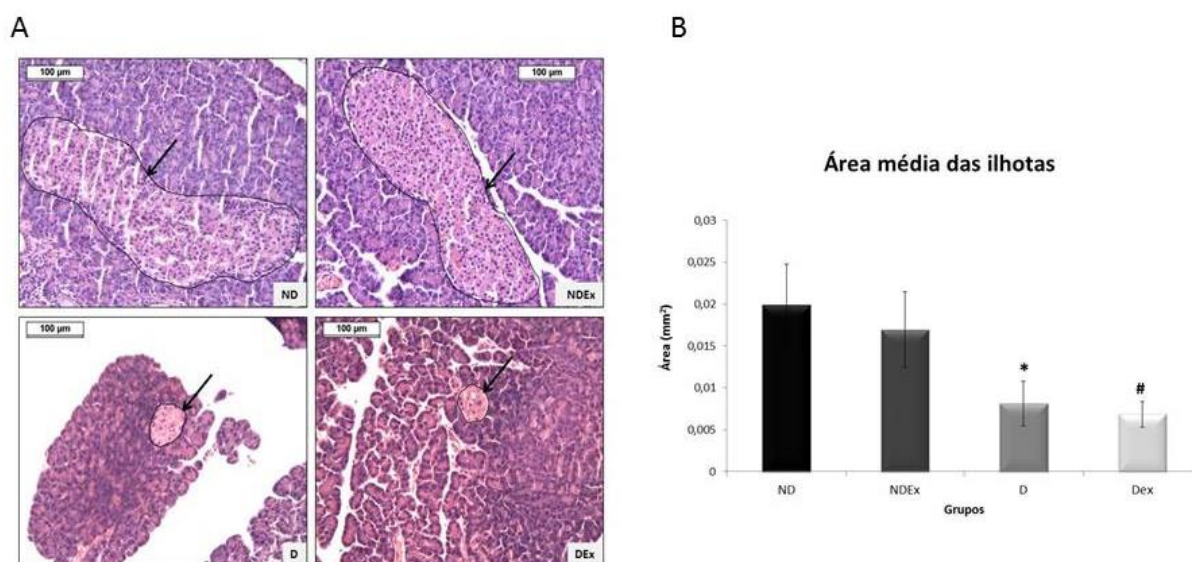


Figura 5. Área das ilhotas pancreáticas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez. **(A)** Fotomicrografias das ilhotas de ratas (coloração hematoxilina-eosina – HE), setas indicam as ilhotas pancreáticas, aumento de 40x, escala = 100µm. **(B)** Área média das ilhotas nos diferentes grupos estudados.

Legenda: ND: não diabético não exercitado; NDEx: não diabético exercitado; D: diabético não exercitado; DEx: diabético exercitado.

Figura B: dados apresentados como média±desvio padrão.

*p<0,05 – comparado ao grupo ND (Teste de Student Newman Keuls).

#p<0,05 – comparado ao grupo NDEx (Teste de Student Newman Keuls).

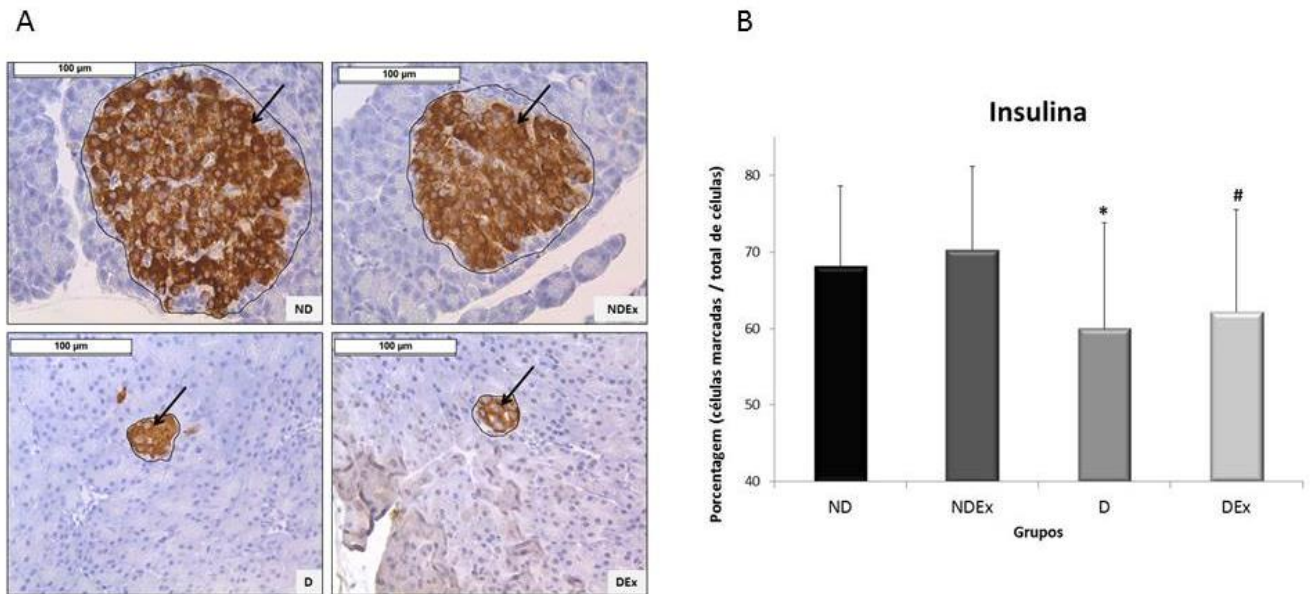


Figura 6. Imunomarcção para insulina no pâncreas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez. **(A)** Fotomicrografias com células imunomarcadas para insulina no pâncreas de ratas, ilhotas circundadas em preto, setas indicam células imunomarcadas para insulina (*Mouse monoclonal [D6C4] to Insulin*, Abcam®, cód.: ab8304, *Histofine*®, DAB, aumento de 40x). **(B)** Porcentagem média de células marcadas para insulina nas ilhotas pancreáticas de ratas.

Legenda: ND: não diabético não exercitado; NDEx: não diabético exercitado; D: diabético não exercitado; DEx: diabético exercitado.

Figura B: dados apresentados como média percentual±desvio padrão.

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo ND (Distribuição de Poisson)

$p < 0,05$ – comparado ao grupo NDEx (Distribuição de Poisson)

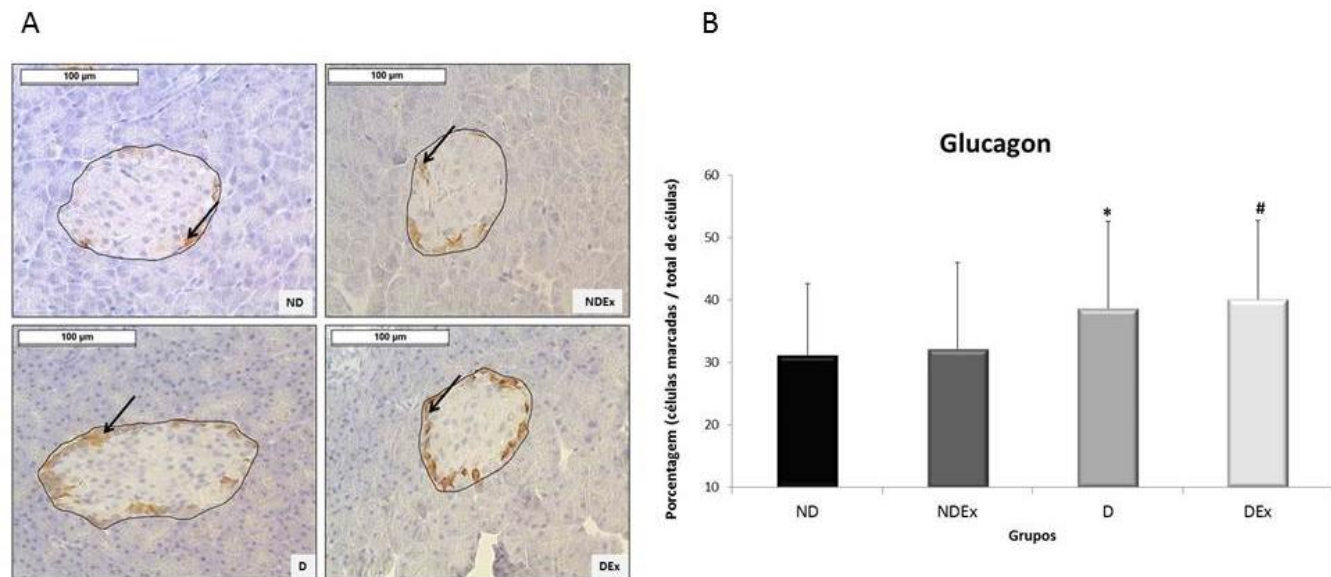


Figura 7. Imunomarcção para glucagon no pâncreas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez. **(A)** Fotomicrografias com células imunomarcadas para glucagon no pâncreas de ratas, ilhotas circundadas em preto, setas indicam células imunomarcadas para glucagon (*Rabbit polyclonal to GLP-1*, Abcam®, cód.: ab39072, *Histofine*®, DAB, aumento de 40x). **(B)** Porcentagem média de células marcadas para glucagon nas ilhotas pancreáticas de ratas.

Legenda: ND: não diabético não exercitado; NDEx: não diabético exercitado; D: diabético não exercitado; DEx: diabético exercitado.

Figura B: dados apresentados como média percentual±desvio padrão.

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo ND (Distribuição Binomial Negativa)

$p < 0,05$ – comparado ao grupo NDEx (Distribuição Binomial Negativa)

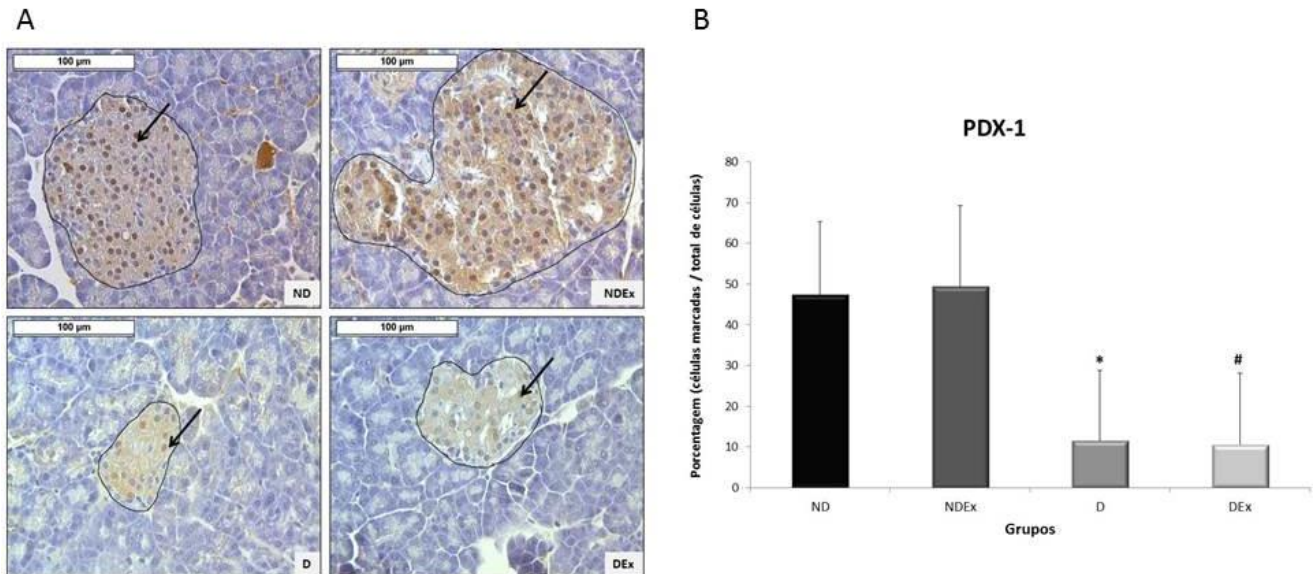


Figura 8. Imunomarcção para PDX-1 no pâncreas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez. **(A)** Fotomicrografias com células imunomarcadas para PDX-1 no pâncreas de ratas, ilhotas circundadas em preto, setas indicam células imunomarcadas para PDX-1, (*Rabbit polyclonal to PDX-1*, Abcam®, cód.: ab47267., *Histofine*®, DAB, aumento de 40x). **(B)** Porcentagem média de células marcadas para PDX-1 nas ilhotas pancreáticas de ratas.

Legenda: ND: não diabético não exercitado; NDEx: não diabético exercitado; D: diabético não exercitado; DEx: diabético exercitado.

Figura B: dados apresentados como média percentual±desvio padrão.

* $p < 0,05$ – comparado ao grupo ND (Distribuição Binomial Negativa)

$p < 0,05$ – comparado ao grupo NDEx (Distribuição Binomial Negativa)

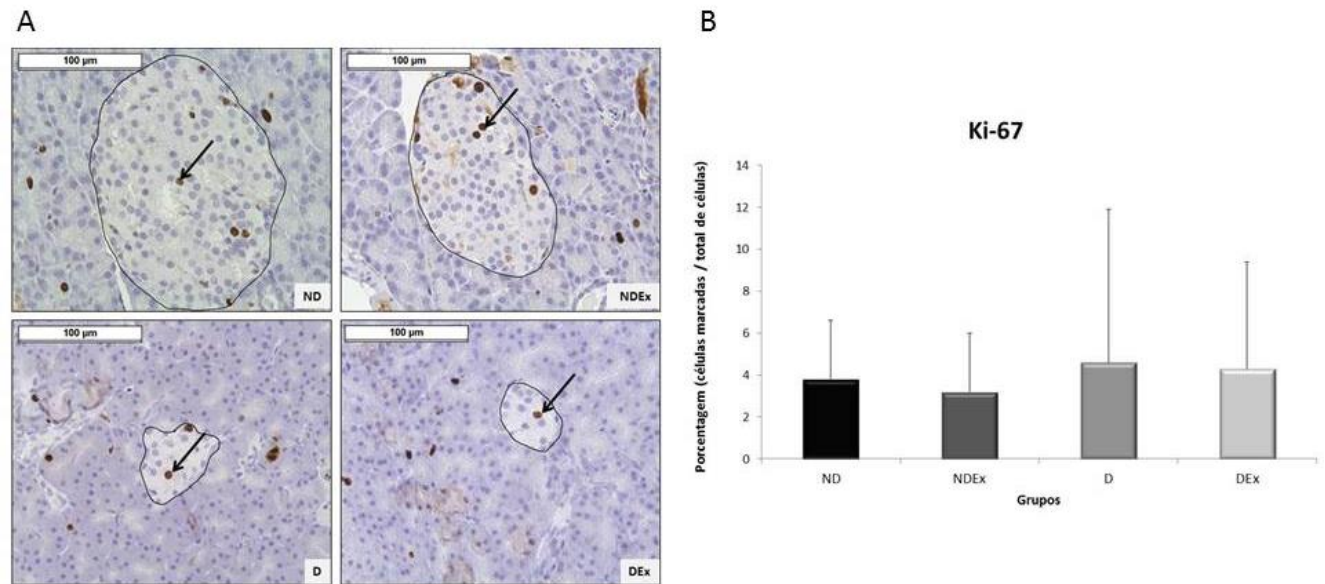


Figura 9. Imunomarcção para KI-67 no pâncreas de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez. **(A)** Fotomicrografias com células imunomarcadas para KI-67 no pâncreas de ratas, ilhotas circundadas em preto, setas indicam células imunomarcadas para KI-67 (*Monoclonal mouse AntiHuman*, Clone MIB-1, Dako® Denmark, *Histofine*®, DAB, aumento de 40x). **(B)** Porcentagem média de células imunomarcadas para KI-67 nas ilhotas pancreáticas de ratas.

Legenda: ND: não diabético não exercitado; NDEx: não diabético exercitado; D: diabético não exercitado; DEx: diabético exercitado.

Figura B: dados apresentados como média percentual±desvio padrão.
 $p > 0,05$ – sem diferença estatisticamente significativa

A tabela 1 apresenta as concentrações de insulina, marcadores de estresse oxidativo e a atividade das enzimas creatina quinase (CK) e citrato sintase nos diferentes grupos estudados. Não foi observada diferença estatisticamente significativa com relação à concentração sérica de insulina materna. Quanto aos marcadores de estresse oxidativo, a concentração de MDA aumentou no grupo D comparado à do ND e no grupo DEx comparado à dos grupos NDEx e D. A atividade da enzima antioxidante SOD estava aumentada nos grupos NDEx e D em relação à do grupo ND e diminuída no grupo DEx comparado à dos grupos NDEx e D. Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de grupos tióis reduzidos. Com relação à atividade de CK, foi verificado aumento estatisticamente significativo em ratas DEx comparado à do NDEx. Foi observado diminuição na atividade da enzima citrato sintase no grupo DEx em relação à do grupo NDEx.

Tabela 1. Biomarcadores do metabolismo de ratas não diabéticas e diabéticas submetidas ou não ao exercício físico de natação durante a prenhez.

	ND	NDEx	D	DEx
Insulina (ng/mL) (n=5)	1,3±0,1	1,3±0,4	1,2±0,1	1,1±0,1
Malondialdeído (nM/g Hb) (n=8)	68,7±5,0	78,3±17,7	111,8±38,8*	321,8±171,0#&
Superóxido dismutase (U/mg Hb) (n=8)	24,9±3,0	43,5±3,9*	46,1±5,1*	28,6±3,3#&
Tióis reduzidos (mM/mg Hb) (n=8)	2,4±0,4	2,6±0,1	2,8±0,2	2,5±0,3
Creatina quinase (U/L) (n=5)	375,6±126,7	409,1±136,3	471,3±102,5	554,3±149,5#
Citrato sintase (nM/min/mg ptn) (n=5)	0,7±0,4	0,9±0,2	0,4±0,2	0,6±0,1#

Legenda: ND: não diabético não exercitado; NDEx: não diabético exercitado; D: diabético não exercitado; DEx: diabético exercitado.

Valores de referência para ratas prenhes: Creatina quinase (CK): 248,9 - 502,3 U/L

Dados apresentados como média±desvio padrão.

*p<0,05 – comparado ao grupo ND (Teste de Student Newman Keuls)

#p<0,05 – comparado ao grupo NDEx (Teste de Student Newman Keuls)

&p<0,05 – comparado ao grupo D (Teste de Student Newman Keuls)

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi verificado que as ratas NDEx apresentaram média glicêmica no tempo 60 minutos (min) durante o TOTG equivalentes aos valores de jejum (tempo zero), isto é, o retorno da concentração de glicose sanguínea ocorreu antes do término do teste (120 min), mostrando um efeito benéfico da natação de intensidade moderada com relação ao aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos. A maior captação de glicose no TOTG em ratas NDEx poderia estar relacionada ao aumento da sensibilidade à insulina, aumento da expressão proteica do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) e/ou captação de glicose através de vias não relacionadas à insulina (Ren *et al.*, 1994; Kawanaka *et al.*, 2000; Hawley & Lessard, 2008).

Calegari *et al.* (2011a) utilizaram ratos machos normoglicêmicos submetidos a diferentes treinamentos em esteira e verificaram diminuição na área sob a curva (AUC) de glicose durante o TOTG nos grupos treinados. Os autores atribuem esse resultado ao maior estímulo à via de sinalização insulínica hepática e muscular, o que resulta em maior captação periférica de glicose. Outro estudo com ratas fêmeas não diabéticas que foram submetidas à prática de natação por um ou dois dias demonstrou aumento na expressão proteica e na concentração de GLUT4 no músculo dos animais exercitados, o que comprova que poucos dias de exercício podem resultar em melhora na captação da glicose disponível (Ren *et al.*, 1994).

Com relação às ratas diabéticas, os resultados mostraram que os grupos D e DEX apresentaram médias glicêmicas maiores que 200 mg/dL e maior AUC durante o TOTG, comprovando o quadro diabético. A natação não contribuiu para atenuar o quadro hiperglicêmico nessas ratas. Faltam artigos mais específicos na literatura sobre os efeitos do exercício físico de natação no metabolismo da glicose em ratas diabéticas prenhes. Experimento com ratos machos *Zucker* (geneticamente diabéticos) submetidos ao treinamento de 60 minutos/dia durante 12 semanas em esteira (15-20 metros/minuto) demonstrou menor AUC durante o TOTG nos animais do grupo exercitado (Kim *et al.*, 2013). Da mesma forma, outro estudo também observou melhora na tolerância à glicose em fêmeas com diabetes induzido por aloxana (droga beta-citotóxica) com dose de 250 mg/Kg que nadaram (60 minutos/dia) em intensidade moderada (carga equivalente ao limiar anaeróbio) por 12 semanas (Mota *et al.*, 2008).

Os resultados do presente estudo mostraram que a prática de natação no grupo NDEx não causou prejuízo no desempenho reprodutivo materno, visto que este grupo não apresentou diferenças com relação às variáveis estudadas. Já com relação ao grupo DEX, a

melhora em alguns parâmetros do desempenho reprodutivo materno, como menor peso da ninhada e maior número de fetos vivos, que caracteriza redução do número de mortes fetais, observada neste grupo não foi confirmada por Vanheest & Rodgers (1997) que, utilizando fêmeas *Sprague-Dawley* que receberam STZ (50 mg/Kg) para indução do diabetes e que praticaram exercício de esteira antes e/ou durante a prenhez (20 metros/min, 1h/dia, 5 dias/semana), não observaram diferença nos dados de ganho de peso corpóreo materno, número de fetos vivos, peso da ninhada e número de reabsorções (mortes embrionárias) nos grupos diabéticos treinados quando comparado aos do grupo sedentário.

Neste estudo, as concentrações séricas de insulina não foram influenciadas pela natação e nem pela indução do diabetes, independentemente do grupo estudado. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa, como o de Saito *et al.* (2010), que administraram STZ em dois dias (no primeiro dia de vida e 7º dia de prenhez de ratas) e de Dallaqua & Damasceno (2015), que induziram o diabetes moderado no 1º dia de vida e também não observaram diferença na concentração sérica de insulina. Caluwaerts *et al.* (2003), utilizando diferentes doses de STZ (30, 35, 40 e 50 mg/dL) para indução de diabetes no dia 1 de prenhez de ratas *Wistar*, não verificaram diferença na concentração de insulina plasmática desses animais na prenhez a termo. De forma semelhante, no trabalho de Contarteze *et al.* (2009), não foram observadas diferenças neste parâmetro entre machos controle e com indução do diabetes (aloxana – 250 mg/Kg). Silva *et al.* (2010) submetem animais ao jejum e não observaram diferença significativa na concentração sérica de insulina em machos obesos submetidos à natação em diferentes protocolos (grupo 1: duas séries de três horas de natação separadas por 45 minutos de descanso; grupo 2: 40 minutos de natação com carga de 70% do limiar anaeróbico). Porém, estes autores verificaram melhora na sensibilidade a este hormônio nos grupos exercitados durante o teste de tolerância à insulina (TTI), mostrando que o TTI proporciona resultados mais fidedignos relacionados ao metabolismo da insulina.

Nossos resultados sobre a concentração de insulina sérica corroboram com outros estudos, mesmo sendo em outras espécies, sem prenhez e machos. Mas, cabe ressaltar que a falta de diferença na concentração de insulina entre os grupos exercitados e não exercitados pode estar relacionada ao fato das ratas não estarem em jejum. Desta forma, o consumo *ad libitum* de ração dificulta a interpretação do metabolismo glicêmico em relação ao de insulina.

Sabe-se que a SOD atua como a primeira linha de defesa antioxidante endógena, pois sua atividade é aumentada para dismutar o ânion superóxido, que é produzido na primeira reação de redução do oxigênio (O₂) para a água (Valko *et al.*, 2007). Foi observado aumento da atividade dessa enzima nos grupos NDEx e D. No grupo NDEx, o aumento de atividade desta

enzima foi eficaz, pois controlou a lipoperoxidação, confirmada pela inalteração da concentração de MDA observada neste grupo. Já no grupo D, o aumento de SOD não foi suficiente para conter a lipoperoxidação, visto que a concentração de MDA estava aumentada. Entretanto no grupo DEx, foi verificada diminuição da atividade de SOD e aumento da concentração de MDA, sugerindo que a associação diabete e exercício levou à exaustão da primeira linha de defesa antioxidante. Além disso, a inalteração da concentração de grupos tióis neste grupo também suporta a afirmação de que não foi possível controlar o processo exacerbado de lipoperoxidação, resultando em estresse oxidativo. Desta forma, sugere-se que a intensidade de exercício aplicada no grupo DEx tenha sido intensa, já que trabalhos na literatura mostram que, em intensidades mais severas, o exercício pode promover o estabelecimento do quadro de estresse oxidativo. De Oliveira *et al.* (2013) utilizaram um programa de natação de intensidade moderada para um grupo de ratos (50 minutos por dia, com carga de 5% do peso corpóreo na 1ª semana, 6% na 2ª semana, 7% na 3ª e de 8% na 4ª) e, para outro grupo de ratos, um programa de alta intensidade (um minuto de exercício seguido de dois minutos de descanso até completar 50 minutos/dia, com carga de 10% do peso corpóreo na 1ª semana, aumentando para 15% na 2ª semana, 20% na 3ª e 25% na 4ª semana). Esses autores demonstraram aumento da lipoperoxidação apenas no grupo que se exercitou de forma intensa, demonstrando que a prática de exercício em intensidades mais severas pode acarretar em estresse oxidativo.

Quanto aos marcadores biológicos diretamente relacionados aos efeitos do exercício físico, foi verificado que a associação diabete e exercício aumentou a atividade de CK no grupo DEx, caracterizando dano muscular. Isto mostra, mais uma vez, que a intensidade de exercício utilizada neste trabalho foi intensa para este grupo que já apresentava deficiência metabólica. A literatura evidencia aumento na atividade de CK em pacientes diagnosticados com DM2 que apresentam miopatia diabética (redução da resistência, força e massa muscular) (Andersen *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010; Frank & Finsterer, 2012). Sussai *et al.* (2010) também verificaram aumento de CK em machos submetidos à prática de exercício resistido. Yokokawa *et al.* (2011) submeteram animais que receberam STZ (30 mg/Kg) a um protocolo de exercício voluntário por 5 dias e observaram aumento de CK no grupo exercitado, o que corrobora nossos achados.

Outro fator que também pode ter contribuído para aumento na atividade da CK no grupo DEx é o quadro de estresse oxidativo que se encontra estabelecido nesse grupo. A literatura retrata que o aumento na formação de ERO promove aumento na expressão de genes relacionados à atrofia muscular, tais como *atrogen-1* e *MuRF-1*, e incapacidade na regulação de genes associados ao crescimento muscular. Esses fatores contribuem para uma

maior incidência de lesão muscular em animais diabéticos (Aragno *et al.*, 2004; Macrocola *et al.*, 2008).

Com relação à atividade da enzima citrato sintase, que é frequentemente empregada para análise da natureza aeróbia do treinamento, observou-se diminuição na atividade dessa enzima apenas no grupo DEx. Isto demonstra um aumento na utilização da via anaeróbia durante a natação, o que evidencia que a intensidade de exercício com carga de 4% do peso corpóreo aplicada a essas ratas estaria sendo intensa, já que a via aeróbia não foi capaz de fornecer a energia necessária para a atividade realizada.

A hiperglicemia presente nos grupos diabéticos acarretou em alteração nas ilhotas pancreáticas. Os mecanismos pelos quais essas alterações ocorrem podem ser a auto-oxidação da glicose, glicação de proteínas e a formação de ERO, que causa mais danos oxidativos nas células β pancreáticas e, conseqüentemente, diminuição da síntese de insulina. Isto é confirmado em nosso estudo, visto que a imunomarcagem de células positivas para insulina no pâncreas dos animais diabéticos está diminuída. Além disso, houve redução da área de ilhota pancreática nos grupos diabéticos, confirmando o efeito da hiperglicemia.

Alguns estudos na literatura mostram que a gravidez/prenhez (Butler *et al.*, 2010; Gallego & Damasceno, 2014), o diabete (Rawal *et al.*, 2013) e o exercício (Park *et al.*, 2008) por si só são fatores capazes de modificar a morfologia pancreática. Neste trabalho, observamos que a fusão das três variáveis independentes causou diminuição nas imunomarcagens de insulina e de PDX-1, aumento na marcação para glucagon e inalteração nas taxas proliferação no pâncreas de ratas DEx, similarmente ao que ocorreu no grupo diabético sem exercício. Isto mostra que a intensidade de exercício ao qual os animais diabéticos foram submetidos não foi eficaz de promover alterações estruturais ao pâncreas a ponto de reduzir a glicemia, evidenciando que apenas o diabete causou as alterações encontradas. Mas cabe reforçar que o exercício não causou prejuízos morfológicos a este microórgão (pâncreas endócrino).

Sendo assim, podemos inferir que o período da prática do exercício utilizado no presente estudo, isto é, após a implantação embrionária até o final da prenhez, não foi suficiente para estimular a via aeróbia (ativação da citrato sintase) e causar alterações no pâncreas materno do grupo diabético exercitado, levando a sugerir que seria necessária a implementação de um exercício prévio à prenhez já que outros trabalhos da literatura que utilizaram maior tempo de treinamento, como 8 semanas (de Oliveira *et al.*, 2010; Calegari *et al.*, 2011a; 2011b), 10 semanas (Leite *et al.*, 2013) ou 12 semanas (Tsuchiya *et al.*, 2013), apresentaram resultados positivos nos parâmetros relacionados ao metabolismo da glicose e morfologia pancreática. No entanto, a carga de 4% do peso corpóreo utilizada como parâmetro para uma intensidade moderada para os animais prenhes (Netto & Damasceno,

2016) foi benéfica às ratas não diabéticas, mas foi considerada intensa para as ratas com diabetes moderado.

CONCLUSÃO

A prática de natação foi capaz de alterar o metabolismo glicêmico de forma positiva e melhorou a capacidade de defesa antioxidante de ratas não diabéticas, contribuindo para o bom desempenho reprodutivo materno. Desta forma, sugerimos que a intensidade de exercício com carga de 4% de peso corpóreo estabelecida para ratas ND foi benéfica. Porém, em animais diabéticos, esta intensidade não foi capaz de alterar o pâncreas materno, confirmado pelo TOTG e pelas análises morfológicas. Além disso, a natação exacerbou o quadro de estresse oxidativo, aumentou a utilização da via anaeróbia e causou danos musculares. Portanto, a intensidade utilizada para realização da prática de natação em ratas prenhes não diabéticas durante a prenhez foi eficaz, mas o mesmo não ocorreu para ratas diabéticas prenhes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Talisia Moreto Colachiti, Carlos Roberto Lima, Vitor Souza e Danilo Chaguri, pela ajuda técnica e manutenção dos animais; ao amigo Dr. Carlos Eduardo Meirelles dos Santos pela arte da estrutura dos tanques de natação e pela confecção do aparelho de anestesia; ao Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP), especialmente ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente pela contribuição; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa (Processo FAPESP 2013/23478-3) e aos membros do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺ linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* 1976;154:689-700.
- Andersen H, Schmitz O, Nielsen S. Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med.* 2005;22:1401-7.
- Aragno M, Mastrocola R, Catalano MG, Brignardello E, Danni O, Boccuzzi G. Oxidative stress impairs skeletal muscle repair in diabetic rats. *Diabetes.* 2004;53:1082-8.

- Basset DRJ, Howley ET. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(1):70-84.
- Blanchetot C, Boonstra J. The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2008;18(1):35-45.
- Brankston GN, Mitchell BF, Ryan EA. Resistance exercise decreases the need for insulin in overweight women with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(1):188-93.
- Brown SJ, Child RB, Day SH, Donnelly AE. Exercise-induced skeletal muscle damage and adaptation following repeated bouts of eccentric muscle contractions. *J Sports Sci.* 1997;15(2):215-22.
- Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell.* 1997;88:561-72.
- Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, *et al.* Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetology.* 2010;53:2167-76.
- Calegari VC, Abrantes JL, Silveira LR, Paula FM, Costa Junior JM, Rafacho A, *et al.* Endurance training stimulates growth and survival pathways and the redox balance in rat pancreatic islets. *J App Physiol.* 2011;112:711-18a.
- Calegari VC, Zoppi CC, Rezende LF, Silveira LR, Carneiro EM, Boschero AC. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. *J Endocrinol.* 2011;208:257-64b.
- Caluwaerts S, Holemans K, Van Bree R, Verhaeghe J, Van Assche F. Is low-dose streptozotocin in rats an adequate model for gestational *Diabetes mellitus*? *J Soc Gynecol Investig.* 2003;10(4):216-21.
- Chiarugi P, Fiaschi T. Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal.* 2007;19(4):672-82.
- Clarkson PM, Hubal MJ. Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil.* 2002;81(11):52-69.
- Close GL, Kayani A, Vasilaki A, McArdle A. Skeletal muscle damage with exercise and aging. *Sports Med.* 2005;35(5):413-27.
- Contarteze RVL, Mota CSA, de Oliveira CAM, Leme JACA, Bottcher LB, de Mello MAR, *et al.* Exercise test and glucose homeostasis in rats treated with alloxan during the neonatal period or fed a high calorie diet. *J Diabetes.* 2009;1:65-72.
- Dallaqua B, Damasceno DC. Estudo dos marcadores de hipóxia e de estresse oxidativo em diferentes momentos da vida de ratas e em seus descendentes no quadro diabético. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2015.
- Damasceno DC, Kempinas WDG, Volpato GT, Consonni M, Rudge MVC, Paumgarten FJR. Anomalias congênitas - estudos experimentais. Botucatu: Editora Médica; 2008.
- Damasceno DC, Silva HP, Vaz GF, Vasques-Silva FA, Calderon IMP, Rudge MVC, *et al.* Diabetic rats exercised prior to and during pregnancy: maternal reproductive outcome, biochemical profile, and frequency of fetal anomalies. *Reprod Sci.* 2013;20(7):730-8.
- de Campos KE; Sinzato YK; Pimenta WP; Rudge MVC; Damasceno DC. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. *Life Sciences.* 2007;81:1473-8.
- de Oliveira CAM, Paiva MF, Mota CAS, Ribeiro C, Leme JACA, Luciano E, *et al.* Exercise at anaerobic threshold intensity and insulin secretion by isolated pancreatic islets of rats. *Islets.* 2010;2(4):240-6.
- de Oliveira DM, Dourado GKZS, Cesar TB. Hesperidin associated with continuous and interval swimming improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10(27):1-7.
- de Souza MSS, Sinzato YK, Lima PHO, Calderon IMP, Damasceno DC. Oxidative stress status and lipid profiles of diabetic pregnant rats exposed to cigarette smoke. *Reprod Biomed Online.* 2010;20(4):547-52.
- Frank M, Finsterer J. Creatine kinase elevation, lactacidemia, and metabolic myopathy in adult patients with diabetes mellitus. *Endocr Pract.* 2012;18(3):387-93.
- Gallego FQ, Damasceno DC. Análise morfológica das células beta-pancreáticas de ratas diabéticas em diferentes idades de vida. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2014.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Oxidative Stress: adaptation, damage, repair and death.* Oxford: Oxford University Press, 1998.
- Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiol.* 2008;192(1):127-35.
- Henriksson J. Effects of physical training on the metabolism of skeletal muscle. *Diabetes Care.* 1992;15(11):1701-11.

- Huang BK, Monu JUV, Doumanian J. Diabetic myopathy: MRI patterns and current trends. *AJR Am J Roentgenol.* 2010;195(1):198-204.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor-1 is required for pancreas development in mice. *Nature.* 1994;371:606–9.
- Katirji B, Al-Jaberi MM. Creatine kinase revisited. *J Clin Neuromusc Dis.* 2001;2(3):158-63.
- Kawanaka K, Nolte LA, Han D, Hansen PA, Holloszy JO. Mechanisms underlying impaired GLUT-4 translocation in glycogen-supercompensated muscles of exercised rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279:1311–8.
- Kim HJ, Park JY, Oh SL, Kim YA, So B, Seong JK, *et al.* Effect of treadmill exercise on interleukin-15 expression and glucose tolerance in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes Metab J.* 2013;37:358-64.
- Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* 2001;15:111–27.
- Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res.* 1985;4:110–25.
- Kriketos AD, Pan DA, Sutton JR, Hoh JFY, Baur LA, Cooney GJ, *et al.* Relationships between muscle membrane lipids, fiber type and enzyme activities in sedentary and exercised rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1995;269:1154-62.
- Lazo-Osório RA, Pereira R, Christofani JS, Russo AK, Machado M, Ribeiro W, *et al.* Effect of physical training on metabolic responses of pregnant rats submitted to swimming under termal stress. *J Res Med Sci.* 2009;14(4):223-30.
- Leite NC, Ferreira TR, Rickli S, Borck PC, Mathias PCF, Emilio HRO, *et al.* Glycolytic and mitochondrial metabolism in pancreatic islets from msg-treated obese rats subjected to swimming training. *Cell Physiol Biochem.* 2013;31:242-56.
- Leandro CG, Fidalgo M, Bento-Santos A, Falcão-Tebas F, Vasconcelos D, Castro RM, *et al.* Maternal moderate physical training during pregnancy attenuates the effects of a low-protein diet on the impaired secretion of insulin in rats: potential role for compensation of insulin resistance and preventing gestational *Diabetes mellitus*. *J Biomed Biotechnol.* 2012:1-7.
- Mastrocola R, Reffo P, Penna F, Tomasinelli CE, Boccuzzi G, Baccino FM, *et al.* Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: Role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:584-93.
- Matveyenko AV, Veldhuis JD, Butler PC. Adaptations in pulsatile insulin secretion, hepatic insulin clearance, and beta-cell mass to age-related insulin resistance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(4):832-41.
- Melin B, Bourdon L, Jimenez C, Charpenet A, Bernard O. Plasma myosin and creatine kinase time-course after a concentric-eccentric field exercise. *Arch Physiol Biochem.* 1997;105(1):27-31.
- Mota CSA, Ribeiro C, Araújo GG, de Araújo MB, Manchado-Gobatto FB, Voltarelli FA, *et al.* Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats. *BMC Endocr Disord.* 2008;8:11.
- Netto AO, Damasceno DC. Caracterização da intensidade do exercício físico (natação) em ratas prenhes: repercussões materno-fetais. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2016.
- Newsholme EA, Leech AR. *Biochemistry for the medical Science.* Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1989. 952p.
- Nosaka K, Newton M. Repeated eccentric bouts do not exacerbate muscle damage and repair. *J Strength Cond Res.* 2002;16(1):117-22.
- Nosaka K, Newton M, Sacco P, Chapman, D Lavender A. Partial protection against muscle damage by eccentric actions at short muscle lengths. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(5):746-53.
- Park S, Hong SM, Sung SR. Exendin-4 and exercise promotes β -cell function and mass through IRS2 induction in islets of diabetic rats. *Life Sciences.* 2008;82:503–11.
- Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology.* 1992;130(3):1459-66.
- Poprzącki S, Staszkiwicz A, Hübner-Woźniak E. Effect of eccentric and concentric exercise on plasma creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) activity in healthy adults. *Biol Sport.* 2004;21(2):193-203.
- Rawal S, Huang HH, Novikova L, Hamed T, Smirnova IV, Stehno-Bittel L. Effect of exercise on pancreatic islets in Zucker diabetic fatty rats. *J Diabetes Metab.* 2013;10:1-7.

- Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, Gao J, Holloszy JO. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14396-401.
- Rieck S, Kaestner KH. Expansion of β -cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(3):151–8.
- Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* 2004;279:42351–4.
- Saito FH, Damasceno DC, Kempinas WG, Morceli G, Sinzato YK, Taylor KN, *et al.* Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2(26):1-8.
- Silva ASR, Pauli JR, Ropelle ER, Oliveira AG, Cintra DE, de Souza CT, *et al.* Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2010;42(12):2180-8.
- Sinzato YK, Damasceno DC, Laufer-Amorim R, Rodrigues MMP, Oshiiwa M, Taylor KN, *et al.* Plasma concentrations and placental immunostaining of interleukin-10 and tumor necrosis factor- α as predictor of alterations in the embryo-fetal organism and the placental development of diabetic rats. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(3):206-11.
- Sinzato YK, Volpato GT, Iessi IL, Bueno A, Calderon IMP, Rudge MV, *et al.* Neonatally induced mild diabetes in rats and its effect on maternal, placental, and fetal parameters. *Exp Diabetes Res.* 2012;1-7.
- Smith LL, Fulmer MG, Holbert D, McCammon MR, Houmard JA, Frazer DD, *et al.* The impact of a repeated bout of eccentric exercise on muscular strength, muscle soreness and creatine kinase. *Br J Sports Med.* 1994;28(4):267-71.
- Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res.* 1997;29:301–7.
- Sussai DA, Carvalho PT, Dourado DM, Belchior AC, dos Reis FA, Pereira DM. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers Med Sci.* 2010;25(1):115-20.
- Tai MM. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. *Diabetes Care.* 1994;17:152-4.
- Tietz, N. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 4th edition, New York: Saunders, 2005.
- Tsuchiya M, Manabe Y, Yamada K, Furuichi Y, Hosaka M, Fujii NL. Chronic exercise enhances insulin secretion ability of pancreatic islets without change in insulin content in non-diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430:676–82.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
- Vanheest J, Rodgers CD. Effects of exercise in diabetic rats before and during gestation on maternal and neonatal outcomes. *Am J Physiol.* 1997;273(4):727-33.
- Volpato GT, Damasceno DC, Campos KE, Rocha R, Rudge MVC, Calderon IMP. Avaliação do efeito do exercício físico no metabolismo de ratas diabéticas prenhes. *Rev Bras Med Esporte.* 2006;12(5):229-33.
- Volpato GT, Damasceno DC, Kempinas WG, Rudge MVC, Calderon IMP. Effect of exercise on the reproductive outcome and fetal development of diabetic rats. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(6):852–8.
- Volpato GT, Damasceno DC, Sinzato YK, Ribeiro VM, Rudge MV, Calderon IM. Oxidative stress status and placental implications in diabetic rats undergoing swimming exercise after embryonic implantation. *Reprod Sci.* 2015;22(5):602-8.
- Yokokawa H, Kinoshita I, Hashiguchi T, Kako M, Sasaki K, Tamura A, *et al.* Enhanced exercise-induced muscle damage and muscle protein degradation in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *J Diabetes Investig.* 2011;2(6):423-8.