



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO

TRATAMENTO NEONATAL COM ALOXANA EM RATOS:
EFEITOS DO EXERCÍCIO

CAMILA APARECIDA MACHADO DE OLIVEIRA

RIO CLARO

2004



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO

**TRATAMENTO NEONATAL COM ALOXANA EM RATOS:
EFEITOS DO EXERCÍCIO**

CAMILA APARECIDA MACHADO DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof^a Dr^a MARIA ALICE ROSTOM DE MELLO

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade, Área de
Biodinâmica da Motricidade Humana.

RIO CLARO

2004

DEDICATÓRIA



Xuxa



Xuxinha

Para ficar registrado, digo apenas que foram parte importante da minha vida.

O quê sinto, prefiro guardar para mim.

À vocês, Xuxa, Xuxinha e Titica, dedico este trabalho.

Saudades...



Titica

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelas oportunidades.

À meus pais, Bernadete e Vicente, pelo apoio e ajuda em todos os momentos e por serem motivo de orgulho para mim.

À Profª Drª Maria Alice, pelo incentivo e confiança depositada em mim, e por ter desempenhado com tanta competência o seu papel de “Orientadora”.

À Profª Drª Eliete Luciano, uma das grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui, pela importante ajuda e por ter acreditado em mim desde a graduação.

À Clarice Sibuya, técnica do Laboratório de Biodinâmica, pelo fundamental auxílio nos experimentos e por ser uma verdadeira professora, ao me ensinar com tanta atenção as diferentes técnicas de laboratório.

À Aline Casonato, pela grande ajuda durante todo o mestrado e pela amizade verdadeira em todos os momentos.

Aos professores Eduardo Kokubun e Cláudio Alexandre Gobatto, pela ajuda com a análise estatística do trabalho.

Aos amigos Júlio (Bauru), Gustavo, Marcelo Papoti, Fúlvia, Fábio (Koquinho), Alexandre (Alê), Daniela Godoi, Camila de Moraes, Luciana, Mariana, Amanda, Ana Francisca, Wilton (Tito) e demais pessoas que, de alguma forma, me ajudaram nessa etapa da minha vida.

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

RESUMO

O exercício físico tem sido recomendado na prevenção do diabetes mellitus não insulino dependente (NIDDM), mas os mecanismos envolvidos nessa intervenção ainda não são bem conhecidos. Modelos experimentais oferecem oportunidade para o estudo dessa questão. Ratos tratados com streptozotocina no período neonatal têm sido empregados como modelo de NIDDM, porém, pouco se sabe sobre o modelo de diabetes neonatal induzido por aloxana. Com o objetivo de analisar os efeitos metabólicos da administração neonatal de aloxana, ratos recém nascidos (2 e 4 dias), de ambos os sexos, receberam a droga (200 mg/Kg p.c.-i.p.). Como controles foram utilizados ratos injetados com veículo (tampão citrato). Aos 28, 60 e 90 dias de idade os animais foram avaliados quanto a: glicemia de jejum, glicemia após administração de glicose e tolerância à glicose oral (GTT_o). Os resultados mostraram maior glicemia no GTT_o ($p > 0,05$) até os 60 dias nos grupos tratados com a droga, regredindo aos 90 dias em ambos os sexos. Aos 90 dias os animais foram sacrificados por decapitação. Ficou evidente que os machos que receberam a aloxana aos dois dias foram os mais prejudicados, mostrando os menores teores de insulina e razão proteína/DNA pancreáticos e os níveis mais elevados de A.G.L. sanguíneo ($p < 0,05$). Concluindo, embora a intolerância à glicose seja transitória, a recuperação dos animais é incompleta, pois algumas alterações metabólicas persistem.

Em outra série de experimentos, visando avaliar os efeitos do treinamento aeróbio sobre a manifestação das alterações metabólicas causadas pela aloxana, ratos recém nascidos (2 dias) receberam aloxana (200 mg/Kg de peso corporal) via intraperitoneal. Como controles foram utilizados ratos injetados com veículo (tampão citrato). Após o desmame (28 dias) parte dos ratos tratados com aloxana foram submetidos ao treinamento (natação 1h/dia, 5 dias/semana, com sobrecarga de 3% do peso corporal). Ao desmame, aos 60 e aos 90 dias de idade, os animais foram avaliados "in vivo" quanto a: glicemia de jejum, tolerância à glicose e resposta à insulina exógena. Decorridas 48 horas do teste de tolerância, e para os animais treinados, 48 horas após a última sessão de treino, os animais foram sacrificados por decapitação. Embora o quadro de hiperglicemia tenha regredido no grupo sedentário que recebeu a droga, algumas seqüelas permaneceram: elevação dos níveis de A.G.L., redução do teor de insulina pancreática; podendo ser prejudiciais à manutenção da homeostase. A atividade física atenuou parte dessas alterações. Por outro lado, agravou a intolerância à

glicose aos 90 dias, indicando a necessidade da adequação da intensidade do esforço físico para organismos diabéticos.

Palavras-chave: Modelo Neonatal de Diabetes, Aloxana, Treinamento Físico.

ABSTRACT

The present study was designed to analyse the metabolic effects of neonatal alloxan administration. Male and female newborn rats (2 and 4 days old) received alloxan (200 mg/Kg b.w.-i.p.). Vehicle injected rats were used as control. At 28, 60 and 90 days old the animals were evaluated with respect to: fasting glycemia, non-fasting glycemia and oral glucose tolerance (GTT_o). The results showed higher glycemia during the GTT_o ($p > 0,05$) in the alloxan injected rats than in controls at the 60th day old, but not at the 90th day. At 90 days old, the animals were sacrificed by decapitation. It was clearly demonstrated that the male rats receiving alloxan at the 2nd day of life were the most affected by the drug. They showed the lowest pancreatic insulin content and protein/DNA ratio and the highest serum F.F.A. levels ($p < 0,05$). In conclusion, although the glucose intolerance is transitory, the animals rehabilitation is incomplete, since some metabolic alterations remain.

In another series of experiment, to analyse the effects of aerobic physical training on the manifestation of the metabolic effects of alloxan, male newborn rats (2 days old) received alloxan (200 mg/Kg b.w.) intraperitoneally. Vehicle injected rats (citrate buffer) were used as control. After weaning, part of the alloxan treated rats were submitted to 1-h day⁻¹, 5-day week⁻¹ swimming, with an overload equivalent to 3% of the body weight. At 28, 60 and 90 days old the animals were submitted to a glucose (GTT_o) and insulin (ITT_{sc}) tolerance test. Forty eight hours after the last tolerance test, and to the trained animals, 48 hours after the last training, the animals were sacrificed by decapitation. Although the hyperglycaemia is transitory in the sedentary alloxan treated animals, some alterations remain: high serum F.F.A. levels, low pancreatic insulin content; which can be harmful to homeostasis maintenance. The rehabilitation induced by physical training was only partial. On the other hand, physical training impaired glucose tolerance at the 90th day, indicating the need of adequating the exercise intensity to diabetic condition.

Keywords: Neonatal Model of Diabetes, Alloxan, Physical Training.

ESTE PROJETO RECEBEU APOIO FINANCEIRO DA



FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

PROCESSO Nº 02/04814-8

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	07
2. OBJETIVOS.....	09
2.1 Objetivo geral.....	09
2.2 Objetivos específicos.....	09
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Diabetes mellitus.....	11
3.2 Exercício e o diabetes mellitus.....	12
3.3 Diabetes experimental	14
4. PRIMEIRO ESTUDO.....	16
4.1 Materiais e métodos.....	17
4.1.1 Animais.....	17
4.1.2 Cruzamento dos animais.....	17
4.1.3 Administração Neonatal de Aloxana.....	17
4.1.4 Grupos experimentais.....	18
4.1.5 Avaliações.....	18
4.1.5.1 Avaliações efetuadas antes do sacrifício.....	18
4.1.5.2 Avaliações efetuadas após o sacrifício.....	19
4.1.6 Análise estatística.....	20
4.2 Resultados.....	22
4.3 Discussão.....	36
4.4 Conclusão.....	41
5. SEGUNDO ESTUDO.....	42
5.1 Materiais e métodos.....	43
5.1.1 Animais.....	43
5.1.2 Cruzamento dos animais.....	43
5.1.3 Administração Neonatal de Aloxana	43
5.1.4 Grupos experimentais.....	44
5.1.5 Treinamento físico.....	44
5.1.6 Avaliações.....	44
5.1.6.1 Avaliações efetuadas antes do sacrifício.....	44
5.1.6.2 Avaliações efetuadas após o sacrifício.....	46
5.1.7 Análise estatística.....	48
5.2 Resultados.....	49
5.3 Discussão.....	67
5.4 Conclusão.....	71
6. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES GERAIS.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	74
8. APÊNDICE.....	81

1. INTRODUÇÃO

Fatores extrínsecos como dieta balanceada e exercício físico regular são essenciais ao adequado funcionamento do corpo humano e influenciam nas estatísticas de mortalidade, especialmente entre idosos. Atualmente tem-se dado grande importância à atividade física como forma de melhorar o nível de aptidão física e a qualidade de vida. O exercício físico tem sido cada vez mais recomendado na prevenção e na reabilitação de doenças cardiorespiratórias, osteoporose, diabetes e no combate ao estresse.

Particularmente, no tratamento do diabetes mellitus não insulino dependente (NIDDM), a prática regular do exercício físico tem sido considerada fundamental. Tal intervenção, comprovadamente, melhora a tolerância à glicose e reduz a resistência à insulina. Por essa razão, o treinamento físico tem sido indicado, também, na prevenção do NIDDM. Faltam, contudo, evidências diretas quanto ao efeito preventivo do exercício sobre a instalação do quadro de NIDDM, uma vez que esse tipo de pesquisa não é viável em seres humanos. Nesse contexto, modelos animais proporcionam condições mais adequadas ao estudo dessa questão.

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

Posteriormente, Kodama et al. (1993) desenvolveram um outro modelo, através da substituição da streptozotocina por aloxana. Nesse estudo a aloxana foi administrada aos 2, 4 ou 6 dias de vida. Quando analisados aos 60 dias de idade, os ratos que receberam aloxana no 2º dia de vida apresentaram glicemia no estado alimentado ligeiramente superior à de ratos controle, enquanto que aqueles que receberam a droga nos 4º e 6º dias mostraram glicemia significativamente maior que a dos controles. Os autores consideraram o modelo útil aos estudos sobre complicações crônicas do diabetes. Contudo, salientaram que mais estudos são necessários para determinar se o mesmo também tem características de NIDDM, como verificado no modelo streptozotocina neonatal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar um modelo experimental adequado ao estudo do papel do exercício na prevenção do diabetes mellitus.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as características gerais e metabólicas de ratos submetidos ao tratamento neonatal com aloxana;
- Verificar se o treinamento físico de caráter aeróbio exerce efeito modulador sobre as alterações metabólicas resultantes da administração neonatal de aloxana;
- Avaliar os efeitos decorrentes do treinamento físico sobre o desenvolvimento de órgãos chave (fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e pâncreas), relacionados à possível ação moduladora de efeitos crônicos da aloxana administrada em ratos neonatos.

Para atingir nossos objetivos foram realizados dois estudos:

- Primeiro estudo: Avaliação dos Efeitos Metabólicos da Administração Neonatal de Aloxana em Ratos.

- Segundo estudo: Modulação pelo Treinamento Físico dos Efeitos Crônicos da Aloxana Administrada em Ratos Neonatos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus resulta, na maioria dos casos, da secreção diminuída de insulina pelas células β das Ilhotas de Langerhans. Os diabéticos são classificados em dois grupos distintos, tomando-se por base se o diabetes é causado pela falta de insulina (Tipo I) ou pela resistência à sua ação (Tipo II).

O diabetes Tipo I, insulino-dependente (IDDM), é uma doença auto-imune, e afeta, sobretudo, as pessoas jovens. Como os diabéticos Tipo I não produzem insulina suficiente, são dependentes da insulina exógena (injetada) para a manutenção da glicemia dentro dos limites da normalidade. Já o diabetes tipo II, ocorre mais lenta e tardiamente do que o Tipo I (após os quarenta anos de idade) e é considerado não insulino dependente (NIDDM). O NIDDM 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).

Com relação à obesidade, sabe-se que os ácidos graxos inibem a biossíntese e a secreção de insulina pelas células β e interferem em ações mediadas por esse hormônio, sendo relacionados com o quadro de resistência periférica (BOUCHARD; DESPRÉS, 1989; CURI et al., 2001; KREBS et al., 2001; HAMEL et al., 2003; YANEY et al., 2003). O ciclo ácido graxo-glicose, ou ciclo de Randle, tem sido utilizado para explicar a resistência à insulina. Este se baseia na competição entre substratos, onde o aumento da disponibilidade de ácidos

graxos diminui a oxidação de glicose e vice-versa (RANDLE et al., 1963). Porém, trabalhos mais recentes sugerem que os ácidos graxos inibem a captação de glicose estimulada pela insulina ao invés de competir com esta na produção de ATP (COMBETTES-SOUVERAIN; ISSAD, 1998; LE MARCHAND-BRUSTEL, 1999) e que eles interferem nas vias de sinalização da insulina, reduzindo sua ação (HABER et al., 2002).

A falta da atividade física é um outro fator que pode desencadear o diabetes. Estudos epidemiológicos recentes têm proporcionado evidências de que o nível de atividade física está associado com a incidência do diabetes, independentemente da obesidade (BORGHOUTS; KEIZER, 2000). Contudo, o aumento da massa de tecido gorduroso, como citado anteriormente, acarreta uma resistência à insulina, a qual usualmente se encontra em quantidades adequadas no organismo. Portanto, alguns diabéticos NIDDM podem necessitar de insulina injetável ou de uma medicação oral que estimule o pâncreas a produzir insulina adicional (POWERS; HOWLEY, 2000).

Conseqüentemente, pelos motivos citados acima, o tratamento básico dos diabéticos NIDDM inclui a dieta e o exercício para reduzir o peso corporal e auxiliar no controle da glicemia (KELLEY; GOODPASTER, 1999).

3.2 Exercício e o Diabetes Mellitus

Os efeitos da falta de insulina no diabetes mellitus são conhecidos há muito tempo. Alguns casos mais leves de diabetes podem ser tratados com uma dieta especial e com atividades físicas e dispensam o uso da insulina.

Diversos trabalhos mostram os efeitos da falta de atividade física sobre a glicemia. Alguns estudos citados por Weineck (1999) mostraram que 3 meses de repouso absoluto eram suficientes para retardar a assimilação de glicose; este processo não foi observado em pessoas não submetidas ao repouso absoluto (pessoas que embora fazendo repouso na cama, foram submetidas a uma terapia de movimentos).

Atividades físicas aumentam a assimilação de glicose pelas células, em indivíduos normais e resistentes à insulina, mesmo que a concentração desta esteja baixa. O treinamento aumenta a sensibilidade dos tecidos à insulina, reduzindo a sua demanda. Isso ocorre porque o exercício causa múltiplas adaptações no músculo esquelético que contribuem para essa alteração, incluindo aumento na expressão da proteína Glut4, aumento da capacidade

enzimática e da capilarização muscular (BORGHOUTS; KEIZER, 2000; LEE et al., 2002). Como a musculatura representa 40% da massa corporal, a atividade muscular é muito significativa para o controle da glicemia e para prevenção do diabetes (WEINECK, 1999).

Além disso, estudos epidemiológicos recentes têm proporcionado evidências de que o nível de atividade física está associado com a incidência do NIDDM (ZINMAN et al., 2003). O risco de uma mulher que esteja engajada em algum tipo de exercício no mínimo uma vez por semana desenvolver este tipo de diabetes é 33% menor que em mulheres sedentárias (MANSON et al., 1991). Folsom et al. (2000) observaram que atividade física é um fator importante na prevenção de diabetes NIDDM em mulheres idosas. Ainda, estudos transversais têm mostrado que sujeitos treinados são mais sensíveis à insulina que sujeitos não treinados, e que embora a idade esteja associada com o declínio da sensibilidade à insulina, idosos treinados aerobiamente são mais sensíveis à insulina que jovens sedentários (SEALS et al., 1984).

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

No entanto, o efeito benéfico do exercício depende de o diabetes estar ou não razoavelmente “controlado” antes do início da atividade (ZINMAN et al., 2003). Controle significa que a glicemia deve encontrar-se próxima do normal. O diabético controlado possui insulina suficiente, de modo que a glicose pode ser captada pelos músculos durante o exercício e neutralizar o aumento normal da liberação de glicose hepática decorrente da ação das catecolaminas e do glucagon (POWERS; HOWLEY, 2000).

Finalmente deve ficar claro que, embora o esforço físico seja recomendado para pessoas suscetíveis ao diabetes e para diabéticos, ele não é aconselhável em casos de descompensação, pois pode levar à formação de corpos cetônicos. Um metabolismo correto é, portanto, pré-requisito para o trabalho muscular, como forma de terapia do diabetes (WEINECK, 1999).

3.3 Diabetes Experimental

Diabetes quimicamente induzido em animais tem sido amplamente empregado como modelo experimental para os estudos das complicações causadas pelo diabetes. Streptozotocina (STZ) é a droga mais popular para a indução do diabetes em ratos (BALAMURUGAN et al., 2003). A administração de STZ a ratos adultos produz diabetes severo que, muitas vezes, necessita de administração de insulina quando os ratos precisam sobreviver por longo período (RERUP, 1970). Por outro lado, ratos recém nascidos tratados com STZ desenvolvem hiperglicemia leve a moderada na idade adulta, assemelhando-se ao NIDDM (PORTHA et al., 1989; CHANG et al., 2001; CUMAN et al., 2001; MURALI; GOYAL, 2001). Embora ambos os tipos de diabetes induzidos pela STZ venham sendo amplamente utilizados, existem alguns problemas para experimentos crônicos, especialmente recuperação espontânea da hiperglicemia pelo desenvolvimento de insulinoma funcionante (STEINER et al., 1970; YAMAGAMI et al., 1985; IWASE et al., 1991) e alta incidência de tumores no fígado e nos rins (ARISON; FEUDALE, 1967; MAUER et al., 1974; IWASE et al., 1989). Esses problemas são devido à forte ação oncogênica da STZ (KASUMI et al., 1978). Já a aloxana, uma droga mais antiga que a STZ, tem pequena ação oncogênica (YAMAGAMI et al., 1985), mas é menos empregada que esta, devido às dificuldades por alguns grupos de pesquisa em induzir o diabetes e manter os animais em boas condições. Em nossos laboratórios muitas dessas dificuldades foram superadas devido ao aprimoramento na técnica de administração da droga, de forma que nas últimas duas décadas temos conseguido induzir o diabetes e manter os animais em boas condições por longos períodos (MELLO; LUCIANO, 1995; LUCIANO; MELLO, 1998).

A aloxana possui um efeito seletivamente tóxico sobre as células beta das ilhotas de Langerhans, no pâncreas (MROZIKIEWIC et al., 1994). Lenzen e Panten (1988) citam em seus estudos que no modelo experimental de diabetes aloxânico, os animais apresentam sintomas semelhantes aos encontrados no diabetes mellitus em humanos, tais como perda de peso corporal, polidipsia, polifagia, poliúria, glicosúria, cetonúria, hiperglicemia e cetonemia. Embora os mecanismos pelos quais isso ocorre não sejam totalmente conhecidos, acredita-se que haja envolvimento de reações mediadas por radicais livres que, como se sabe, danificam as células e provocam a ocorrência de doenças auto-imunes (MROZIKIEWIC et al., 1994).

Na última década, acumularam-se evidências, a partir de dados experimentais obtidos em estudos “in vivo” e “in vitro” de que células beta das ilhotas pancreáticas são capazes de se recuperar após danos (EIZIRIK et al., 1993), especialmente quando provenientes de organismos jovens. Tendo por base essa informação, Kodama et al. (1993) desenvolveram um modelo de diabetes menos severo através da administração neonatal de aloxana em ratos. Esses autores constataram que a diabetogenicidade da droga aumentou à medida que a idade da administração avançou do segundo para o sexto dia de vida e que a hiperglicemia observada persistiu por um ano com taxa elevada de sobrevivência. Ainda conforme os mesmos autores, mais estudos são necessários para verificar se esse modelo apresenta ou não características de NIDDM.

4. Primeiro Estudo

Avaliação dos Efeitos Metabólicos da Administração Neonatal de Aloxana em Ratos

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Animais

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

4.1.2 Cruzamento dos Animais

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

4.1.3 Administração Neonatal da Aloxana

Aos dois ou aos quatro dias de idade os filhotes, de ambos os sexos, receberam injeção intra-peritoneal de aloxana monoidratada dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (200

mg/Kg de peso corporal), após jejum de 16 horas. Como controle, foram utilizados ratos da mesma idade injetados com veículo (tampão citrato). Em seguida, as crias foram distribuídas de forma que cada mãe amamentasse 8 filhotes.

4.1.4 Grupos Experimentais

Após o desmame (28 dias) os filhotes, de ambos os sexos (M=macho; F=fêmea), foram separados em 3 grupos e permaneceram em tratamento até os 90 dias de idade:

- Controles (C): ratos injetados com tampão citrato;
- Aloxana 2 dias (D): ratos injetados com aloxana aos 2 dias de vida;
- Aloxana 4 dias (Q): ratos injetados com aloxana aos 4 dias de vida.

4.1.5 Avaliações

4.1.5.1 Avaliações Efetuadas Antes do Sacrifício

4.1.5.1.1 Avaliações Gerais

Todos os animais tiveram peso corporal e ingestão alimentar e hídrica registrados semanalmente. Os resultados foram expressos como áreas sob as curvas de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica ($\Sigma P = g \times 10 \text{ semanas}$; $\Sigma A = g \text{ de ração}/100 g \text{ de peso corporal} \times 10 \text{ semanas}$; $\Sigma H = mL \text{ de água}/100 g \text{ de peso corporal} \times 10 \text{ semanas}$, respectivamente), calculadas pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990), utilizando o *Software* ORIGIN 6.0 (1999).

4.1.5.1.2 Glicemia

A avaliação dos efeitos da aloxana foi efetuada nos animais ao desmame (28 dias) e repetida aos 60 e 90 dias de idade, pela determinação da glicemia em jejum de 15 horas e da glicemia determinada 30 minutos após a administração de solução de glicose (2,0 g/kg p. c.) por sonda oro-gástrica pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990).

4.1.5.1.3 *Teste de Tolerância à Glicose Oral (GTT_O)*

Foi realizado após 15 horas de jejum, com os animais aos 28, 60 e 90 dias de idade. Os ratos foram moderadamente anestesiados com éter etílico e a primeira coleta de sangue foi feita da cauda do animal ao tempo zero (0). Em seguida, uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago pôr via oral e uma solução de glicose de 20% (2,0 g/Kg de peso corporal) administrada. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL. Após a administração da glicose a determinação da glicemia foi realizada pelo método da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990), através da coleta de 25 µL de sangue e dissolvidos em 200 µL de TCA 4%. O cálculo da área sob a curva de glicose sangüínea ($\Delta G = \text{mM} \times 90\text{min}^{-1}$), durante o GTT_O foi feito pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990) utilizando o *Software* ORIGIN 6.0 (1999).

4.1.5.1.4 *Teste de Tolerância à Insulina Subcutânea (ITT_{sc})*

Com os animais aos 21, 60 e 90 dias de idade, utilizando-se o mesmo procedimento que foi adotado no teste de tolerância à glicose oral quanto a anestesia e local da coleta de sangue, a insulina foi injetada na região dorsal via subcutânea (LATORRACA et al., 1998), na concentração de 30 mU/100g de peso corporal. Amostras de sangue foram coletadas em capilares heparinizados nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos para determinação da glicose sangüínea pelo método da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990). A taxa de remoção da glicose ($K_{\text{itt}} = \% \times \text{min}^{-1}$), durante o teste de tolerância à insulina (ITT_{sc}) foi calculada a partir das concentrações de glicose sangüínea obtidas nos tempos 0, 30 e 60 do ITT_{sc}, utilizando-se a fórmula: $(0,0693 / t_{1/2}) \times 100$. A glicose sangüínea ($t_{1/2}$) foi calculada através da curva de análise dos mínimos quadrados dos teores de glicose do sangue de 0 a 30 após a administração da insulina, quando as concentrações sangüíneas de glicose decaem linearmente (LUNDBAEK, 1962).

4.1.5.2 *Avaliações Efetuadas após o Sacrifício*

4.1.5.2.1 *Sacrifício dos Animais*

Aos 90 dias de idade, decorridas 48 horas do teste de tolerância, todos os animais foram sacrificados por decapitação, sem jejum prévio, para a obtenção de material biológico.

4.1.5.2.2 *Avaliações Efetuadas no Sangue*

Amostras de sangue foram coletadas para verificação dos teores de glicose, ácidos graxos livres, proteínas totais (NOGUEIRA et al., 1990) e insulina (kit DPC Coat-A-Count).

4.1.5.2.3 *Avaliações Efetuadas em Tecidos*

Fígado, músculo sóleo, tecido adiposo epididimal esquerdo e pâncreas foram totalmente extirpados e pesados em balança analítica. Nesses tecidos foram avaliados teores de proteína total (LOWRY et al., 1951) e DNA (GILES; MAYERS, 1965), visando inferir sobre o número (DNA) e tamanho (razão proteína/DNA) das células (WINICK et al., 1972). No fígado foram medidas, também, as concentrações de lipídeos (NOGUEIRA et al., 1990) e de glicogênio (DUBOIS et al., 1956). No músculo foi avaliado o conteúdo de glicogênio e, no pâncreas, o teor de insulina.

4.1.5.2.4 *Extração da Insulina Pancreática*

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

4.1.6 **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) com duas fontes de variação: gênero e

dia de administração da droga. Quando necessário foi utilizado o teste Post Hoc de Newman-Keuls, com um nível de significância pré-estabelecido de 5%.

4.2 RESULTADOS

A Tabela 1 e Figura 1 apresentam os resultados referentes às áreas sob as curvas de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica dos animais no período experimental. A análise estatística encontrou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas no parâmetro peso corporal, onde os machos mostraram maior área quando comparados às fêmeas.

Os dados da glicemia de jejum, glicemia 30 minutos após administração oral de glicose e área sob a curva de glicose no GTTo dos animais ao desmame (28 dias) encontram-se na Tabela 2 e Figura 2. A glicemia de jejum não foi diferente entre os grupos. Com relação à glicemia após administração oral de glicose, os machos que receberam a droga (DM e QM) tiveram valores glicêmicos elevados ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (C). Apenas as fêmeas do grupo QF apresentaram maior concentração de glicose no sangue ($p < 0,05$) que as fêmeas dos demais grupos (CF e DF). Para a área sob a curva de glicose sangüínea no GTTo, a ANOVA mostrou que os grupos que receberam aloxana mostraram maior área ($p < 0,05$) que os grupo controle em ambos os gêneros. Conforme Tabela 2 e Figura 2 podemos notar ainda que, entre os machos, o grupo DM apresentou maiores valores que o grupo QM. Entre as fêmeas, o grupo QF teve área maior que o outro grupo que recebeu a droga (DF). Entre os animais que receberam a droga aos dois dias, a ação mais acentuada foi encontrada nos machos ($DM > DF$) ao passo que entre os animais que receberam aloxana aos quatro dias, as fêmeas mostraram-se mais sensíveis à aloxana ($QF > QM$), apresentando maiores níveis glicêmicos. A análise estatística revelou interação entre os fatores gênero e dia de administração da droga nos parâmetros glicemia pós-prandial e área sob a curva de glicose.

Aos 60 dias, encontramos interação entre gênero e dia de administração da droga nos três parâmetros mostrados na Tabela 3 e Figura 3. Entre os machos, apenas o grupo que recebeu aloxana aos 2 dias mostrou maior glicemia de jejum e após administração oral de glicose que o grupo controle ($p < 0,05$). Com relação às fêmeas, o grupo QF apresentou maior glicemia de jejum que os grupos CF e DF. Trinta minutos após sobrecarga oral de glicose, o grupo DF teve menor glicemia que o grupo CF e QF. A área sob a curva de glicose sangüínea no GTTo aos 60 dias apresentou comportamento semelhante ao observado aos 28 dias, com o grupo DM, apresentando maiores valores glicêmicos enquanto que entre as fêmeas isso ocorreu no grupo Q (Tabela 3 e Figura 3).

Os resultados observados na Tabela 4 e Figura 4 referem-se à glicemia dos animais aos 90 dias. Para a glicemia de jejum a ANOVA apontou diferença entre gêneros, período de administração da droga e interação entre gênero e droga. Os machos não diferiram entre si ao passo que as fêmeas que receberam aloxana tiveram menor glicemia que as controle ($p < 0,05$). Além disso, os machos dos grupos DM e QM apresentaram maiores valores glicêmicos que as fêmeas dos respectivos grupos. Os valores da glicemia após sobrecarga de glicose foram semelhantes para todos os grupos. A estatística não apontou diferença significativa entre os grupos para área sob a curva de glicose sangüínea durante GTTo.

O teste de tolerância à insulina subcutânea (ITTsc) aplicado ao desmame (28 dias) não identificou diferença na glicemia entre os ratos dos diferentes grupos antes ou 30, 60 e 90 minutos após administração subcutânea de insulina (30 mU/100 g p.c.). Desta forma, a taxa de remoção de glicose (Kitt) também não diferiu entre os grupos estudados (Tabela 5 e Figura 5).

Com 60 dias de idade, os animais não apresentaram diferença glicêmica antes da administração da insulina no ITTsc. Trinta minutos após esta aplicação, a glicemia do grupo QM foi maior que a dos grupos CM, DM e QF. O mesmo ocorreu aos 60 minutos, quando além dessas alterações, os grupos DF e QF tinham glicemia menor que seu grupo controle (CF). Aos 90 minutos, a única diferença constatada foi a menor glicemia do grupo QF em relação ao grupo QM. Assim, o Kitt do grupo QM foi menor que dos grupos CM, DM e QF (Tabela 6 e Figura 6).

Aos 90 dias, as únicas alterações encontradas durante o ITTsc foram a maior glicemia do grupo QF em relação ao CF trinta minutos após aplicação da insulina e maior glicemia do

grupo CM em relação ao CF após 60 minutos. Nenhuma diferença foi encontrada no Kitt, conforme Tabela 7 e Figura 7.

Os teores de glicose, insulina, proteínas totais e ácidos graxos livres do soro dos animais após o sacrifício encontram-se na Tabela 8 e Figura 8. A análise de variância não mostrou diferença entre os grupos quanto à glicose sérica. Machos e fêmeas também não apresentaram valores diferentes ($p < 0,05$) para os níveis de insulina e proteínas totais, com exceção do grupo QM, que teve maior teor de proteínas totais que o grupo QF. Com relação aos ácidos graxos livres, a estatística revelou diferença significativa em função da droga e interação entre as duas fontes de variação. As fêmeas não diferiram entre si, ao passo que os machos que receberam aloxana aos 2 dias tiveram maior teor de ácidos graxos livres que os machos dos demais grupos (CM e QM) e as fêmeas que também receberam a droga aos 2 dias (Tabela 8 e Figura 8).

A Tabela 9 e Figura 9 mostram os teores de insulina e razão proteína/DNA do pâncreas dos animais bem como os teores de glicogênio e razão proteína/DNA do músculo sóleo após o sacrifício. A análise dos resultados mostrou interação entre gênero e dia de administração da droga para o primeiro parâmetro supracitado. Entre os machos, o grupo DM apresentou menores níveis do hormônio ($p < 0,05$) que os grupos CM e QM, e ainda que o respectivo grupo do gênero oposto. Para as fêmeas nenhuma alteração foi observada. O grupo DM também teve valores reduzidos da razão proteína/DNA quando comparados com os animais do grupo CM e QM. As fêmeas que receberam aloxana aos 4 dias (QF) apresentaram maior valor deste parâmetro que os ratos dos grupos CF, DF e QM. Os níveis de glicogênio muscular não foram diferentes entre os grupos. A razão proteína/DNA do músculo sóleo foi diferente ($p < 0,05$) entre os gêneros, com as fêmeas que receberam aloxana tendo valores superiores aos dos machos dos respectivos grupos.

Na Tabela 10 e Figura 10 temos a razão proteína/DNA, teores de glicogênio e lipídeos hepáticos e razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal. A estatística mostra diferença em função da aloxana e interação entre gênero e período de administração da droga ($p < 0,05$) para a razão proteína/DNA do fígado. As fêmeas não foram diferentes entre si, enquanto que entre os machos, o grupo DM teve menor valor que os grupos CM e QM. O grupo QM teve maior valor da razão proteína/DNA que o grupo QF. A quantidade de glicogênio hepático foi maior para os machos ($p < 0,05$) dos grupos C e D quando comparados às fêmeas dos mesmos grupos, e menor para as fêmeas que receberam aloxana aos 2 dias que para as demais (CF e

QF). Com relação aos lipídeos hepáticos, diferenças em função do genro, da aloxana e interação foram apontadas pela ANOVA. As fêmeas do grupo QF tiveram teores reduzidos de lipídeos ($p < 0,05$) comparados as do grupo CF, DF e QM. Entre os machos, não houve alteração. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos para a razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal (Tabela 10 e Figura 10).

Tabela 1: Áreas sob as curvas de peso corporal (?P, g x 10 semanas), ingestão alimentar (?A, g de ração/100 g de peso corporal x 10 semanas) e ingestão hídrica (?H, mL de água/100 g de peso corporal x 10 semanas) dos animais durante o período experimental. (?P = área sob a curva de peso corporal; ?A = área sob a curva de ingestão alimentar; ?H = área sob a curva de ingestão hídrica).

Grupos	?P	?A	?H
CM (n=04)	2787,05 $\pm$ 166,60*	74,44 $\pm$ 2,85	117,49 $\pm$ 8,00
DM (n=04)	2894,06 $\pm$ 143,52*	75,70 $\pm$ 4,31	106,43 $\pm$ 6,88
QM (n=03)	2896,85 $\pm$ 131,08*	70,59 $\pm$ 2,44	111,76 $\pm$ 7,90
CF (n=03)	1885,00 $\pm$ 160,01	72,19 $\pm$ 6,98	110,80 $\pm$ 12,24
DF (n=03)	1833,56 $\pm$ 32,04	72,68 $\pm$ 0,81	117,85 $\pm$ 2,88
QF (n=03)	1808,00 $\pm$ 116,82	71,61 $\pm$ 2,67	114,50 $\pm$ 14,71

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de observações entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto.

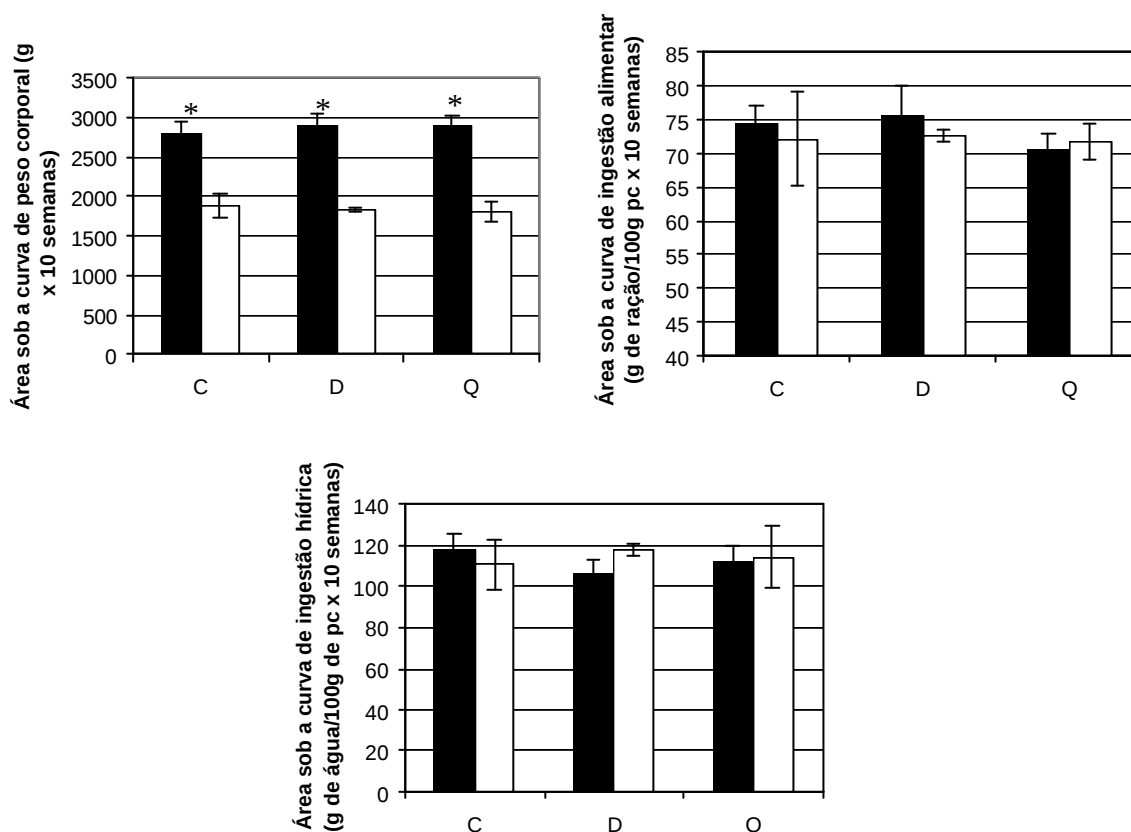


Figura 1: Áreas sob as curvas de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica dos animais durante o período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto. | = Macho; ? = Fêmea.

Tabela 2: Glicemia (mmol/L) de jejum e após administração oral de glicose e área sob a curva de glicose no GTTo (mmol/L x 90min) dos animais ao desmame (28 dias).

Grupos	Glicemia de Jejum	Glicemia após Administração de Glicose	Área sob a Curva de Glicose
CM (n=11)	2,87 $\pm$ 0,56	5,61 $\pm$ 0,63	440,90 $\pm$ 36,40
DM (n=27)	3,71 $\pm$ 1,28	7,65 $\pm$ 1,18 ^a	595,67 $\pm$ 50,32 ^{a,*}
QM (n=29)	3,63 $\pm$ 0,95	6,84 $\pm$ 0,95 ^a	527,97 $\pm$ 45,15 ^{a,b,*}
CF (n=06)	3,18 $\pm$ 0,33	5,66 $\pm$ 1,00	457,90 $\pm$ 49,00
DF (n=15)	3,20 $\pm$ 0,37	6,55 $\pm$ 1,12	521,02 $\pm$ 58,20 ^c
QF (n=20)	3,21 $\pm$ 0,64	7,85 $\pm$ 1,77 ^{c,d}	574,17 $\pm$ 75,54 ^{c,d}

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. Glicemia de jejum = após 15 horas de jejum; Glicemia após administração oral de glicose = 30 min. após sobrecarga oral de glicose 2,0 g/Kg p.c.; GTTo = sobrecarga oral de glicose de 2,0 g/Kg p.c. após 15 horas de jejum, com coletas de sangue antes e após 30, 60 e 90 minutos. a $\neq$ CM; b $\neq$ DM; c $\neq$ CF; d $\neq$ DF; * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto.

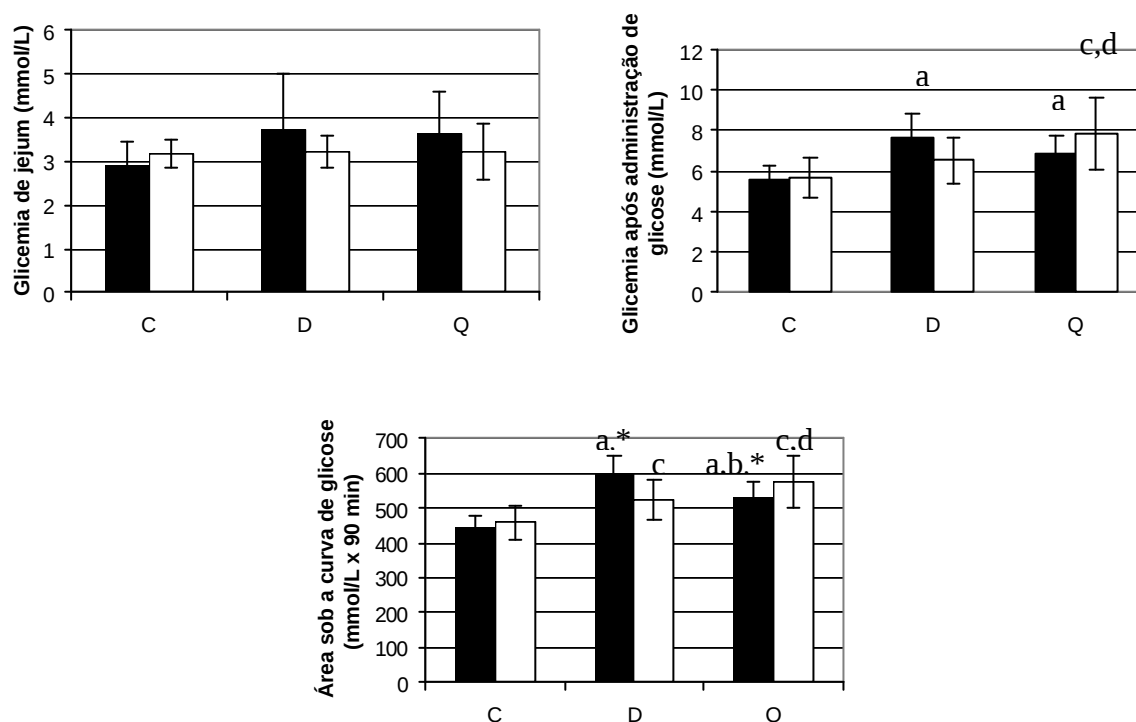


Figura 2: Glicemia de jejum e após administração oral de glicose e área sob a curva de glicose no GTTo dos animais ao desmame (28 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. ! = Macho; ? = Fêmea.

Tabela 3: Glicemia (mmol/L) de jejum e após administração oral de glicose e área sob a curva de glicose no GTTo (mmol/L x 90min) dos animais aos 60 dias.

Grupos	Glicemia de Jejum	Glicemia após Administração de Glicose	Área sob a Curva de Glicose
CM (n=08)	3,13 ± 0,61	4,70 ± 0,67	388,16 ± 42,73
DM (n=19)	4,37 ± 0,92 ^{a,*}	5,63 ± 0,81 ^a	470,56 ± 60,32 ^{a,*}
QM (n=09)	3,73 ± 0,82 [*]	5,34 ± 0,60	447,28 ± 50,97 ^{a,*}
CF (n=09)	2,88 ± 0,38	5,30 ± 0,47	428,26 ± 19,86
DF (n=09)	3,28 ± 0,47	4,64 ± 0,44 ^c	391,41 ± 20,80 ^c
QF (n=06)	4,86 ± 0,53 ^{c,d}	5,92 ± 0,74 ^d	508,15 ± 46,46 ^{c,d}

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. Glicemia de jejum = após 15 horas de jejum; Glicemia após administração oral de glicose = 30 min. após sobrecarga oral de glicose 2,0 g/Kg p.c.; GTTo = sobrecarga oral de glicose de 2,0 g/Kg p.c. após 15 horas de jejum, com coletas de sangue antes e após 30, 60 e 90 minutos. a ≠ CM; b ≠ DM; c ≠ CF; d ≠ DF; * ≠ respectivo grupo do gênero oposto.

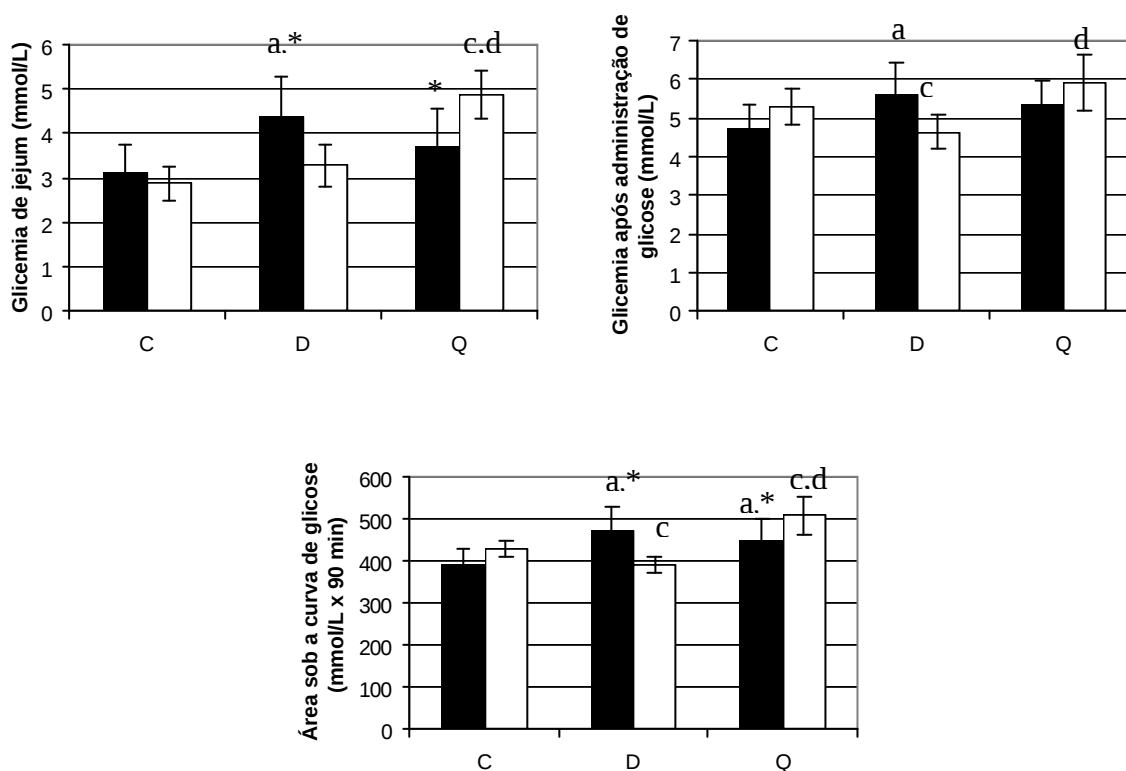


Figura 3: Glicemia de jejum e após administração oral de glicose e área sob a curva de glicose no GTTo dos animais aos 60 dias. Resultados expressos como média ± desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. | = Macho; ? = Fêmea.

Tabela 4: Glicemia (mmol/L) de jejum e após administração oral de glicose e área sob a curva de glicose no GTTo (mmol/L x 90min) dos animais aos 90 dias.

Grupos	Glicemia de Jejum	Glicemia após Administração de Glicose	Área sob a Curva de Glicose
CM (n=08)	3,45 ± 0,27	4,75 ± 0,49	401,80 ± 47,92
DM (n=08)	3,48 ± 0,32*	4,36 ± 0,43	389,88 ± 29,53
QM (n=05)	3,41 ± 0,46*	4,27 ± 0,41	371,10 ± 40,05
CF (n=05)	3,50 ± 0,34	5,00 ± 0,30	417,35 ± 22,35
DF (n=10)	2,94 ± 0,19 ^c	4,36 ± 0,67	373,84 ± 44,73
QF (n=08)	2,76 ± 0,27 ^c	4,57 ± 0,96	366,57 ± 39,47

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. Glicemia de jejum = após 15 horas de jejum; Glicemia após administração oral de glicose = 30 min. após sobrecarga oral de glicose 2,0 g/Kg p.c.; GTTo = sobrecarga oral de glicose de 2,0 g/Kg p.c. após 15 horas de jejum, com coletas de sangue antes e após 30, 60 e 90 minutos. a ≠ CM; b ≠ DM; c ≠ CF; d ≠ DF; * ≠ respectivo grupo do gênero oposto.

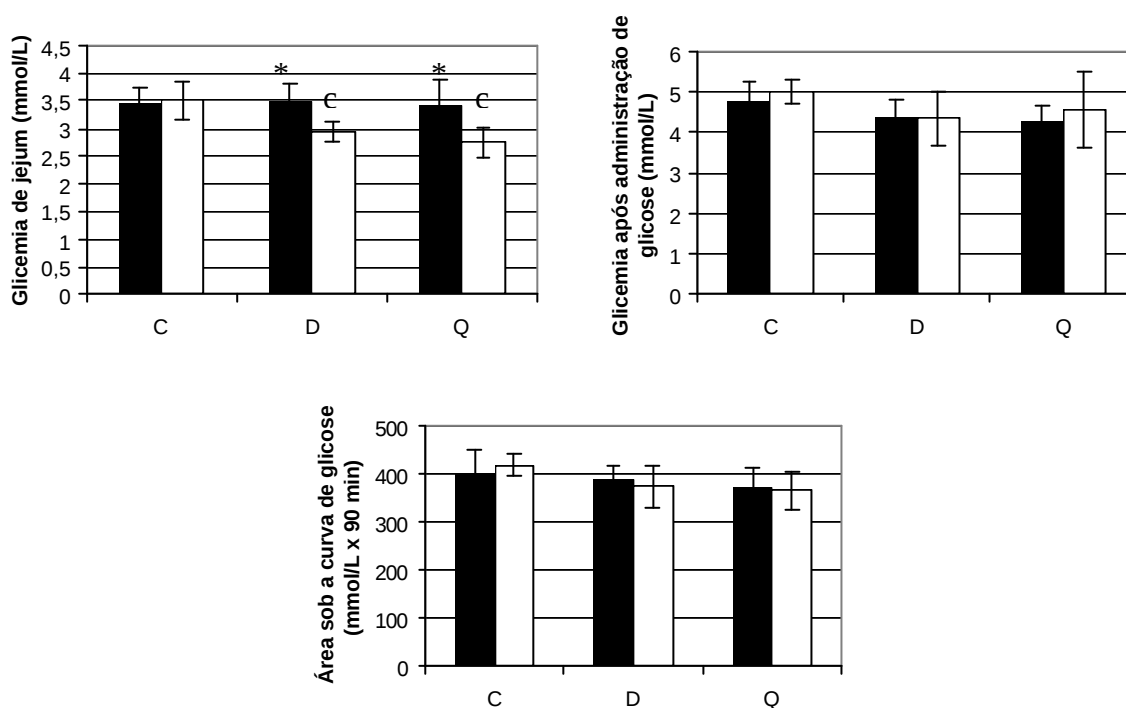


Figura 4: Glicemia de jejum e após administração oral de glicose e área sob a curva de glicose no GTTo dos animais aos 90 dias. Resultados expressos como média ± desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. | = Macho; ? = Fêmea.

Tabela 5: Glicemia (mmol/L) e taxa de remoção de glicose ($K_{itt} = \% \times \text{min}^{-1}$), calculada utilizando amostras do soro dos animais durante ITTsc ao desmame (28 dias).

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	K _{itt}
CM (n=09)	4,25 ± 0,47	2,91 ± 0,61	3,47 ± 0,78	3,79 ± 0,69	1,08 ± 0,40
DM (n=09)	4,59 ± 0,40	2,98 ± 0,56	3,52 ± 0,99	3,43 ± 0,73	1,45 ± 0,57
QM (n=09)	4,64 ± 0,42	2,82 ± 0,27	3,23 ± 0,44	3,64 ± 0,45	1,74 ± 0,32
CF (n=14)	4,65 ± 0,85	3,30 ± 0,69	3,24 ± 1,04	3,61 ± 1,07	1,15 ± 0,70
DF (n=09)	4,38 ± 0,41	2,77 ± 0,64	3,35 ± 1,11	3,69 ± 0,71	1,73 ± 0,73
QF (n=10)	4,78 ± 0,39	2,61 ± 0,75	3,62 ± 1,40	3,69 ± 0,60	1,74 ± 0,74

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias.

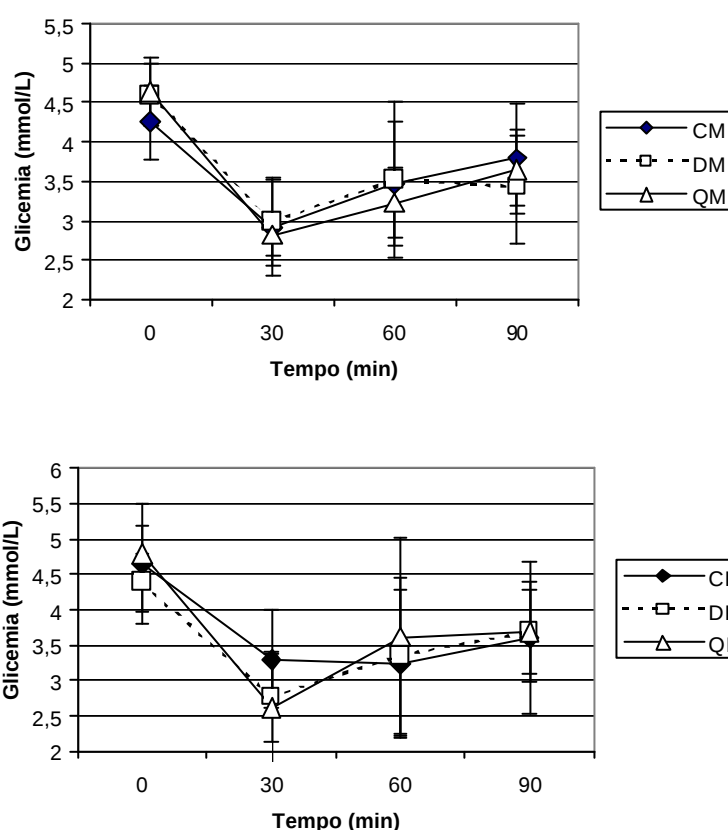


Figura 5: Glicemia dos animais durante ITTsc ao desmame (28 dias). Resultados expressos como média ± desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias.

Tabela 6: Glicemia (mmol/L) e taxa de remoção de glicose (Kitt = % x min⁻¹), calculada utilizando amostras do soro dos animais durante ITTsc aos 60 dias.

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	Kitt
CM (n=05)	4,59 ± 0,46	3,45 ± 0,51	3,00 ± 0,69	3,82 ± 0,66	0,96 ± 0,39
DM (n=18)	4,52 ± 0,49	3,28 ± 0,35	3,73 ± 0,69	3,82 ± 0,66	1,16 ± 0,37
QM (n=10)	4,41 ± 0,28	3,92 ± 0,34 ^{a,b}	4,47 ± 0,57 ^{a,b}	4,51 ± 0,31	0,39 ± 0,14 ^{a,b}
CF (n=15)	4,61 ± 0,62	3,18 ± 0,41	3,56 ± 0,92	3,70 ± 1,14	1,22 ± 0,40
DF (n=15)	4,24 ± 0,35	2,91 ± 0,28	2,41 ± 0,48 ^{c,*}	3,01 ± 0,67	1,25 ± 0,39
QF (n=05)	4,43 ± 0,24	2,93 ± 0,30 [*]	2,15 ± 0,30 ^{c,*}	2,97 ± 0,27 [*]	1,38 ± 0,32 [*]

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a ≠ CM; b ≠ DM; c ≠ CF; d ≠ DF; * ≠ respectivo grupo do gênero oposto.

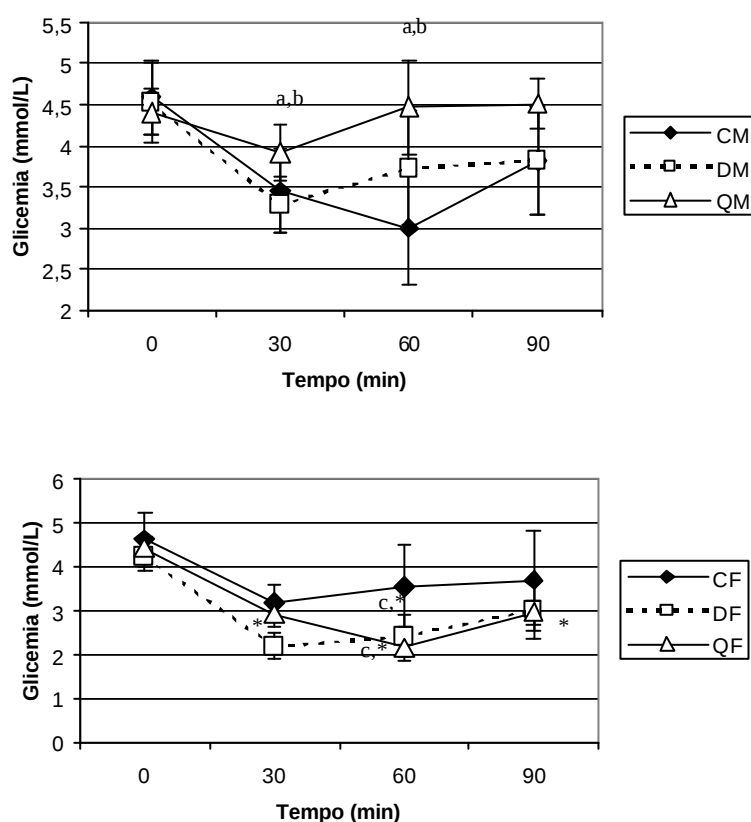


Figura 6: Glicemia dos animais durante ITTsc aos 60 dias. Resultados expressos como média ± desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a ≠ CM; b ≠ DM; c ≠ CF; d ≠ DF; * ≠ respectivo grupo do gênero oposto.

Tabela 7: Glicemia (mmol/L) e taxa de remoção de glicose ($K_{it} = \% \times \text{min}^{-1}$), calculada utilizando amostras do soro dos animais durante ITTsc aos 90 dias.

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	K _{it}
CM (n=07)	3,64 ± 0,25	3,15 ± 0,36	3,59 ± 0,33	3,55 ± 0,14	0,48 ± 0,24
DM (n=07)	3,55 ± 0,26	3,11 ± 0,28	3,03 ± 0,27	3,11 ± 0,39	0,43 ± 0,15
QM (n=08)	3,49 ± 0,20	3,03 ± 0,20	3,03 ± 0,20	2,92 ± 0,36	0,56 ± 0,13
CF (n=09)	3,46 ± 0,18	2,88 ± 0,34	2,73 ± 0,49*	2,88 ± 0,55	0,57 ± 0,15
DF (n=08)	3,55 ± 0,22	3,09 ± 0,15	3,22 ± 0,76	3,16 ± 0,63	0,49 ± 0,22
QF (n=05)	3,81 ± 0,24	3,39 ± 0,22 ^c	3,29 ± 0,23	3,35 ± 0,30	0,56 ± 0,14

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a ≠ CM; b ≠ DM; c ≠ CF; d ≠ DF; * ≠ respectivo grupo do gênero oposto.

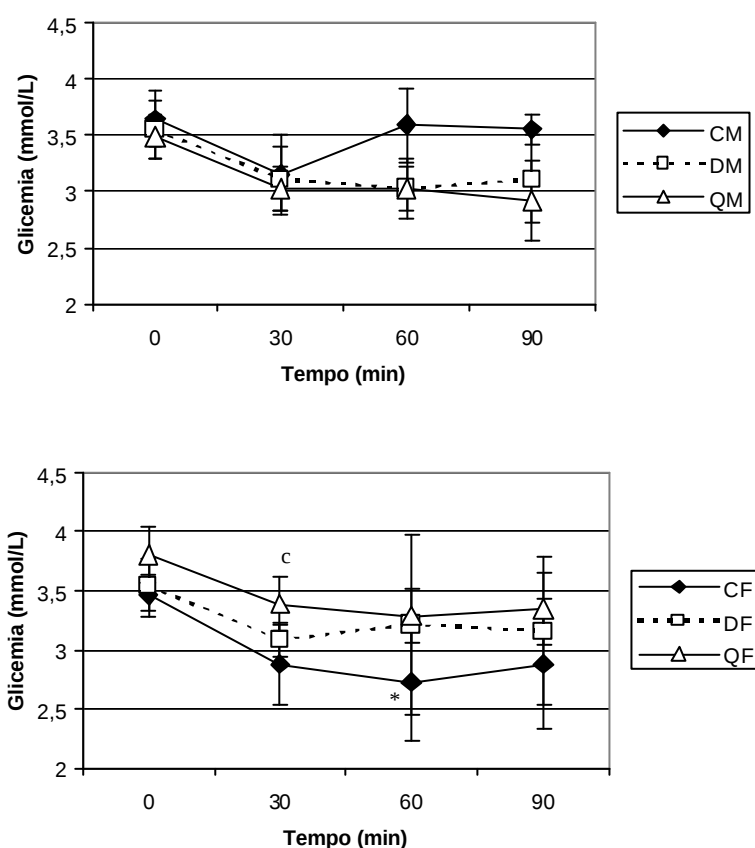


Figura 7: Glicemia dos animais durante ITTsc aos 90 dias. Resultados expressos como média ± desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a ≠ CM; b ≠ DM; c ≠ CF; d ≠ DF; * ≠ respectivo grupo do gênero oposto.

Tabela 8: Teores de glicose (mmol/L), insulina (pmol/L), proteínas totais (g/dL) e ácidos graxos livres (A.G.L., em $\mu\text{Eq/L}$) do soro dos animais obtidos após o sacrifício (90 dias).

Grupos	Glicose	Insulina	Proteínas Totais	AGL
CM (n=08)	5,72 $\pm$ 1,13	86,26 $\pm$ 6,95	7,17 $\pm$ 0,97	101,40 $\pm$ 22,40
DM (n=08)	5,56 $\pm$ 0,94	97,76 $\pm$ 21,37	6,97 $\pm$ 0,76	231,12 $\pm$ 58,59 ^{a,*}
QM (n=08)	5,46 $\pm$ 1,56	93,86 $\pm$ 18,38	7,55 $\pm$ 0,56*	127,35 $\pm$ 28,07 ^b
CF (n=08)	5,56 $\pm$ 1,43	77,95 $\pm$ 9,72	6,57 $\pm$ 0,79	158,01 $\pm$ 62,11
DF (n=08)	6,78 $\pm$ 1,24	78,31 $\pm$ 9,94	6,10 $\pm$ 0,33	134,42 $\pm$ 45,59
QF (n=08)	7,08 $\pm$ 1,16	87,33 $\pm$ 22,29	6,59 $\pm$ 0,30	146,22 $\pm$ 106,13

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a $\neq$ CM; b $\neq$ DM; c $\neq$ CF; d $\neq$ DF; * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto.

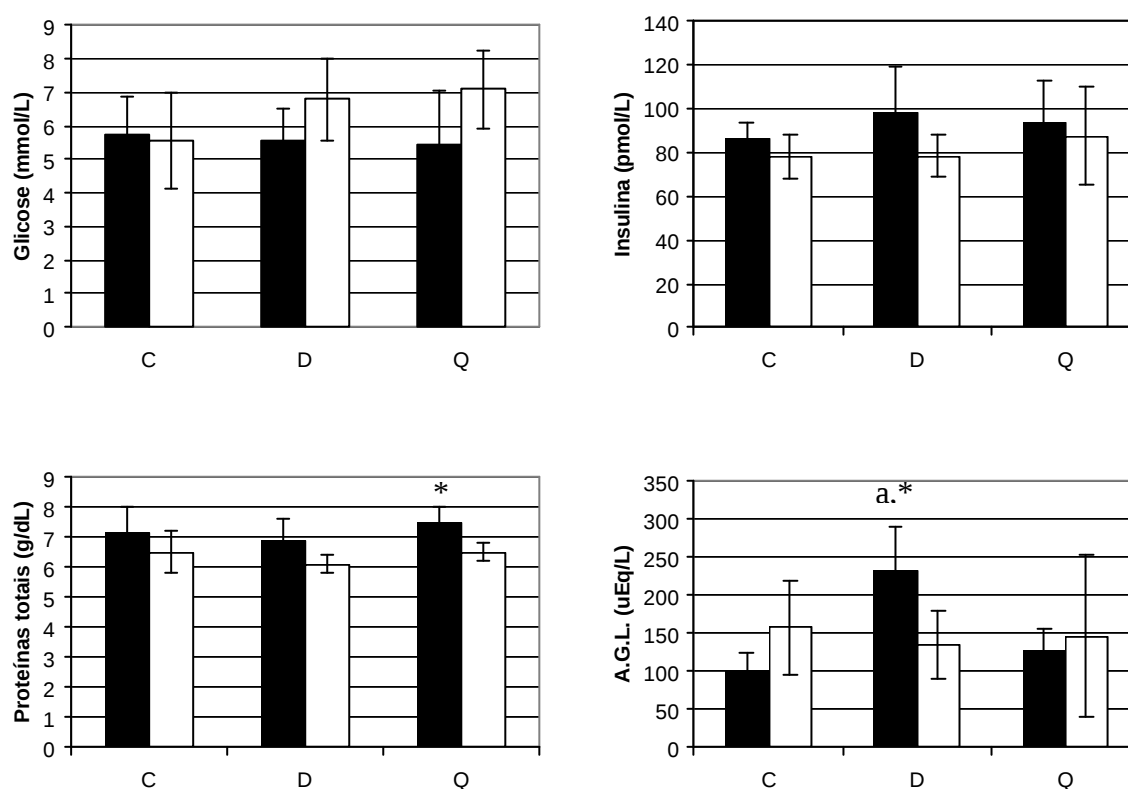


Figura 8: Teores de glicose, insulina, proteínas totais e ácidos graxos livres (A.G.L.) do soro dos animais obtidos após o sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a $\neq$ CM; b $\neq$ DM; c $\neq$ CF; d $\neq$ DF; * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto. ! = Macho; ? = Fêmea.

Tabela 9: Teores de insulina (ng/g) e razão proteína/DNA do pâncreas, teores de glicogênio (mg/100mg) e razão proteína/DNA do músculo sóleo dos animais após sacrifício (90 dias).

Grupos	Insulina	Proteína/DNA	Glicogênio	Proteína/DNA
CM (n=08)	119,94 $\pm$ 32,63	25,76 $\pm$ 4,77	0,13 $\pm$ 0,02	66,27 $\pm$ 25,80
DM (n=08)	78,32 $\pm$ 13,46 ^a	19,58 $\pm$ 2,44 ^a	0,14 $\pm$ 0,02	34,26 $\pm$ 15,28*
QM (n=08)	126,87 $\pm$ 31,82 ^b	25,94 $\pm$ 5,09 ^{b,*}	0,14 $\pm$ 0,03	68,07 $\pm$ 37,09*
CF (n=08)	146,45 $\pm$ 37,94	28,72 $\pm$ 3,33	0,16 $\pm$ 0,04	75,08 $\pm$ 25,45
DF (n=08)	139,93 $\pm$ 23,66	22,26 $\pm$ 6,11 ^c	0,13 $\pm$ 0,04	89,34 $\pm$ 31,54
QF (n=08)	103,62 $\pm$ 31,41	40,34 $\pm$ 13,48 ^{c,d}	0,16 $\pm$ 0,03	111,08 $\pm$ 50,02

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a $\neq$ CM; b $\neq$ DM; c $\neq$ CF; d $\neq$ DF; * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto.

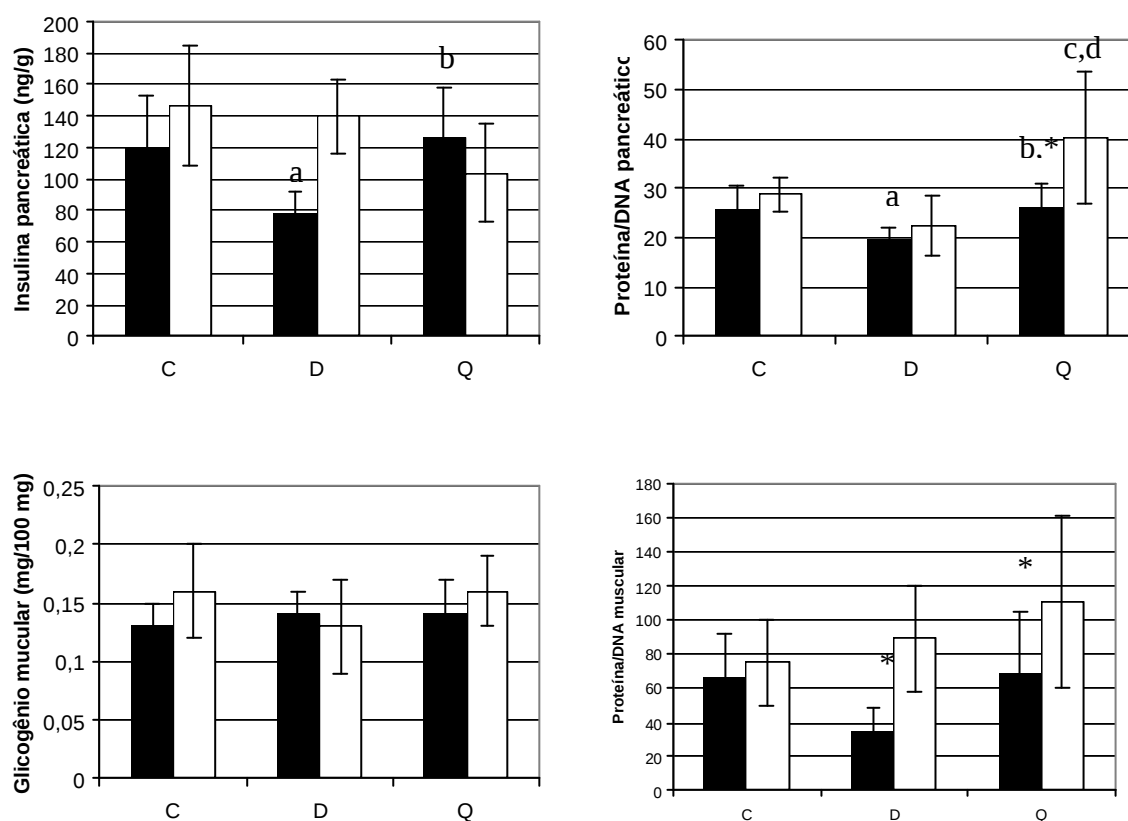


Figura 9: Teores de insulina e razão proteína/DNA do pâncreas, teores de glicogênio e razão proteína/DNA do músculo sóleo dos animais após sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a $\neq$ CM; b $\neq$ DM; c $\neq$ CF; d $\neq$ DF; * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto. ! = Macho; ? = Fêmea.

Tabela 10: Razão proteína/DNA, glicogênio (mg/100mg) e lipídeos (mg/100mg) hepáticos e razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal dos animais após o sacrifício (90 dias).

Grupos	Proteína/DNA	Glicogênio	Lipídeos	Proteína/DNA
CM (n=08)	76,10 $\pm$ 14,91	3,88 $\pm$ 0,66*	5,20 $\pm$ 0,58	86,11 $\pm$ 12,23*
DM (n=08)	52,52 $\pm$ 08,40 ^a	3,09 $\pm$ 1,15*	5,20 $\pm$ 1,18	72,47 $\pm$ 16,47
QM (n=08)	86,00 $\pm$ 21,35 ^{b,*}	3,47 $\pm$ 0,80	5,23 $\pm$ 0,21*	73,45 $\pm$ 23,65
CF (n=08)	62,18 $\pm$ 08,09	2,55 $\pm$ 0,48	5,06 $\pm$ 0,68	64,10 $\pm$ 09,90
DF (n=08)	63,37 $\pm$ 14,11	1,60 $\pm$ 0,35 ^c	4,66 $\pm$ 0,48	54,90 $\pm$ 7,63
QF (n=08)	67,37 $\pm$ 12,82	2,63 $\pm$ 1,33	3,52 $\pm$ 0,30 ^{c,d}	66,63 $\pm$ 14,75

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a $\neq$ CM; b $\neq$ DM; c $\neq$ CF; d $\neq$ DF; * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto.

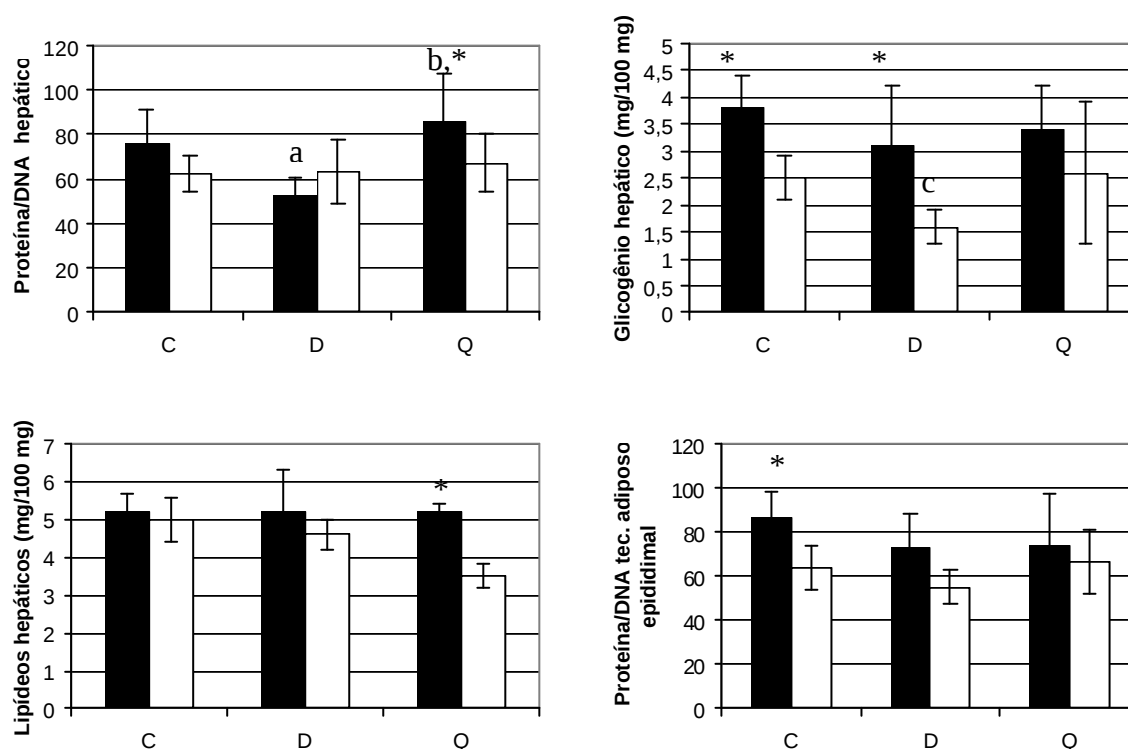


Figura 10: Razão proteína/DNA, glicogênio e lipídeos hepáticos e razão proteína/DNA do tecido adiposo epididimal dos animais após o sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. C = Controle; M = Macho; F = Fêmea; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. a $\neq$ CM; b $\neq$ DM; c $\neq$ CF; d $\neq$ DF; * $\neq$ respectivo grupo do gênero oposto. ! = Macho; ? = Fêmea.

4.3 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características gerais e metabólicas de ratos neonatos tratados com aloxana.

Em relação à ingestão alimentar, à ingestão hídrica e ao peso corporal, Kodama et al. (1993) encontraram valores semelhantes aos nossos, mostrando que a aloxana injetada aos 2 ou 4 dias não interferiu nestes parâmetros. Resultados diferentes acerca do peso corporal têm sido encontrados por pesquisadores que induziram diabetes com streptozotocina (PORTHA et al., 1974; PORTHA et al., 1979; CORTRIGHT et al., 1996 e HEMMINGS; SPAFFORD, 2000). Contudo, esses estudos foram realizados com ratos de diversas linhagens, o que poderia explicar essa grande variabilidade de dados encontrados na literatura. Além disso, nas pesquisas supracitadas, os animais tratados com streptozotocina que apresentaram menor peso foram os que receberam 100 mg/Kg de peso corporal da droga. Hemmings e Spafford (2000) verificaram que essa dose resultou numa redução dos hormônios tireoidianos, que são de fundamental importância no processo de crescimento e poderiam ter causado essa alteração.

Com respeito à glicemia, analisando o conjunto dos resultados obtidos podemos perceber que, até os 60 dias, a aloxana elevou os níveis de glicose pós-prandial e área sob a curva de glicose sangüínea durante o GTTo em relação aos grupos controle. Isso deveu-se à destruição seletiva de parte das células beta (LENZEN; PANTEN, 1988) e à menor taxa de remoção de glicose (Kitt) em resposta à insulina nos animais do grupo QM conforme indicam resultados do ITTsc realizado aos 60 dias. Tal comportamento se assemelha ao quadro de diabetes experimental não insulino dependente (NIDDM) induzido por streptozotocina

(PORTHA et al, 1974; PORTHA et al, 1979; PORTHA et al, 1989; HEMMINGS; SPAFFORD, 2000). Embora os grupos DM e QF apresentem maior glicemia em jejum aos 60 dias, tais valores não podem ser caracterizados como hiperglicemia. Entretanto, diferentemente dos resultados obtidos por outros pesquisadores (KODAMA et al., 1993; PORTHA et al., 1989; WANG et al., 1996), em nosso estudo a alteração glicêmica nos ratos machos não se agravou em função da elevação da idade em que a droga foi aplicada. Machos e fêmeas mostraram respostas diferentes à aloxana. Entre os machos, a ação da droga parece ter sido mais forte no grupo em que a aloxana foi administrada aos 2 dias, contrariando os achados da literatura, enquanto que, entre as fêmeas, isso ocorreu no grupo que recebeu a aloxana aos 4 dias. Kodama et al. (1993) não observaram alterações glicêmicas no grupo que recebeu a droga aos 2 dias. Já aos 90 dias, observamos uma regressão da alteração glicêmica pós-prandial em todos os grupos que receberam aloxana, com os níveis de glicose sendo iguais aos dos animais controle. O mesmo ocorreu com a área sob a curva de glicose sanguínea. Os pesquisadores citados anteriormente não verificaram este comportamento nos animais em que a droga foi administrada aos 4 dias de vida, que mantiveram quadro hiperglicêmico durante as 56 semanas do experimento (KODAMA et al., 1993).

Um possível mecanismo para explicar a recuperação glicêmica seria a regeneração das células β . Dados obtidos em estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram que as células β podem desencadear mecanismos eficientes de recuperação após injúrias não-letais, inclusive as provocadas por aloxana (EIZIRIK; SANDLER, 1988; EIZIRIK et al., 1993; EIZIRIK, 1996). Bonnerweir e Smith (1994) e Waguri et al. (1997) citam que o crescimento das ilhotas ocorre pela replicação das células beta pré-existentes e pela formação de novas ilhotas (neogênese) através da proliferação e subsequente diferenciação das células epiteliais do ducto pancreático. A replicação destas células, que é vista como a principal forma de expansão após o nascimento (BONNERWEIR; SMITH, 1994; WANG et al., 1994; WAGURI et al., 1997), é estimulada por elevadas concentrações de glicose (BONNERWEIR; SMITH, 1994). Desta forma, a elevação da glicemia provocada pela aloxana em nossos animais pode ter colaborado para a reversão deste quadro aos 90 dias.

Os resultados referentes aos parâmetros séricos avaliados após o sacrifício parecem indicar que, embora os níveis insulinêmicos estivessem inalterados para os animais tratados com aloxana em relação aos controles (o que explica o mesmo comportamento para os teores de glicose e proteínas totais) os danos causados pela aloxana nos machos que receberam a

droga aos 2 dias conduziram a uma alteração metabólica nesse grupo. Os valores elevados de ácidos graxos livres no grupo DM sugerem que, ao menos para esses animais, apesar dos níveis séricos de insulina e glicose estarem normais, não houve uma recuperação metabólica completa. Desta forma, a impossibilidade da utilização adequada de glicose levaria o organismo a uma adaptação, aumentando sobremaneira a mobilização de gordura. Corroborando essa hipótese, apesar de não ter havido alteração da razão proteína/DNA, o grupo DM mostrou ligeira redução no peso total do tecido adiposo epididimal (dado não apresentado).

A importância da alteração supracitada consiste no fato de que a exposição crônica do organismo a elevados níveis de ácidos graxos pode desencadear sérios prejuízos, inclusive no metabolismo de glicose pelas células. Os A.G.L. podem causar inibição da biossíntese e da secreção de insulina pelas células β (YANEY et al., 2003) e mesmo levá-las à apoptose prematura (HABER et al., 2002). Eles também inibem a enzima responsável pela degradação deste hormônio no fígado, o que geraria um quadro de hiperinsulinemia e, conseqüentemente, resistência insulínica (HAMEL et al., 2003). Os ácidos graxos ainda interferem em ações mediadas por esse hormônio, (BOUCHARD; DESPRÉS, 1989; CURI et al., 2001) como a inibição da supressão, causada pela hiperglicemia, da produção endógena de glicose (KREBS et al., 2001). Causam ainda, no tecido muscular, redução da captação de glicose, atenuação do aumento da glicose-6-fosfato (G6P), do aumento paralelo de fosfato inorgânico (KREBS et al., 2001; HABER et al., 2002) e redução da fosforilação do receptor e do substrato do receptor da insulina 1 (IR e IRS-1, respectivamente), gerando um quadro de resistência periférica (HABER et al., 2002). Estas alterações são tidas pela literatura como grandes responsáveis pelo desencadeamento do diabetes mellitus tipo II (BOUCHARD; DESPRÉS, 1989; HABER et al., 2002; HAMEL et al., 2003; YANEY et al., 2003).

Os teores de insulina e a razão proteína/DNA (índice do tamanho celular, segundo WINICK et al., 1972) pancreáticos reduzidos no grupo DM fortalecem a hipótese de que as células β dos animais desse grupo talvez não estavam totalmente recuperadas. Conforme Rossini et al. (1978) e Östenson et al. (1989), estudos realizados com streptozotocina administrada na idade neonatal ou adulta mostram que ratos machos apresentam alterações mais severas que as fêmeas. Em seu estudo, Östenson et al. (1989) relatam que essa diferença pode dever-se principalmente à ação dos hormônios androgênicos, cujo aumento se inicia na puberdade. A hipótese de que uma possível predisposição genética pudesse tornar as células

beta dos machos mais susceptíveis à droga foi descartada, uma vez que não houve, *in vitro* ou *in vivo*, 2 dias após a administração da streptozotocina neonatal, diferenças no dano causado à essas células e nem no teor de insulina do pâncreas. Contudo, na idade adulta (8 semanas de idade), o teor pancreático de insulina nos machos foi menor que nas fêmeas, favorecendo a hipótese de que os hormônios androgênicos, especialmente a testosterona, sejam os principais responsáveis por essa diferença, corroborando os achados de Rossini et al. (1978). O grupo QF, ao contrário, apresentou um quadro de aumento da razão proteína/DNA no pâncreas, indicando hipertrofia das células pancreáticas sem nenhuma alteração significativa na quantidade produzida do hormônio. Wang et al. (1996) encontraram resultados semelhantes nas células secretoras de insulina de ratos Wistar tratados com streptozotocina, e sugerem que essa alteração possa ser decorrente de uma hiperatividade funcional destas células, na tentativa de manter a homeostase glicêmica. Isso pode ser outro indício de que não houve recuperação total das células β , uma vez que essa atividade exagerada teria como objetivo compensar outras células com função prejudicada ou ainda, em número reduzido.

Nenhuma alteração foi observada nos teores de glicogênio muscular. Contudo, com relação ao glicogênio hepático, as fêmeas que receberam a droga aos 2 dias tiveram menores valores que as demais fêmeas e que os machos do mesmo grupo. Uma vez que a insulina promove a captação de glicose e seu armazenamento na forma de glicogênio, isso também pode ser uma indicação da recuperação apenas parcial do pâncreas desses animais. Resistência à insulina no fígado, como encontrado por Portha e Blondel (1988) em animais tratados com streptozotocina aos 5 dias de vida, também poderia levar à redução dos teores de glicogênio deste órgão, pelos mesmos motivos citados acima.

A razão proteína/DNA do músculo sóleo foi diferente apenas em função do gênero, com as fêmeas que receberam aloxana tendo valores superiores aos dos machos dos respectivos grupos. No fígado, este parâmetro foi menor no grupo DM que nos demais animais machos e nas fêmeas DF. Os danos causados nas células beta podem também ser os responsáveis pelo menor crescimento dos hepatócitos, já que o hormônio por elas secretado, a insulina, é um dos principais estimuladores do processo anabólico no organismo, ao promover maior captação de aminoácidos pelas células e permitindo, desta forma, maior síntese protéica. Podemos ver desta forma que, a maioria das alterações se manifestou nos grupos que tiveram tamanho reduzido das células pancreáticas.

Fortalecendo a hipótese de recuperação apenas parcial das alterações orgânicas causadas pela aloxana constatamos, em análise feita em um lote separado de animais, menor síntese protéica pelo músculo sóleo de ratas que receberam a droga aos 2 ou 4 dias de vida em comparação ao grupo controle após o sacrifício (90 dias) (resultados descritos no Apêndice). Uma vez que a síntese protéica no músculo esquelético depende da insulina (CROZIER et al., 2003) e a concentração desse hormônio foi igual entre os diferentes grupos durante a incubação, esse resultado evidencia que a ação do hormônio pode estar prejudicada no tecido em questão.

Com relação aos lipídeos hepáticos, as fêmeas do grupo QF tiveram teores reduzidos de lipídeos comparadas as dos grupos CF, DF e QM. Apesar dos teores de ácidos graxos livres desses animais estarem normais, isso pode indicar também uma adaptação metabólica do organismo.

4.4 CONCLUSÃO

Concluindo, o modelo em questão não desenvolveu “diabetes” característico, já que a elevação glicêmica e a intolerância à glicose foram transitórias. Entretanto, a recuperação dos animais foi incompleta, visto que importantes alterações metabólicas permaneceram, tais como elevação dos níveis circulantes de A.G.L.. Estudos adicionais são necessários para averiguar em detalhes as conseqüências a longo prazo dessas alterações para a manutenção da homeostase.

5. Segundo Estudo

Modulação pelo Treinamento Físico dos Efeitos Crônicos da Aloxana Administrada em Ratos Neonatos

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Animais

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

5.1.2 Cruzamento dos Animais

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

5.1.3 Administração Neonatal da Aloxana

Aos dois dias de idade os filhotes machos receberam injeção intra-peritoneal de aloxana monoidratada dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (200 mg/Kg de peso corporal), após jejum de 16 horas. Como controle, foram utilizados ratos da mesma idade injetados com veículo (tampão citrato). Em seguida, as crias foram distribuídas de forma que cada mãe amamentasse 8 filhotes.

5.1.4 Grupos Experimentais

Após o desmame (28dias) os filhotes foram separados em 3 grupos e permaneceram em tratamento até os 90 dias de idade:

- Controles (C): ratos injetados com tampão citrato, mantidos inativos;
- Aloxana (A): ratos injetados com aloxana, mantidos inativos;
- Aloxana/Treinado (AT): ratos injetados com aloxana, submetidos ao treinamento físico.

5.1.5 Treinamento Físico

Consistiu de 1h/dia, 5 dias/semana, suportando sobrecarga de 3% do peso corporal em tanques coletivos, 8 animais por tanque (100x80x80 cm), com água mantida a 32 ± 1 °C.

5.1.6 Avaliações

5.1.6.1 Avaliações Efetuadas Antes do Sacrifício

5.1.6.1.1 Avaliações Gerais

Todos os animais tiveram peso corporal e ingestão alimentar e hídrica registrados e foram submetidos a avaliações antes e após o sacrifício. Os resultados foram expressos como áreas sob as curvas de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica ($?P = g \times 10$ semanas; $?A = g \text{ de ração}/100 g \text{ de peso corporal} \times 10$ semanas; $?H = mL \text{ de água}/100 g \text{ de peso corporal} \times 10$ semanas, respectivamente), calculadas pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990), utilizando o *Software* ORIGIN 6.0 (1999).

5.1.6.1.2 Glicemia

A confirmação dos efeitos da aloxana foi efetuada nos animais ao desmame (28 dias) e repetida aos 60 e 90 dias de idade, pela determinação da glicemia em jejum de 15 horas e da glicemia determinada 30 minutos após a administração de solução de glicose (2,0 g/kg p.c.) por sonda oro-gástrica pelo método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990).

5.1.6.1.3 Teste de Tolerância à Glicose Oral (GTT_o)

Foi realizado após 15 horas de jejum, com os animais aos 28, 60 e 90 dias de idade. Os ratos foram moderadamente anestesiados com éter etílico e a primeira coleta de sangue foi feita da cauda do animal ao tempo zero (0). Em seguida, uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago pôr via oral e uma solução de glicose de 20% (2,0 g/Kg de peso corporal) administrada. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 µL. Após a administração da glicose a determinação da glicemia foi realizada pelo método da glicose-oxidase (NOGUEIRA et al., 1990) através da coleta de 25 µL de sangue e dissolvidos em 200 µL de TCA 4%. A insulinemia foi determinada por radioimunoensaio (Kit DPC – Coat-A-Count) com coleta de 75 µL de sangue e dissolvidos em 200 µL de solução fisiológica (NaCl 0,9%). As áreas sob as curvas de glicose sangüínea ($\int G = \text{mM} \times 90\text{min}^{-1}$) e de insulina sérica ($\int I = \text{nM} \times 90\text{min}^{-1}$), durante o GTT_o foram calculadas pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990) utilizando o *Software* ORIGIN 6.0 (1999).

5.1.6.1.4 Sensibilidade à Insulina

Para estimar a sensibilidade à insulina utilizamos o índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*), definido pela fórmula $\text{HOMA} = [\text{insulinemia de jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicemia de jejum } (\text{mmol/L})] / 22,5$. Por esse método, um índice HOMA elevado denota baixa sensibilidade (resistência) á insulina (MATTHEWS et al., 1985; BONORA et al., 2000).

5.1.6.2 Avaliações Efetuadas após o Sacrifício

5.1.6.2.1 Sacrifício dos Animais

Aos 90 dias de idade, decorridas 48 horas dos testes de tolerância, todos os animais foram sacrificados por decapitação, sem jejum prévio, os animais treinados, 48 horas após a última sessão de treino, para a obtenção de material biológico.

5.1.6.2.2 Avaliações Efetuadas no Sangue

Amostras de sangue foram coletadas para verificação dos teores de glicose, ácidos graxos livres e proteínas totais por métodos colorimétricos (NOGUEIRA et al., 1990) e insulina por radioimunoensaio (Kit DPC Coat-A-Count).

5.1.6.2.3 Avaliações Efetuadas em Tecidos

Fígado, músculo sóleo, tecido adiposo epididimal esquerdo e pâncreas foram totalmente extirpados e pesados em balança analítica. Nesses tecidos foram avaliados teores de proteína total (LOWRY et al., 1951) e DNA (GILES; MAYERS, 1965), visando inferir sobre o número (DNA) e tamanho (razão proteína/DNA) das células (WINICK et al., 1972). No fígado foram medidas, também, as concentrações de lipídeos (NOGUEIRA et al., 1990) e de glicogênio (DUBOIS et al., 1956). No músculo foi avaliado o conteúdo de glicogênio bem como a captação de glicose “in vitro”. No pâncreas foram avaliados teor de insulina e secreção de insulina “in vitro” por ilhotas isoladas.

5.1.6.2.3.1 Captação de Glicose pelo Músculo Sóleo

Fatias musculares (25–35 mg) foram colocadas em erlemeyers de 25 mL siliconizados, contendo 3,5 mL de tampão Krebs-Ringer bicarbonatado. Os frascos foram selados com tampas de borracha e submetidos a 30 minutos de pré-incubação sob agitação em banho tipo Dubinoff a 60 rpm e contínuo gaseamento com O₂/CO₂ (95%/5%). Após esse período, as fatias foram transferidas para outro frasco com 3,5 mL de tampão Krebs-Ringer

bicarbonatado, suplementado com glicose (5,5 mM), contendo [^3H] 2-deoxiglicose (0,5 $\mu\text{Ci/mL}$), por 60 minutos, com gaseamento durante os primeiros 15 minutos. Frascos controle contendo meio de incubação sem músculo foram incubados em cada experimento. Após o período de incubação, 1 mL de amostra do meio foi desproteínizado em 1 mL de solução de HClO_4 0,6N e a fatia de músculo imediatamente digerida em 0,5 mL de KOH 1N para dosagem do glicogênio. A temperatura na pré-incubação e na incubação foi de 37°C. Para determinação da captação de glicose radiomarcada (^3H – 2-deoxiglicose) pelo músculo incubado, o mesmo foi lavado e digerido em 0,5 mL de KOH 1N durante 20 minutos. Desta fração foi retirada uma amostra de 50 μL que foi acrescentada a 10 mL de líquido de cintilação, para contagem do trício (^3H), em contador Beta (Tri Carb 2100 TR – Packard).

5.1.6.2.3.2 *Secreção de Insulina por Ilhotas Isoladas*

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

5.1.6.2.4 *Extração da Insulina Pancreática*

Inicialmente, 0,2g de tecido foram coletados em frascos contendo 2 mL de HCl 1N. O material foi incubado em estufa a 40 °C durante 24 horas. O material assim extraído do pâncreas pelo processo descrito anteriormente foi diluído 1:5000 em soro-albumina bovina a

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

5.1.7 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA One-Way) Quando necessário foi utilizado o teste Post Hoc de Newman-Keuls, com um nível de significância pré-estabelecido de 5%.

5.2 RESULTADOS

Os valores referentes às áreas sob as curvas de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica encontram-se na Tabela 1. A análise de variância indicou que o grupo que recebeu a aloxana e executou o treinamento físico (AT) apresentou menor área de peso corporal que os demais grupos (C e A). Não houve diferença na ingestão alimentar dos animais entre os diferentes grupos ao longo do período experimental. Com relação à ingestão hídrica, os animais do grupo AT tiveram valores mais elevados ($p < 0,05$) que os animais do grupo A.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos no teste de tolerância oral à glicose (GTT_o) realizado ao desmame (28 dias). A glicemia dos ratos que receberam aloxana neonatal (A) foi maior ($p < 0,05$) que a do grupo controle (C) em todos os momentos, ou seja, em jejum e 30, 60 e 90 minutos após sobrecarga oral de glicose (2,0 g/Kg p.c.). Conseqüentemente o grupo A apresentou também maior área sob a curva de glicose sangüínea ($p < 0,05$).

Aos 60 dias, com exceção da glicemia 90 minutos após sobrecarga de glicose, que não foi diferente entre os grupos, a resposta glicêmica do grupo A apresentou o mesmo comportamento que aos 28 dias durante o GTT_o: valores sangüíneos de glicose e área sob a curva de glicose significativamente maiores ($p < 0,05$) que o grupo C. Também esses valores foram superiores aos do grupo AT, cujos resultados não diferiram dos ratos controle (C). Apenas aos 60 minutos a glicemia do grupo AT foi maior ($p < 0,05$) que a do grupo C (Tabela 3).

No GTTo realizado aos 90 dias (Tabela 4), os ratos do grupo A mostraram uma regressão das alterações provocadas pela aloxana, não havendo diferença glicêmica entre este grupo e os animais controles (C) em nenhum ponto, incluindo a área sob a curva de glicose sangüínea. Já o grupo AT, em jejum, apresentou menor glicemia ($p<0,05$) que os demais grupos. Passados trinta minutos da sobrecarga oral de glicose (2,0 g/Kg p.c.), a glicemia desses animais foi semelhante a dos grupos C e A. Contudo, 60 e 90 minutos após a sobrecarga os níveis sangüíneos de glicose dos ratos injetados com aloxana e submetidos ao exercício físico (AT) foram significativamente maiores ($p<0,05$) que os encontrados nos outros grupos (C e A). O mesmo ocorreu com a área sob a curva de glicose (Tabela 4).

Com relação aos níveis insulinêmicos analisados durante o teste de tolerância à glicose realizado ao desmame (28 dias), o grupo A apresentou insulinemia de jejum significativamente menor ($p<0,05$) que o grupo C. Aos 30 e 60 minutos, nenhuma diferença foi verificada, ao passo que, aos 90 minutos o valor observado para o grupo A foi maior ($p<0,05$) que para o grupo controle. Não houve diferença entre os grupos nos valores da área sob a curva de insulina (Tabela 5).

Já aos 60 dias, como mostra a Tabela 6, a análise estatística aponta diferença no GTTo apenas para a insulinemia de jejum, com o grupo AT possuindo menores valores séricos do hormônio ($p<0,05$) que o grupo C, e para a insulinemia 30 minutos após sobrecarga oral de glicose, quando os níveis de insulina do grupo A foram menores ($p<0,05$) que os dos animais controles. Nenhuma diferença foi encontrada aos 60 e 90 minutos e também para a área sob a curva de insulina (Tabela 6).

Os resultados relativos à insulinemia aos 90 dias no GTTo encontram-se na Tabela 7. A ANOVA não revelou qualquer diferença entre os grupos em nenhum ponto e também na área sob a curva de insulina sérica.

A Tabela 8 contém os resultados referentes ao índice HOMA (sensibilidade à insulina) ao desmame (28 dias), 60 e 90 dias. A única diferença foi observada aos 60 dias, com o grupo AT apresentando menores valores ($p<0,05$) que o grupo A (ou seja, maior sensibilidade ao hormônio).

Após o sacrifício (90 dias), a secreção estática de insulina das ilhotas pancreáticas dos animais foi semelhante entre os grupos nas concentrações 2,8 e 5,6 mM de glicose. Frente à concentração de 16,7 mM de glicose, o grupo AT mostrou uma resposta mais acentuada ($p<0,05$) que os demais (C e A), indicada pela maior secreção de insulina (Tabela 9).

Os teores de glicose, insulina, proteínas totais e ácidos graxos livres (A.G.L.) do soro dos animais obtidos depois do sacrifício estão dispostos na Tabela 12. Diferença estatística foi observada apenas para os ácidos graxos livres. Os ratos dos grupos tratados com aloxana (A e AT) apresentaram maiores níveis deste substrato ($p<0,05$) que os ratos controles. Os teores de A.G.L. do grupo A foram maiores também ($p<0,05$) que os do grupo AT (Tabela 12).

São mostrados na Tabela 13 os teores de insulina, proteína, DNA e razão proteína/DNA do pâncreas dos animais após o sacrifício. Os ratos dos grupos que receberam aloxana aos 2 dias de vida (A e AT) tiveram redução significativa ($p<0,05$) da insulina pancreática comparados aos ratos controles. Não foram identificadas alterações acerca dos teores protéicos deste órgão entre os grupos. Já o conteúdo de DNA do pâncreas estava aumentado ($p<0,05$) tanto no grupo A quanto no grupo AT. Assim, a razão proteína/DNA dos animais submetidos à ação da droga (A e AT) foi menor ($p<0,05$) que no grupo controle (Tabela 13).

Na Tabela 12 encontram-se os resultados referentes às análises feitas no fígado dos animais após o sacrifício. Os níveis de glicogênio e lipídeos deste órgão apresentaram-se reduzidos ($p<0,05$) nos animais do grupo AT em relação aos demais (C e A). A proteína hepática não sofreu alteração em função do tratamento imposto aos animais. Contudo, os teores de DNA do fígado foram maiores ($p<0,05$) nos ratos do grupo AT que nos grupos C e A. A razão proteína/DNA deste tecido foi reduzida ($p<0,05$) nos grupos que receberam aloxana (A e AT) em comparação com o grupo C, e ainda no grupo AT em relação ao A, de acordo com a Tabela 12.

A Tabela 13 contém os resultados relativos aos teores de glicogênio, proteína, DNA, razão proteína/DNA e captação de glicose do músculo sóleo dos animais depois do sacrifício. O conteúdo muscular de glicogênio foi maior ($p<0,05$) no grupo AT que nos outros grupos do experimento (C e A). No que diz respeito aos níveis de proteína, estes reduziram-se ($p<0,05$) nos ratos do grupo A. Os teores de DNA muscular foram maiores ($p<0,05$) nos animais A e AT que nos animais controles (C). Com relação à razão proteína/DNA, ambos os grupos em que a aloxana foi administrada (A e AT) apresentaram valores inferiores ($p<0,05$) aos do grupo controle. A captação de glicose pelo músculo sóleo isolado não foi diferente entre os grupos (Tabela 13).

Os parâmetros avaliados no tecido adiposo epididimal são apresentados na Tabela 14. O peso total deste tecido foi menor ($p<0,05$) nos ratos dos grupos A e AT em relação aos

ratos controles (C), e no grupo AT comparado ao grupo A. Os teores de proteína apresentaram alteração apenas para os animais do grupo AT, cujos valores estavam reduzidos ($p < 0,05$). O conteúdo de DNA do tecido adiposo, seguindo o padrão de comportamento encontrado no presente estudo para este fator, foi maior ($p < 0,05$) nos animais dos grupos tratados com aloxana (A e AT) que nos controles (C). A análise estatística apontou redução da razão proteína/DNA no grupo AT quando confrontado com os demais grupos.

Tabela 1: Área sob as curvas de peso corporal (g x 10 semanas), ingestão alimentar (g de ração/100 g de peso corporal x 10 semanas) e ingestão hídrica (mL de água/100 g de peso corporal x 10 semanas) dos animais durante o período experimental. ?P = área sob a curva de peso corporal; ?A = área sob a curva de ingestão alimentar; ?H = área sob a curva de ingestão hídrica).

Grupos	?P	?A	?H
C (n=04)	2787,05 $\pm$ 166,60	74,44 $\pm$ 2,85	117,49 $\pm$ 8,00
A (n=04)	2894,06 $\pm$ 143,52	75,70 $\pm$ 4,31	106,43 $\pm$ 6,88
AT (n=04)	2497,20 $\pm$ 211,40 ^{a,b}	77,07 $\pm$ 2,21	125,80 $\pm$ 12,60 ^b

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

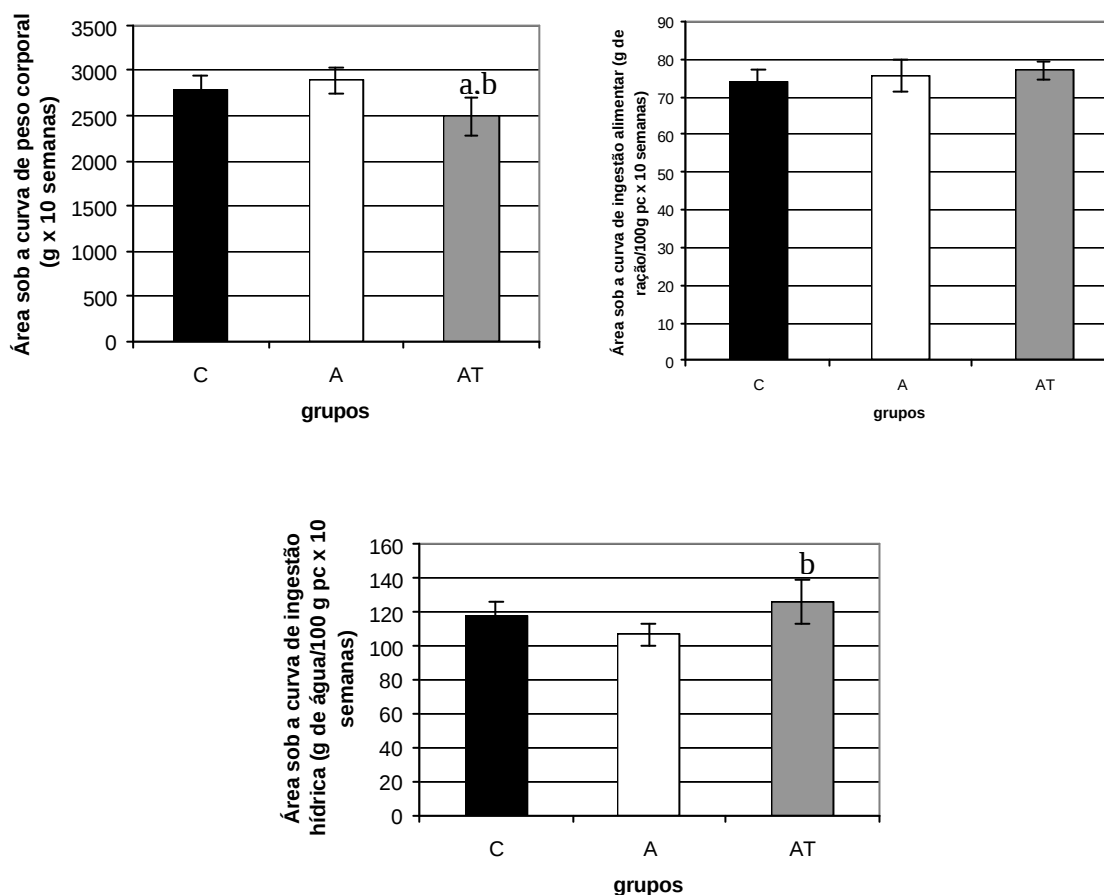


Figura 1: Área sob as curvas de peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica dos animais durante o período experimental. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 2: Glicemia (mmol/L) e área sob a curva de glicose (?G, mmol/L x 90min) dos animais durante GTTo ao desmame (28 dias).

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	? G
C (n=11)	2,87 ± 0,56	5,61 ± 0,63	5,29 ± 0,57	4,70 ± 0,53	440,90 ± 36,40
A (n=27)	3,71 ± 1,28 ^a	7,65 ± 1,18 ^a	7,21 ± 0,78 ^a	6,14 ± 0,85 ^a	595,67 ± 50,32 ^a

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias.

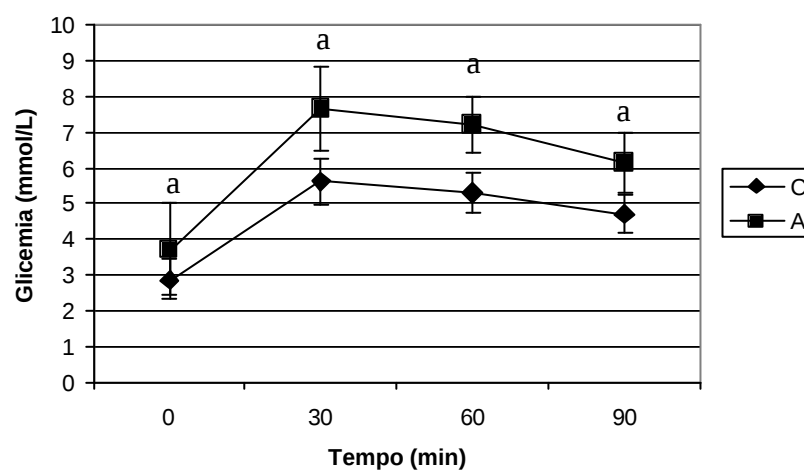


Figura 2: Glicemia dos animais durante GTTo realizado ao desmame (28 dias). Resultados expressos como média ± desvio padrão. a ? C. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias.

Tabela 3: Glicemia (mmol/L) e área sob a curva de glicose (?G, mmol/L x 90min) dos animais durante GTTo aos 60 dias.

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	? G
C (n=08)	3,13 ± 0,61	4,70 ± 0,67	4,59 ± 0,55	4,48 ± 0,51	388,16 ± 42,73
A (n=19)	4,37 ± 0,92 ^a	5,63 ± 0,81 ^a	5,34 ± 0,66 ^a	5,02 ± 0,60	470,56 ± 60,32 ^a
AT (n=13)	2,97 ± 0,27 ^b	4,92 ± 0,46 ^b	5,16 ± 0,65 ^a	4,85 ± 0,54	420,24 ± 38,17 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

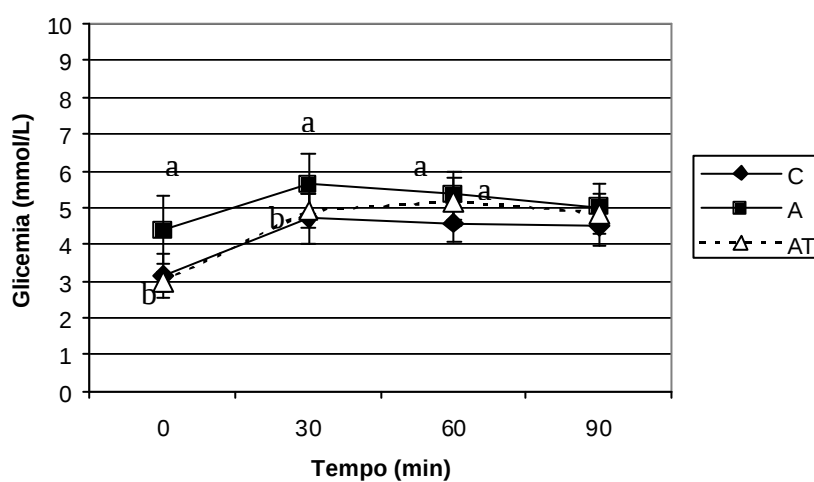


Figura 3: Glicemia dos animais durante GTTo realizado aos 60 dias. Resultados expressos como média ± desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 4: Glicemia (mmol/L) e área sob a curva de glicose (?G, mmol/L x 90min) dos animais durante GTTo aos 90 dias.

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	? G
C (n=08)	3,45 ± 0,27	4,75 ± 0,49	4,39 ± 0,51	4,17 ± 0,41	401,80 ± 47,92
A (n=08)	3,48 ± 0,32	4,36 ± 0,43	4,77 ± 0,45	4,25 ± 0,31	389,88 ± 29,53
AT (n=09)	2,92 ± 0,27 ^{a,b}	4,80 ± 0,31	6,10 ± 0,44 ^{a,b}	4,59 ± 0,24 ^{a,b}	440,25 ± 14,73 ^{a,b}

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

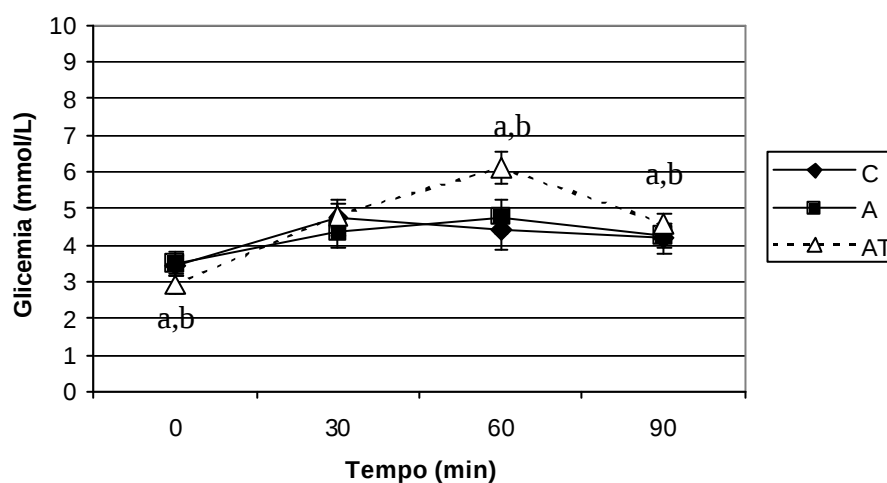


Figura 4: Glicemia dos animais durante GTTo realizado aos 90 dias. Resultados expressos como média ± desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 5: Insulinemia (pmol/L) e área sob a curva de insulina (?I, pmol/L x 90 min) dos animais durante GTTo ao desmame (28 dias).

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	? I
C (n=07)	99,18 $\pm$ 11,14	105,00 $\pm$ 27,76	100,60 $\pm$ 40,47	86,62 $\pm$ 33,08	8959,49 $\pm$ 949,27
A (n=11)	42,81 $\pm$ 22,01 ^a	130,00 $\pm$ 110,05	148,10 $\pm$ 95,42	181,68 $\pm$ 111,68 ^a	11688,73 $\pm$ 4879,83

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

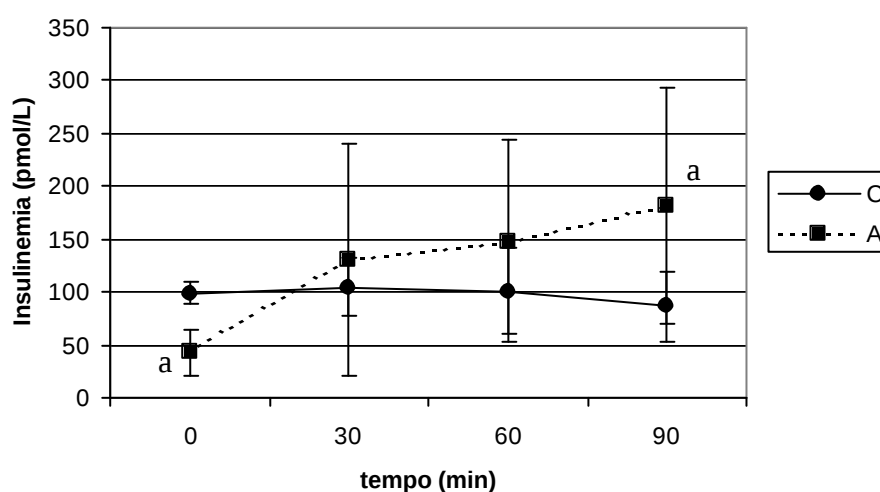


Figura 5: Insulinemia dos animais durante GTTo ao desmame (28 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 6: Insulinemia (pmol/L) e área sob a curva de insulina (?I, pmol/L x 90 min) dos animais durante GTTo aos 60 dias.

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	?I
C (n=07)	111,61 $\pm$ 27,54	153,28 $\pm$ 32,44	98,12 $\pm$ 17,60	122,90 $\pm$ 22,43	11062,51 $\pm$ 1695,48
A (n=15)	102,24 $\pm$ 16,33	113,95 $\pm$ 20,59 ^a	138,45 $\pm$ 73,05	104,51 $\pm$ 21,65	10676,27 $\pm$ 2279,81
AT (n=13)	91,30 $\pm$ 13,91 ^a	130,78 $\pm$ 44,87	131,98 $\pm$ 67,02	101,38 $\pm$ 20,16	11225,81 $\pm$ 2708,65

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

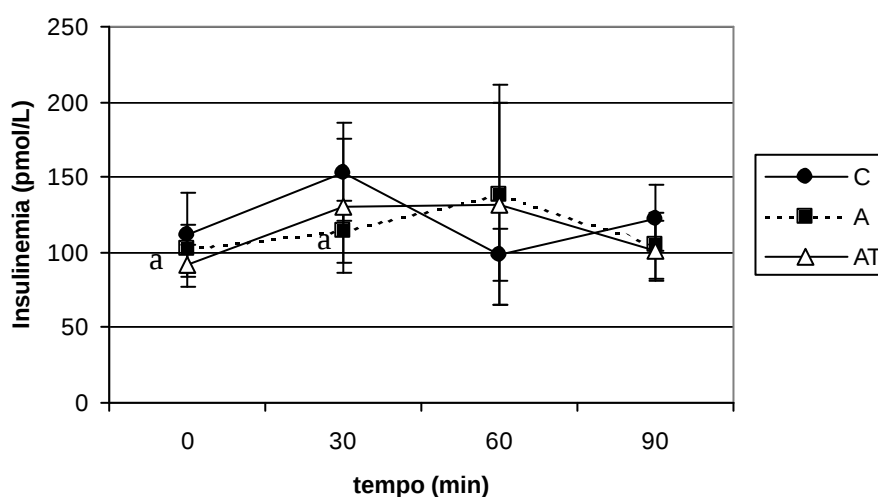


Figura 6: Insulinemia dos animais durante GTTo aos 60 dias. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 7: Insulinemia (pmol/L) e área sob a curva de insulina (?I, pmol/L x 90 min) dos animais durante GTTo aos 90 dias.

Grupos	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	?I
C (n=07)	85,41 $\pm$ 16,18	121,12 $\pm$ 53,74	145,69 $\pm$ 47,99	96,13 $\pm$ 12,35	10731,65 $\pm$ 1880,08
A (n=07)	104,51 $\pm$ 18,46	101,60 $\pm$ 35,28	121,41 $\pm$ 33,72	104,44 $\pm$ 40,04	12093,43 $\pm$ 3455,57
AT (n=03)	103,16 $\pm$ 20,59	106,92 $\pm$ 35,50	106,21 $\pm$ 3,40	83,56 $\pm$ 16,25	11140,61 $\pm$ 3439,95

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

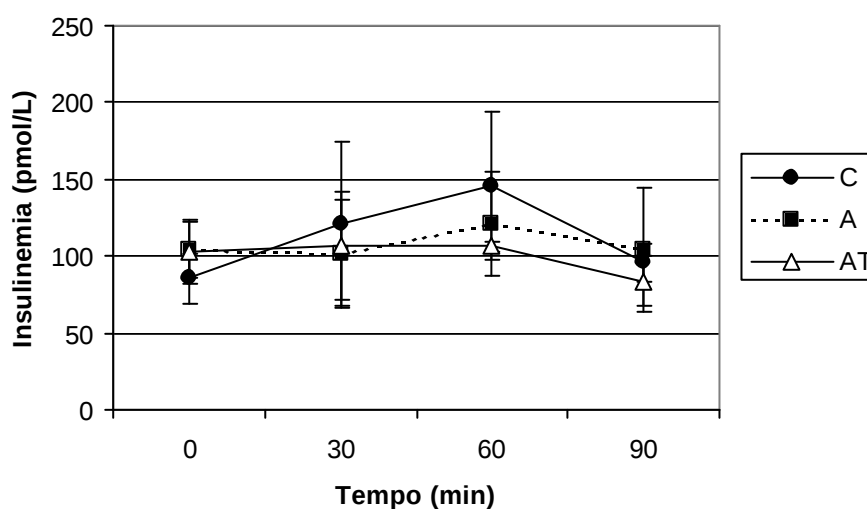


Figura 7: Insulinemia dos animais durante GTTo aos 90 dias. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 8: Índice HOMA* (*homeostasis model assessment*) dos animais ao desmame (28 dias), 60 e 90 dias.

Grupos	28	60	90
C	1,61 $\pm$ 0,57	2,22 $\pm$ 0,56	1,97 $\pm$ 0,55
A	0,96 $\pm$ 0,43	2,79 $\pm$ 0,77	2,23 $\pm$ 0,40
AT	—	1,72 $\pm$ 0,32 ^b	1,66 $\pm$ 0,11

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

* Índice utilizado para estimar a sensibilidade à insulina e definido pela fórmula $HOMA = [insulinemia \text{ de jejum} \times glicemia \text{ de jejum}] / 22.5$. HOMA elevado denota baixa sensibilidade (resistência) à insulina.

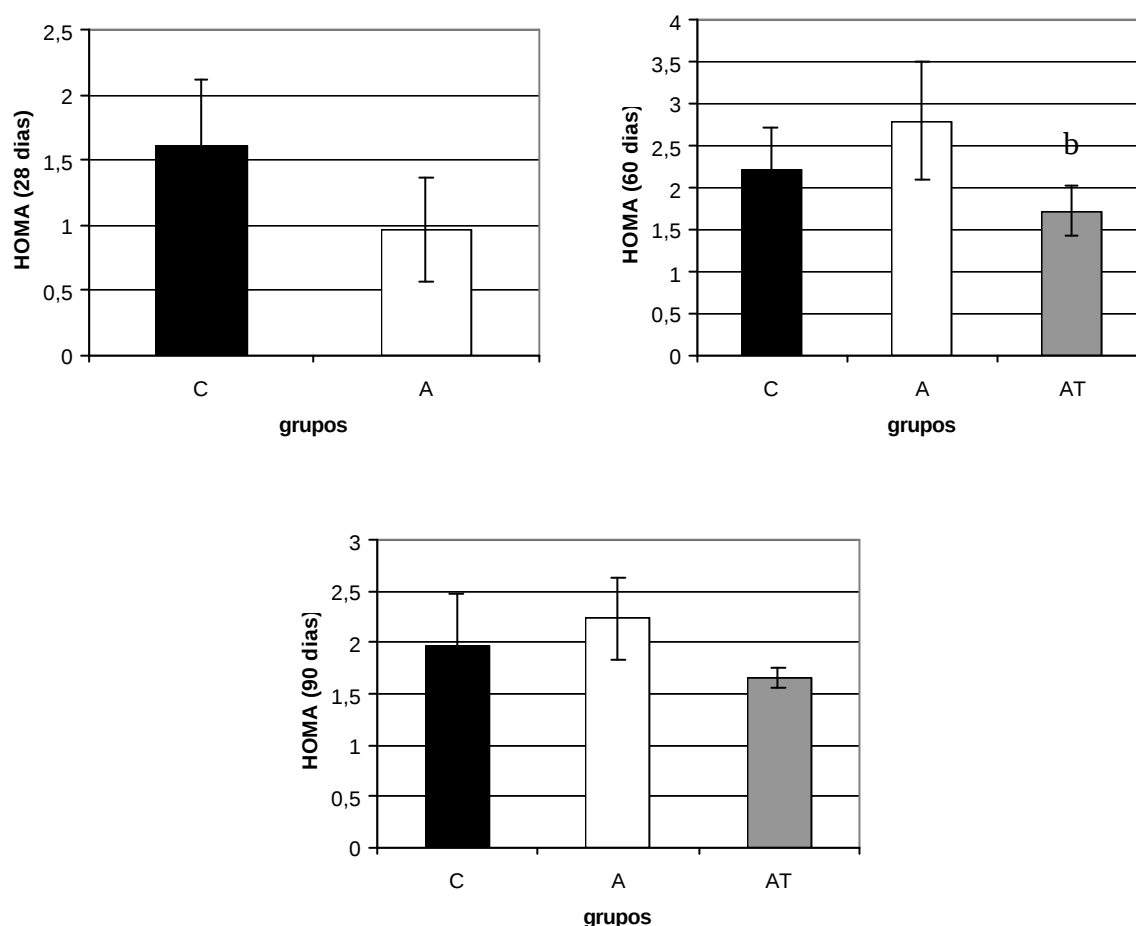


Figura 8: Índice HOMA (*homeostasis model assessment*) da sensibilidade à insulina dos animais ao desmame (28 dias), 60 e 90 dias. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 9: Secreção estática de insulina (ng/ilhota) pelas ilhotas pancreáticas dos animais após o sacrifício (90 dias) frente a diferentes concentrações de glicose (2,8; 5,6 e 16,7 mM).

Grupos	2,8	5,6	16,7
C (n=08)	1,36 $\pm$ 0,06	10,96 $\pm$ 3,14	32,85 $\pm$ 4,78
A (n=08)	1,27 $\pm$ 0,09	10,08 $\pm$ 0,88	31,67 $\pm$ 5,89
AT (n=08)	1,30 $\pm$ 0,09	12,05 $\pm$ 0,83	38,57 $\pm$ 1,54 ^{a,b}

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

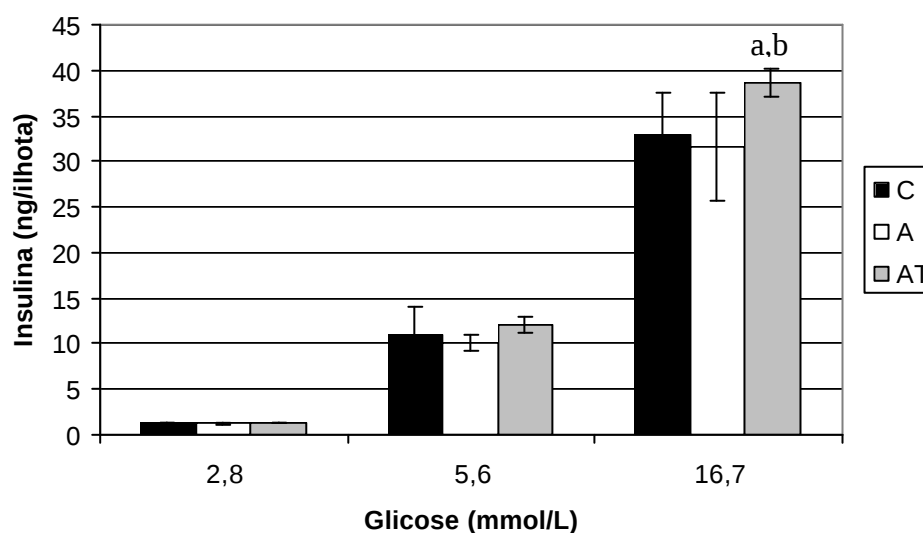


Figura 9: Secreção estática de insulina pelas ilhotas pancreáticas dos animais após o sacrifício (90 dias) frente a diferentes concentrações de glicose. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 10: Teores de glicose (mmol/L), insulina (pmol/L), proteínas totais (g/dL) e ácidos graxos livres (μEq/L) no soro dos animais obtidos após o sacrifício (90 dias).

Grupos	Glicose	Insulina	Proteínas Totais	AGL
C (n=08)	5,72 ± 1,13	86,26 ± 6,95	7,17 ± 0,97	101,40 ± 22,40
A (n=08)	5,56 ± 0,94	97,76 ± 21,37	6,97 ± 0,76	231,12 ± 58,59 ^a
AT (n=08)	5,51 ± 0,88	90,66 ± 19,45	6,88 ± 0,69	169,80 ± 20,16 ^{a,b}

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

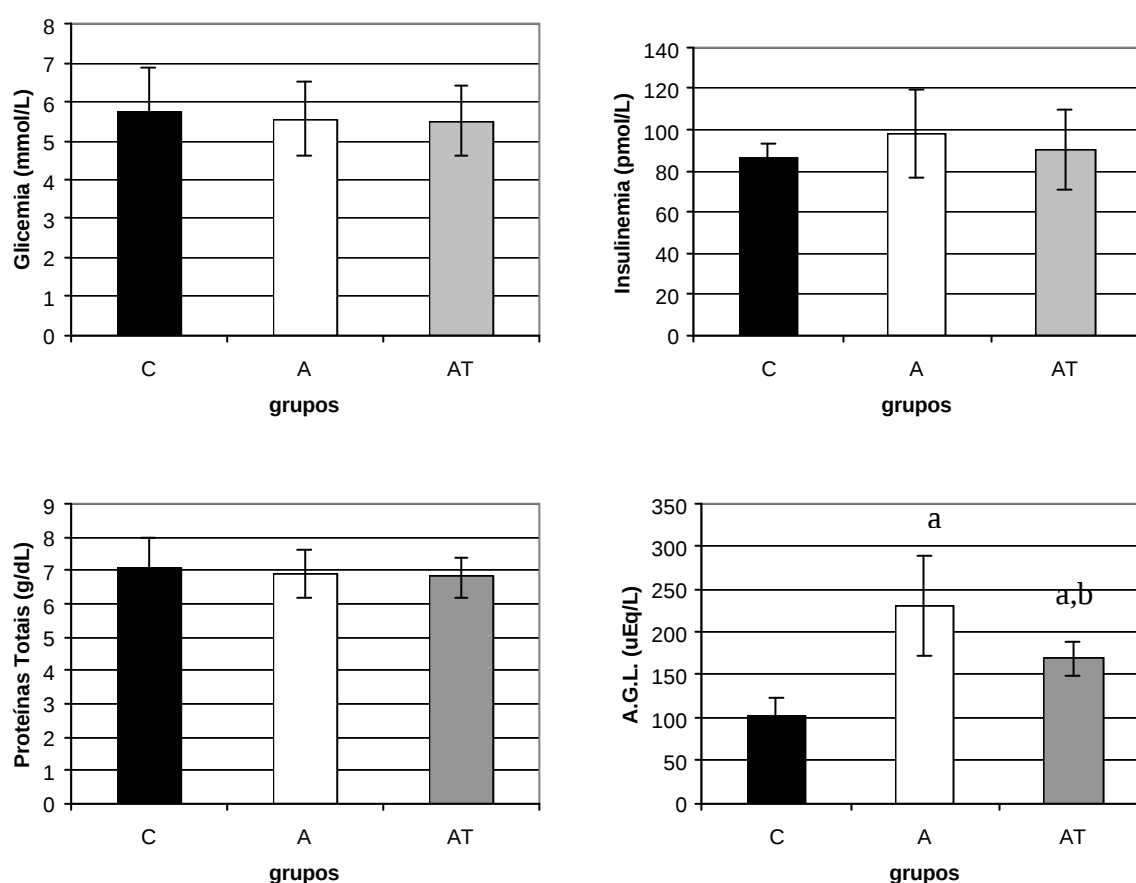


Figura 10: Teores de glicose, insulina, proteínas totais e ácidos graxos livres (A.G.L.) no soro dos animais obtidos após o sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média ± desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 11: Teores de insulina (ng/g), proteína (mg/100 mg), DNA (mg/100 mg) e razão proteína/DNA no pâncreas dos animais após sacrifício (90 dias).

Grupos	Insulina	Proteína	DNA	Proteína/DNA
C (n=08)	119,94 $\pm$ 32,63	4,49 $\pm$ 1,01	0,17 $\pm$ 0,06	25,76 $\pm$ 4,77
A (n=08)	78,32 $\pm$ 13,46 ^a	4,15 $\pm$ 0,71	0,21 $\pm$ 0,02 ^a	19,58 $\pm$ 2,44 ^a
AT (n=08)	60,78 $\pm$ 25,29 ^a	4,27 $\pm$ 1,20	0,21 $\pm$ 0,05 ^a	20,18 $\pm$ 4,27 ^a

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

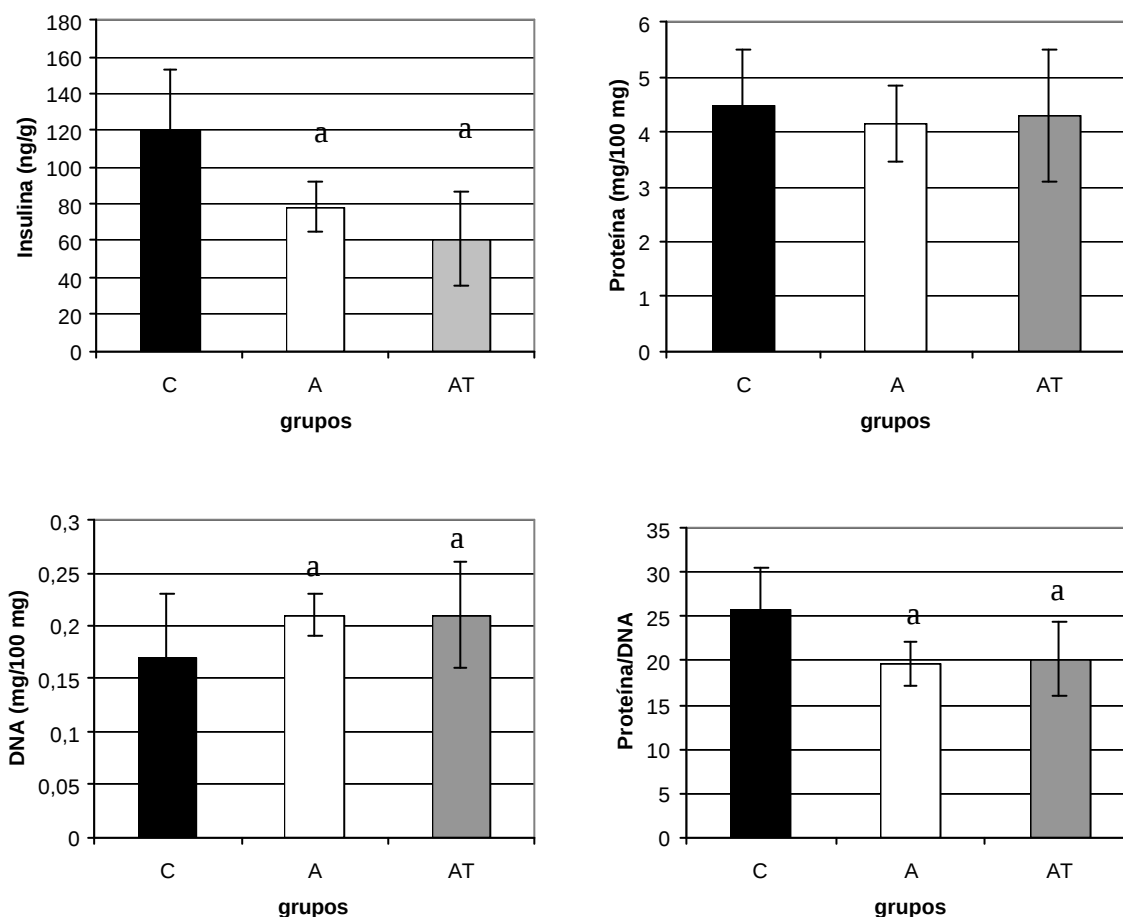


Figura 11: Teores de insulina, proteína, DNA e razão proteína/DNA no pâncreas dos animais após sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 12: Teores de glicogênio (mg/100mg), lipídeos (mg/100mg), proteína (mg/100 mg), DNA (mg/100 mg) e razão proteína/DNA (x 10) hepáticos dos animais após o sacrifício (90 dias).

Grupos	Glicogênio	Lipídeos	Proteína	DNA	Proteína/DNA
C (n=08)	3,88 $\pm$ 0,66	5,20 $\pm$ 0,58	3,39 $\pm$ 0,77	0,45 $\pm$ 0,07	76,10 $\pm$ 14,91
A (n=08)	3,09 $\pm$ 1,15	5,20 $\pm$ 1,18	2,83 $\pm$ 0,43	0,55 $\pm$ 0,11	52,52 $\pm$ 08,40 ^a
AT (n=08)	2,41 $\pm$ 1,07 ^a	4,21 $\pm$ 0,37 ^b	3,08 $\pm$ 0,42	0,77 $\pm$ 0,16 ^{a,b}	40,58 $\pm$ 5,47 ^{a,b}

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

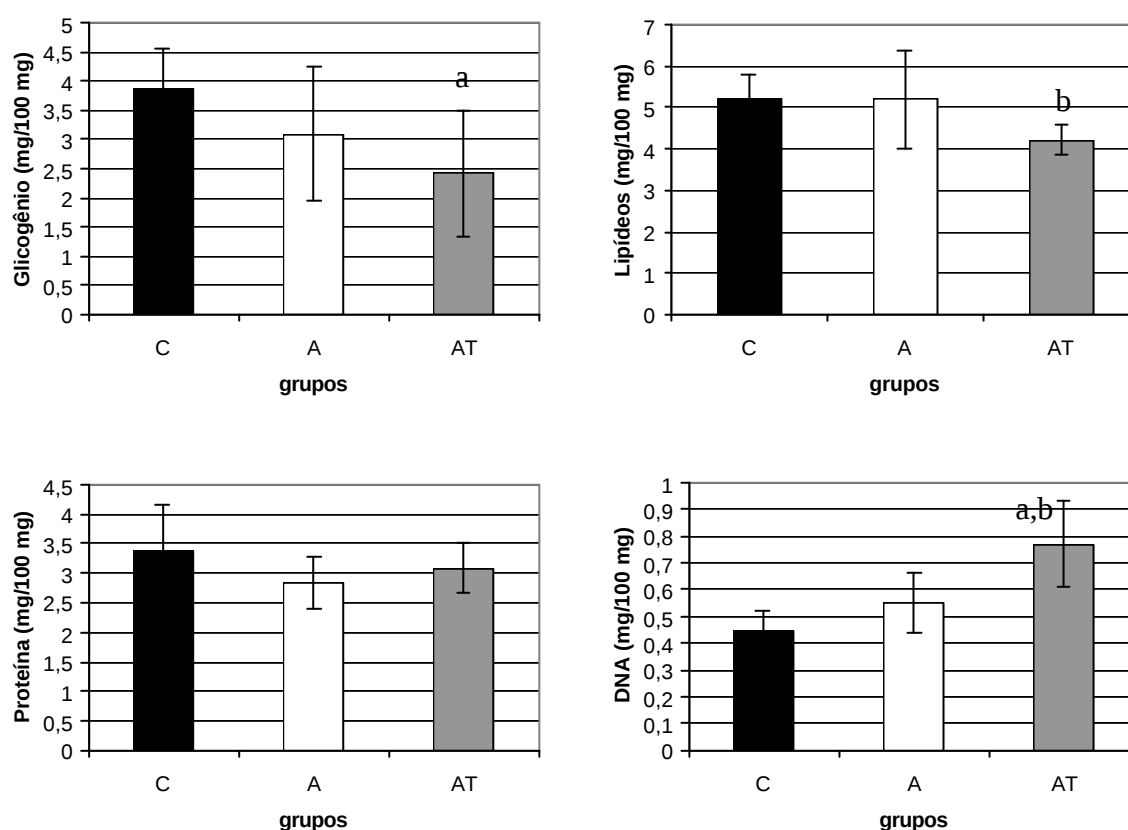


Figura 12: Teores de glicogênio, lipídeos, proteína e DNA hepáticos dos animais após o sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 13: Teores de glicogênio (mg/100 mg), proteína (mg/100 mg), DNA (mg/100 mg x 10), razão proteína/DNA e captação de glicose ($\mu\text{M/g} \times \text{h}$) no músculo sóleo isolado dos animais em 60 minutos de incubação após o sacrifício (90 dias).

Grupos	Glicogênio (n=08)	Proteína (n=08)	DNA (n=08)	Proteína/DNA (n=08)	Captação de Glicose (n=10)
C	$0,13 \pm 0,02$	$2,94 \pm 0,53$	$0,48 \pm 0,13$	$66,27 \pm 25,80$	$4,35 \pm 0,65$
A	$0,14 \pm 0,02$	$2,15 \pm 0,52^a$	$0,71 \pm 0,26^a$	$34,26 \pm 15,28^a$	$3,64 \pm 0,68$
AT	$0,23 \pm 0,05^{a,b}$	$2,55 \pm 0,47$	$0,78 \pm 0,08^a$	$32,68 \pm 6,29^a$	$3,98 \pm 0,76$

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

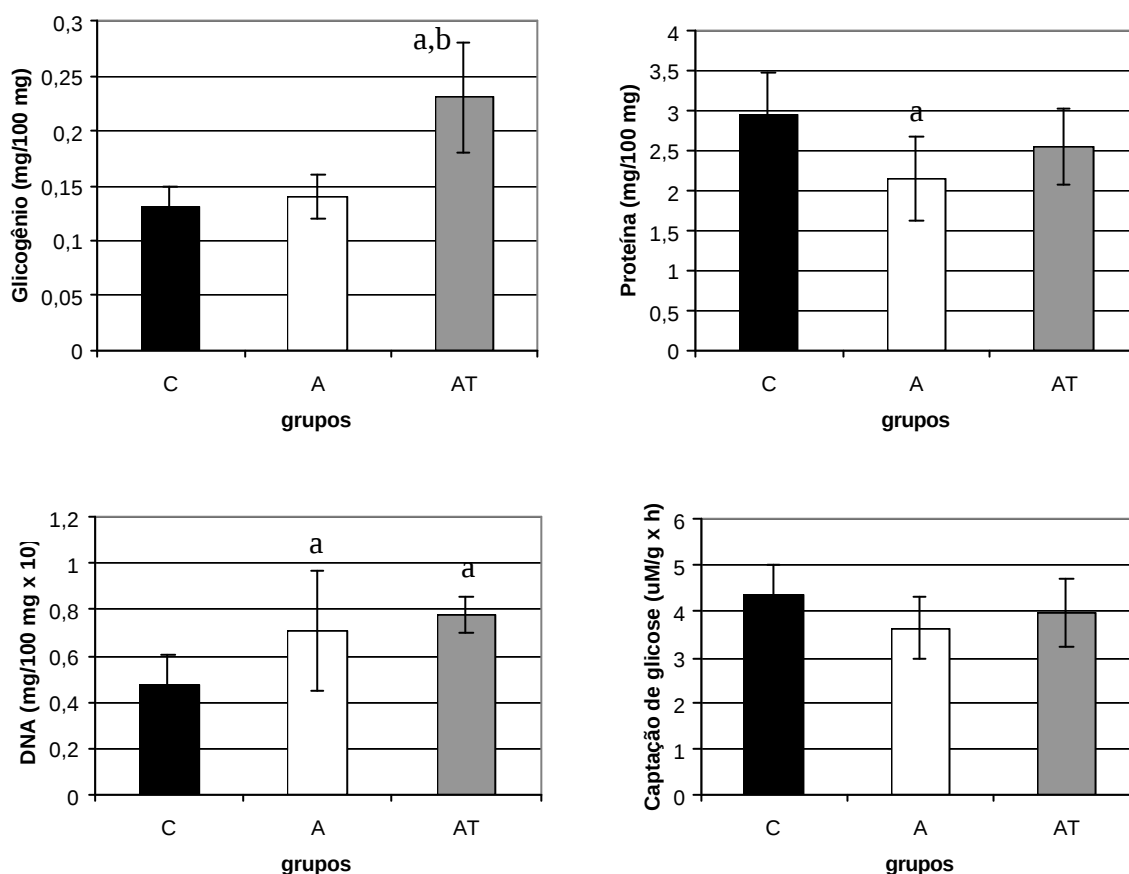


Figura 13: Teores de glicogênio, proteína, DNA e captação de glicose no músculo sóleo isolado dos animais em 60 minutos de incubação após o sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

Tabela 14: Peso total (g), teores de proteína (mg/100 mg), DNA (mg/ 100 mg x 10) e razão proteína/DNA no tecido adiposo epididimal dos animais após o sacrifício (90 dias).

Grupos	Peso Total	Proteína	DNA	Proteína/DNA
C (n=08)	2,229 $\pm$ 0,393	5,97 $\pm$ 0,73	0,70 $\pm$ 0,09	86,11 $\pm$ 12,23
A (n=08)	1,645 $\pm$ 0,666 ^a	6,87 $\pm$ 1,67	0,96 $\pm$,019 ^a	72,47 $\pm$ 16,47
AT (n=08)	0,906 $\pm$ 0,302 ^{a,b}	4,84 $\pm$ 1,91 ^b	1,00 $\pm$ 0,18 ^a	49,03 $\pm$ 20,03 ^{a,b}

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

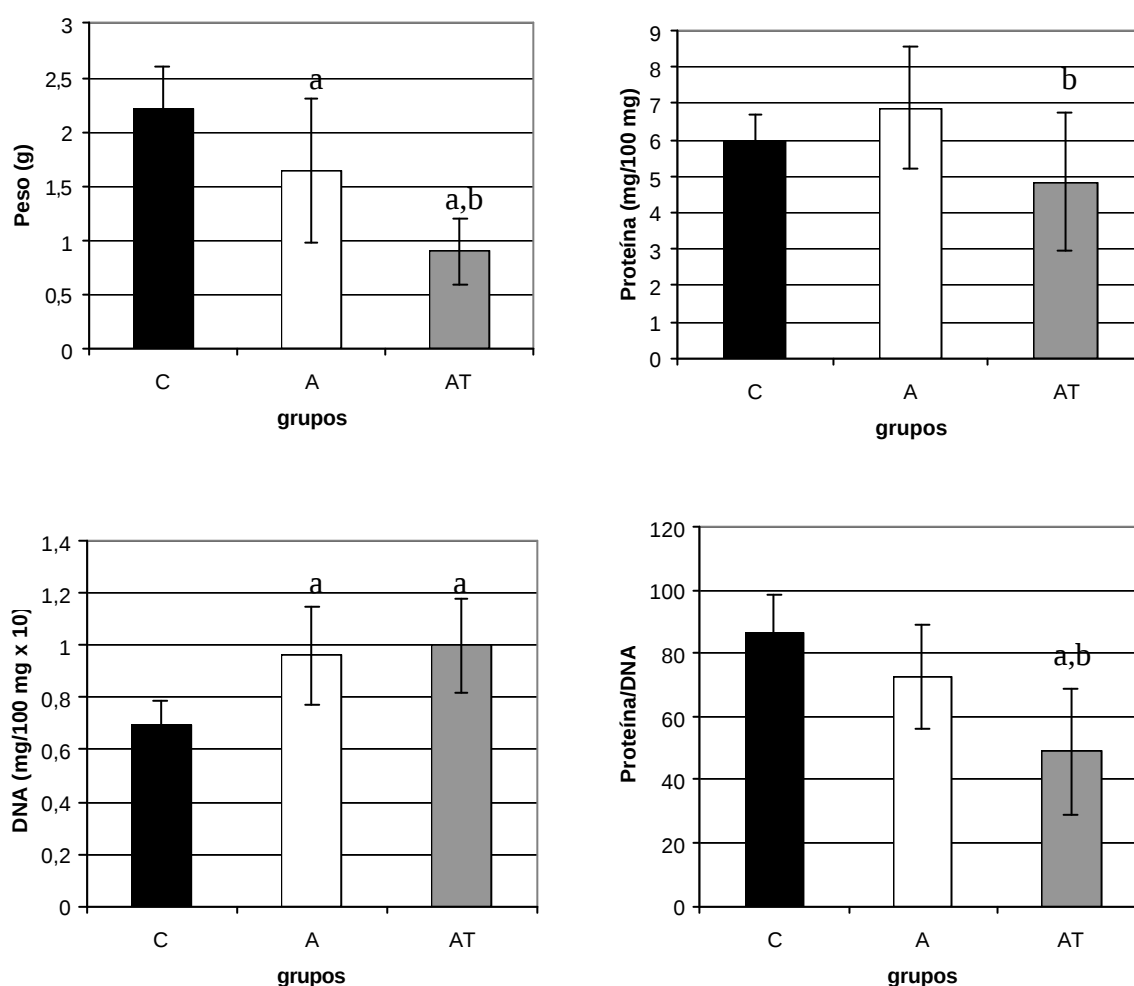


Figura 14: Peso total, teores de proteína, DNA e razão proteína/DNA no tecido adiposo epididimal dos animais após o sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. a ? C; b ? A. C = Controle; A = Aloxana injetada aos 2 dias; T = Treinado.

5.3 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de órgãos chave, relacionados à possível ação moduladora pelo treinamento físico sobre efeitos crônicos da aloxana administrada em ratos neonatos.

KODAMA et al. (1993) verificaram que ratos da linhagem Sprague-Dawley tratados com a mesma idade e dose de aloxana que os animais deste estudo não apresentaram alteração do peso corporal e da ingestão hídrica, mas tiveram ingestão alimentar reduzida. Obtivemos resultados semelhantes em nosso estudo, com exceção da ingestão alimentar que, em nosso experimento, não se alterou. Por outro lado, dados de diferentes trabalhos referentes ao peso corporal de animais tratados com streptozotocina no período neonatal são bastante divergentes entre si (PORTHA et al., 1974; PORTHA et al., 1979; WANG et al., 1994; WANG et al., 1996; CORTRIGHT et al., 1996 e HEMMINGS; SPAFFORD, 2000).

Os animais do grupo tratado com aloxana e exercitados (AT) apresentaram redução do peso corporal, confirmando a literatura (TANCRÉDE et al., 1982; SHIMA et al., 1994; HARADA et al., 2002). Uma vez que a ingestão alimentar desses ratos foi semelhante à dos demais grupos e houve maior gasto energético provocado pelo exercício, o resultado final foi a redução de peso desses animais. A atividade física também resultou em maior ingestão de água por esse grupo.

O GTTo realizado ao desmame (28 dias) mostrou que a aloxana, como esperado, causou elevação da glicemia nos ratos do grupo A. A partir desse momento foi então introduzido o protocolo de exercício para parte desses animais (grupo AT). Ao realizarmos o

GTTo aos 60 dias, vimos que a atividade física exerceu efeito benéfico sobre o grupo AT, uma vez que a glicemia desse grupo foi semelhante à dos ratos controles em todos os momentos (com exceção aos 60 minutos), enquanto os animais do grupo A continuavam com níveis elevados de glicose sanguínea quando comparados aos controles. Estudos comprovam que há aumento da expressão tanto do RNAm quanto da proteína Glut-4 no músculo (proteína responsável pela captação de glicose neste tecido) de ratos treinados (LEE et al., 2002). Além disso, o aumento da produção de óxido nítrico ou na proporção do fluxo capilar no tecido muscular durante exercício contribui para maior captação de glicose da circulação (SAKAMOTO et al., 1997). Desta forma, a redução nos níveis glicêmicos dos nossos animais do grupo AT pode ter sido mediada pelo aumento no número dos transportadores deste substrato, ou ainda por uma maior sensibilidade periférica à insulina causada pelo exercício (BORGHOUTS; KEIZER, 2000; LEE et al., 2002). Os valores obtidos no índice HOMA aos 60 dias reforça a hipótese de maior sensibilidade à insulina pelos animais treinados (AT) em relação ao grupo A.

No GTTo efetuado aos 90 dias, houve uma regressão das alterações glicêmicas provocadas pela aloxana no grupo A. A glicemia de jejum dos animais AT mostrou-se reduzida, contudo, após sobrecarga de glicose, os níveis glicêmicos foram superiores aos dos demais grupos (C e A). Após o sacrifício a glicemia no estado alimentado não diferiu entre os grupos.

A avaliação dos níveis séricos de insulina realizada nos GTTo mostrou que as principais alterações ocorreram nos animais aos 28 dias. A insulinemia de jejum dos animais tratados com aloxana (A) foi 56% menor que a do grupo controle, contudo, após a sobrecarga de glicose ela se elevou continuamente, apesar da glicemia diminuir com o tempo, alcançando o dobro dos valores dos animais C aos 90 minutos. Devido à essa diferença extrema da insulinemia de jejum e aos 90 minutos não encontramos diferença na área sob a curva de insulina nessa fase. Leahy e Weir (1985) foram os primeiros a observar essa resposta inadequada na secreção de insulina. Após administração de 11,1 mM de glicose em ratos Sprague-Dawley injetados com streptozotocina (90 mg/kg i.p.) aos dois dias de vida e em ratos controles, os animais que receberam streptozotocina possuíam níveis de insulina sérica significativamente menores que os animais controles. A redução da concentração de glicose para 2,8 mM, contudo, causou um aumento na taxa de secreção do hormônio nos animais tratados com a droga, que então caiu para níveis semelhantes aos encontrados em 11,1 mM.

Conforme os autores, esse resultado mostra que há insensibilidade à glicose pelas células beta, mas o mecanismo responsável por esse fenômeno é desconhecido (LEAHY; WEIR, 1985). Aos 60 e 90 dias os níveis séricos deste hormônio não diferiram entre os grupos. O mesmo ocorreu no sacrifício, explicando os níveis de glicose e proteínas totais séricas semelhantes neste momento. Apesar disso, o teor de insulina pancreática dos animais de ambos os grupos que receberam aloxana (A e AT) foi menor (34% e 49%, respectivamente) que dos ratos controles, corroborando estudos citados por Portha et al. (1989). Estes últimos autores relatam resultados semelhantes em ratos Wistar com 8 semanas ou mais, tratados com streptozotocina no dia ou 2 dias após o nascimento. De acordo com os mesmos autores, alguns dias após a administração de streptozotocina, ocorre uma queda de aproximadamente 93% dos estoques pancreáticos de insulina. A partir dessa fase, as células beta regeneram-se espontaneamente, por replicação e/ou neogênese, conforme relatam Bonnerweir e Smith (1994) e Waguri et al. (1997), e chegam a alcançar 50% do valor encontrado em ratos controles (Portha et al., 1989).

Além da redução dos estoques pancreáticos de insulina, a secreção estática do hormônio pelas ilhotas isoladas do presente estudo foi maior na concentração mais alta de glicose (16,7 mM) entre os animais treinados. Shima et al. (1994) citam que quando as ilhotas são forçadas a secretar mais insulina, este estresse adicional pode levá-las à lesão e morte. Isso, com o passar do tempo, acentuaria a elevação da glicemia observada no GTT do grupo AT.

Os níveis séricos elevados de A.G.L em nossos animais tratados com aloxana estão de acordo com os resultados de Strackowski et al. (2000) obtidos em ratos diabéticos por streptozotocina, e simulam a alteração metabólica presente em indivíduos com diabetes (BORGHOUTS; KEIZER, 2000). Conforme estes autores (STRACZKOWSKI et al., 2000), a ação de inibição da lipólise pela insulina estaria prejudicada, levando a tal resultado. Favorecendo essa hipótese, o peso total do tecido adiposo epididimal nos animais que receberam a droga diabetogênica foi menor que nos controles. Diversos estudos alertam para o potencial efeito dos A.G.L. como agentes diabetogênicos, uma vez que podem causar inibição da biosíntese e da secreção de insulina pelas células β (YANEY et al., 2003), levá-las à apoptose prematura (HABER et al., 2002), além de outros efeitos que resultam em resistência à ação deste hormônio (BOUCHARD; DESPRÉS, 1989; CURI et al., 2001; KREBS et al., 2001; HAMEL et al., 2003; YANEY et al., 2003).

Uma vez que os A.G.L. são utilizados como substrato energético, isso justificaria sua redução no grupo AT em comparação com o A. Ainda, de acordo com Straczkowski et al. (2000), a atividade física moderada estimula a lipólise no tecido adiposo, o que pode ter levado à diminuição dos teores de proteína, da razão proteína/DNA (índice do tamanho celular, segundo WINICK et al., 1972) e do peso do tecido adiposo entre nossos animais treinados comparados aos sedentários submetidos à ação da aloxana. Esses dados estão de acordo com a literatura e reforçam o efeito benéfico da atividade física sobre esses fatores (TANCRÉDE et al., 1982; SHIMA et al., 1994; HARADA et al., 2002).

O exercício resultou, também, na utilização aumentada dos lipídios e glicogênio hepáticos, levando a uma redução dos níveis destes substratos no tecido em questão. Essas alterações podem ter contribuído para a redução acentuada da razão proteína/DNA das células hepáticas do grupo treinado (AT) comparadas com os demais grupos (C e A).

O tratamento com aloxana interferiu negativamente sobre as proteínas do músculo sóleo dos animais A. Como a insulina exerce papel fundamental sobre a entrada de aminoácidos nas células, facilitando a síntese protéica e inibindo a proteólise (LUCIANO; MELLO, 1998), a redução da secreção desse hormônio ou a resistência à sua ação podem ter sido responsáveis por esse resultado. O protocolo de exercício por nós utilizado foi eficaz em evitar essa alteração.

Um resultado interessante provocado pela administração neonatal de aloxana encontrado em nosso estudo foi o aumento do teor de DNA encontrado em todos os tecidos avaliados (pâncreas, fígado, músculo e tecido adiposo epididimal), com exceção do grupo A, que não apresentou esse comportamento no fígado. O exercício físico nada interferiu neste achado. Sabe-se de longa data que a fase hiperplásica, embora varie de acordo com o órgão estudado, ocorre ainda por algum período após o nascimento (WINICK, 1972), mas cessa rapidamente. A atividade física foi empregada apenas após o desmame, quando provavelmente esta fase já teria acabado. Desta forma o exercício não teria interferido nesse processo. Esse aumento dos teores de DNA favoreceu a menor razão proteína/DNA da maior parte dos tecidos estudados nos ratos tratados com aloxana submetidos ou não ao treinamento físico.

5.4 CONCLUSÃO

Concluimos que, embora o quadro de hiperglicemia tenha regredido nos animais tratados com aloxana e mantidos sedentários (grupo A), algumas alterações séricas e teciduais permaneceram, podendo ser prejudiciais à manutenção da homeostase. A atividade física apenas atenuou parte dessas alterações. Contudo, o treinamento agravou a intolerância à glicose aos 90 dias, indicando a necessidade da adequação da intensidade do esforço físico para organismos diabéticos.

6. COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos no primeiro estudo não permitem caracterizar os animais que receberam tratamento neonatal com aloxana como “diabéticos”. Entretanto, alterações metabólicas importantes manifestaram-se, sendo que os machos tratados aos 2 dias de vida (DM) foram os mais afetados. Entre as principais alterações constatadas nesse grupo podemos citar:

- Elevação da glicemia de jejum e intolerância à glicose observadas até os 60 dias de idade;
- Redução do teor de insulina pancreática;
- Redução da razão proteína/DNA pancreática;
- Elevação do nível de A.G.L. séricos.

Em função das alterações metabólicas encontradas, julgamos pertinente realizar um segundo estudo para verificar os efeitos do treinamento físico sobre as mesmas em machos injetados com aloxana no segundo dia de vida.

Com relação ao segundo estudo, analisando separadamente os parâmetros “centrais” como glicose sangüínea, insulina sérica e insulina pancreática, o treinamento desencadeou respostas desfavoráveis nos animais. Os ratos AT apresentaram aos 90 dias:

- Maior glicemia durante GTT do que os demais animais;
- Secreção estática de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas anormalmente elevada em resposta a concentrações elevadas de glicose (16,7 mM);

- Teor de insulina pancreática ligeiramente inferior à dos animais do grupo A.

No que diz respeito às alterações “periféricas” (músculo e demais tecidos) o treinamento foi benéfico pois pudemos observar que o protocolo de exercício utilizado em nosso estudo foi eficiente em:

- Aumentar a sensibilidade à insulina aos 60 dias;
- Aumentar o teor de glicogênio muscular;
- Reduzir os níveis séricos de A.G.L.;
- Reduzir o peso do tecido adiposo epididimal;
- Reduzir o peso corporal.

Desta forma, concluímos que fica evidenciada a necessidade de mais estudos visando a adequação da intensidade do esforço físico para organismos diabéticos.

7. REFERÊNCIAS¹

ARISON, R. N.; FEUDALE, E. L. Induction of renal tumour by streptozotocin in rats. **Nature**, London, v.214, n.5094, p.1254-1255, 1967.

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

BONNERWEIR, S.; SMITH, F. E. Islet cell growth and the growth factors involved. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v.5, n.2, p.60-64, 1994.

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

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

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

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

¹ De acordo com:

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

CHANG, S. A. et al. The effect of cilostazol on glucose tolerance and insulin resistance in a rat model of NIDDM. **Korean Journal of Internal Medicine**, Seoul, v.16, n.2, p.87-92, 2001.

COMBETTES-SOUVERAIN, M.; ISSAD, T. Molecular basis of insulin action. **Diabetes & Metabolism**, Paris, v.24, n.6, p.477-489, 1998.

CORTRIGHT, R. N. et al. Diabetes reduces growth and body composition more in male than in female rats. **Physiology & Behavior**, Tarrytown, v.60, n.5, p.1233-1238, 1996.

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

CUMAN, R. K.; BERSANI-AMADO, C. A.; FORTES, Z. B. Influence of type two diabetes on the inflammatory response in rats. **Inflammatory Research**, Basel, v.50, n.9, p.460-465, 2001.

CURI, R. et al. Leucócitos: fonte adicional de ácidos graxos para músculos esqueléticos. **Motriz**, Rio Claro, v.7, n.1, supl., p.69-76, 2001.

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

EIZIRIK, D. L.; SANDLER, S. Functional restoration of cultured mouse pancreatic islets after *in vitro* exposure to alloxan. **Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v.63, p.396-399, 1988.

EIZIRIK, D. L.; SANDLER, S.; PALMER, J. P. Repair of pancreatic β -cells: a relevant phenomenon in early IDDM? **Diabetes**, Alexandria, v.42, n.10, p.1383-1391, 1993.

EIZIRIK, D. L. β -cell defence and repair mechanisms in human pancreatic islets. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, v.28, n.6, p.302-305, 1996.

FOLSOM, A. R.; KUSHI, L. H.; HONG, C. Physical activity and incident diabetes mellitus in postmenopausal women. **American Journal of Public Health**, Washington, v.90, n.1, p.134-138, 2000.

GILES, K. W.; MYERS, A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. **Nature**, London, v.206, n.4979, p.93, 1965.

- HABER, E. P. et al. Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic β -cells. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v.194, p.1-12, 2002.
- HAMEL, F. G.; UPWARD, J. L.; BENNETT, R. G. In vitro inhibition of insulin-degrading enzyme by long-chain fatty acids and their coenzyme a thioesters. **Endocrinology**, Bethesda, v.144, n.6, p.2404-2408, 2003.
- HARADA, N. et al. Combined effect of ace inhibitor and exercise training on insulin resistance in type 2 diabetic rats. **Life Sciences**, Tarrytown, v.70, p.1811-1820, 2002.
- HEMMINGS, S. J.; SPAFFORD, D. Neonatal streptozotocin model of type II diabetes mellitus in the Fisher 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, Exeter, v.32, n.8, p.905-919, 2000.
- HERBERT, V.; LAU, K. S.; GOTLIEB, C.W.; BLEICHER, S.T. Coated charcoals immunoassay of insulin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v.25, n.10, p.1375-1384, 1965.
- IWASE, M. et al. Liver, kidney and islet cell tumors in spontaneously hypertensive and normotensive rats treated neonatally with streptozotocin. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Aobu-ku, v.159, p.83-90, 1989.
- IWASE, M. et al. Spontaneous recovery from non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin treatment in spontaneously hypertensive rats. **Metabolismo**, Rome, v.40, n.1, p.10-14, 1991.
- KAZUMI, T. et al. Tumorigenic action of streptozotocin on the pancreas and kidney in male Wistar rats. **Cancer Research**, Baltimore, v.38, n.7, p.2144-2147, 1978.
- KELLEY, D. E.; GOODPASTER, B. H. Effects of physical activity on insulin action and glucose tolerance in obesity. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Madison, v.31, n. 11, suppl., p.619-623, 1999.
- KODAMA, T. et al. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Shannon, v.20, n.3, p.183-189, 1993.
- KREBS, M. et al. Free fatty acids inhibit the glucose-stimulated increase of intramuscular glucose-6-phosphate concentration in man. **Diabetes**, Alexandria, v.50, suppl., p.A25, 2001.

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

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

LATORRACA, M. Q. et al. Protein deficiency during pregnancy and lactation impairs glucose-induced insulin secretion but increases the sensitivity to insulin in weaned rats. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v.80, p.291-297, 1998.

LEAHY, J. L.; WEIR, G. C. Unresponsiveness to glucose in a streptozotocin model of diabetes: inappropriate insulin and glucagon responses to a reduction of glucose concentration. **Diabetes**, Alexandria, v.34, p.653-659, 1985.

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

LE MARCHAND-BRUSTEL, Y. Molecular mechanisms of insulin action in normal and insulin-resistant states. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, Leipzig, v.107, n.2, p.126-132, 1999.

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

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

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **British Medical Journal**, London, n.5291, p.1507-1513, 1962.

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

MATHEWS, J. N. S. et al. Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, London, v.27, n.6719, p.230-235, 1990.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, New York, v.28, p.412-19, 1985.

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

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

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

MURALI, B.; GOYAL, R. K. Improvement in insulin sensitivity by losartan in non-insulin dependent diabetic (NIDDM) rats. **Pharmacological Research**, London, v.44, n.5, p.385-389, 2001.

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

ÖSTENSON, C. G.; GRILL, V.; ROOS, M. Studies on sex dependency of b-cell susceptibility to streptozotocin in a rat model of type II diabetes mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology**, Leipzig, v.93, n.2/3, p.241-247, 1989.

PORTHA, B. et al. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. **Diabetes**, Alexandria, v.23, n.11, p.889-895, 1974.

PORTHA, B.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. **Diabetologia**, New York, v.17, n.6, p.371-377, 1979.

PORTHA, B.; BLONDEL, O. Insulin resistance in rats with NIDDM induced by neonatal (5 days) streptozotocin: evidence for reversal following phlorizin treatment. **Diabetologia**, New York, v.31, n.7, p.532A, 1988.

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

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

RANDLE, P. J. et al. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, New York, v.1, n.728, p.785-789, 1963.

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

ROSSINI, A. A. et al. Sex difference in the multiple-dose streptozotocin model of diabetes. **Endocrinology**, Bethesda, v.103, n.4, p.1518-1520, 1978.

SAKAMOTO, S. et al. Effect of exercise training and food restriction on endothelium-dependent relaxation in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous NIDDM. **Diabetes**, Alexandria, v.47, p.82-86, 1998.

SEALS, D. R. et al. Glucose tolerance in young and older athletes and sedentary men. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.56, p.1521-1525, 1984.

SHIMA, K. et al. Effects of difference in amount of exercise training on prevention of diabetes mellitus in the Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Shannon, v.23, p.147-154, 1994.

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

STRACZKOWSKI, M. et al. The effect of a single bout of exhaustive exercise on muscle carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, Berlim, v.37, p.47-53, 2000.

TANCRÉDE, G. et al. Benefical effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Diabetes**, Alexandria, v.31, p.406-409, 1982.

WAGURI, M. et al. Demonstration of two different processes of β -cell regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan. **Diabetes**, Alexandria, v.46, p.1281-1290, 1997.

WANG, R. N.; BOUWENS, L.; KLÖPPEL, G. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. **Diabetologia**, New York, v.37, p.1088-1096, 1994.

WANG, R. N.;BOUWENS, L.; KLÖPPEL, G. Beta-cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period. **Diabetologia**, New York, v.39, n.5, p.548-557, 1996.

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

WINICK, M.; BASEL, J.A.; ROSSO, P. A nutrition and cell growth. In: WINICK, M. **Nutrition and development**. New York: John Wiley & Sons, 1972. p.49-97.

YAMAGAMI, T. et al. Induction of rat pancreatic B-cell tumors by the combined administration of streptozotocin or alloxan and poly (adenosine diphosphate ribose) synthetase inhibitors. **Cancer Research**, Baltimore, v.45, p.1845-1849, 1985.

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

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

APÊNDICE – “Turnover” de proteínas em músculo de ratas Wistar submetidas a tratamento neonatal com aloxana.

Para verificar os efeitos da administração neonatal de aloxana sobre o “turnover” de proteína no músculo estriado esquelético, ratas Wistar recém nascidas (2 ou 4 dias, grupos D e Q, respectivamente) receberam aloxana (200 mg/Kg de peso corporal) via intraperitoneal. Como controles (C) foram utilizadas ratas injetadas com veículo (tampão citrato). Aos 90 dias de idade, os animais foram sacrificados por decapitação para o isolamento do músculo sóleo. As taxas de degradação (liberação de tirosina) e síntese (incorporação de ^{14}C fenilalanina em proteína) protéicas foram avaliadas. Os resultados foram analisados pela ANOVA One-Way, com nível de significância pré-fixado em 5%. As ratas que receberam a droga aos 2 ou 4 dias de vida tiveram menor taxa de síntese protéica em comparação ao grupo controle (Tabela 1 e Figura 1). Uma vez que a síntese protéica no músculo esquelético depende da insulina e a concentração desse hormônio foi igual entre os diferentes grupos durante a incubação, esse resultado sugere que a ação do hormônio pode estar prejudicada no tecido em questão.

Tabela 1: Síntese e degradação protéicas (nmol/g x h) no músculo sóleo de ratas após o sacrifício (90 dias).

	Síntese	Degradação
C (n=10)	30,60 $\pm$ 6,77	214,02 $\pm$ 39,72
D (n=10)	19,94 $\pm$ 5,22 ^c	256,43 $\pm$ 33,69
Q (n=10)	19,69 $\pm$ 5,84 ^c	215,70 $\pm$ 59,64

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. C = Controle; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. c $\neq$ C.

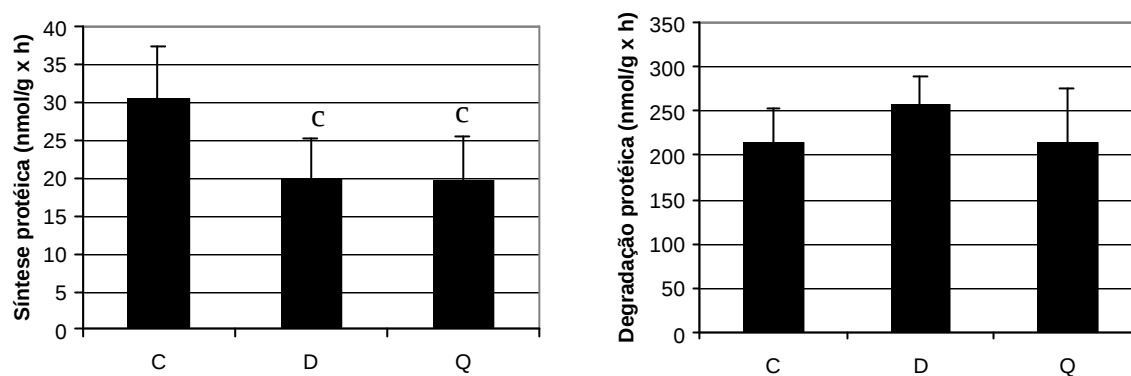


Figura 1: Síntese e degradação protéicas no músculo sóleo de ratas após o sacrifício (90 dias). Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. C = Controle; D = Aloxana injetada aos 2 dias; Q = Aloxana injetada aos 4 dias. $c \neq C$.