

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

# ESTUDO MORFOFISIOLÓGICO DE ÓRGÃOS ISOLADOS DE RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO E A AMINO Guanidina

EDMARA TEREZA MEIRA E NICO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro – São Paulo – Brasil**  
**Fevereiro/2012**

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

---

# ESTUDO MORFOFISIOLÓGICO DE ÓRGÃOS ISOLADOS DE RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO E A AMINO Guanidina

**Mestranda: Edmara Tereza Meira e Nico**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro – São Paulo – Brasil  
Fevereiro/2012**

574.82 Nico, Edmara Tereza Meira e  
N633es Estudo morfofisiológico de órgãos isolados de ratos  
diabéticos submetidos a exercício físico e a aminoguanidina /  
Edmara Tereza Meira e Nico. - Rio Claro : [s.n.], 2012  
100 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Maria Izabel Souza Camargo

1. Histologia. 2. Diabetes. 3. Tireóide. 4. Fígado. I. Título.

## Dedicatória

Aos meus pais, por me proporcionarem momentos de alegria e crescimento.

À eles meu eterno amor e gratidão.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus pela vida.

Aos meus amados pais por me guiarem pelo caminho da vida, pelo apoio emocional e por acreditarem em mim. Desculpem meus momentos de ausência.

Aos meus irmãos por crescerem comigo e por me orientarem quando eu precisei.

A toda a minha família pela ajuda, pelo apoio, por simplesmente existirem. Vocês formaram o que eu sou e eu serei grata sempre.

À minha orientadora prof<sup>a</sup> Dra Maria Izabel de Souza Camargo (Bel) pela enorme paciência e pela oportunidade.

À amiga Patrícia Rosa de Oliveira, pela imensa ajuda e cooperação na realização deste trabalho. Estima, respeito e admiração são palavras que descrevem o que guardarei para a vida.

Aos técnicos dos laboratórios (Mônika, Antônio, Gerson e Pablo) pela ajuda e colaboração.

À UNESP e ao Programa de Pós-graduação pela formação.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus queridos e maravilhosos amigos Franco, Léo, Stephan (Pefa), Vlamir, Thiago e Ana (Matraca), pelo imenso amparo e ajuda nos momentos difíceis que encontrei no mestrado.

As minhas amigas Fran e Cláudia, por compreenderem a minha ausência e os meus desdobramentos nesse período, obrigado pelo grande aprendizado e pela oportunidade de troca de conhecimento.

Aos meus amigos de pós-graduação Dea, Bruno, Alex, Luís, Remédio, Débora e Emygdio pelos cafés, pelas risadas e momentos de descontração.

Aos meus amigos de Rio Claro Ives, Gustavo (Tropeço), Sérgio (Miagui), Weilan (Paixão), Jana e Ariane, pela companhia e amizade.

À todos fazem parte da minha vida e do meu coração um eterno obrigada.

## Epígrafe

*Assim mesmo*

*“Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.  
Perdoe-as assim mesmo.*

*Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.  
Seja gentil, assim mesmo.*

*Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.  
Vença assim mesmo.*

*Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.  
Seja honesto assim mesmo.*

*O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.  
Construa assim mesmo.*

*Se você tem Paz e é Feliz, as pessoas podem sentir inveja.  
Seja Feliz assim mesmo.*

*Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.  
Dê o melhor de você assim mesmo.*

*Veja que, no final das contas, é entre você e DEUS.  
Nunca foi entre você e as outras pessoas”.*  
*Madre Teresa de Calcutá*

## SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	9
1. Introdução .....	11
2. Objetivo .....	22
3. Material e Método .....	24
4. Resultados .....	29
Capítulo 1. Ratos Diabéticos Treinados e Tratados com Aminoguanidina. I. Avaliação Hepática .....	31
Capítulo 2. Ação da Aminoguanidina sobre a tireóide de ratos Diabéticos Treinados. ....	56
5. Discussão Geral .....	80
6. Conclusões .....	89
7. Referências Bibliográficas .....	91

*Resumo*

---

---



## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que acomete diversos órgãos, sendo considerado o quinto maior causador de morte no mundo. Podendo ser caracterizado: ou pela ausência, ou pela deficiência na secreção, ou pela resistência a insulina resultando em hiperglicemia e glicosúria. O treinamento físico interfere nos efeitos do diabetes, melhorando a captação de glicose pelas células. Assim como o treinamento físico é de grande importância, o emprego de substâncias anti-AGE como a aminoguanidina são eficazes na terapia de ratos diabéticos. O presente estudo analisou o fígado e a tireóide de ratos diabéticos submetidos ao exercício físico e tratados com aminoguanidina, utilizando técnicas histológicas e histoquímicas, para detectar possíveis alterações provocadas por este químico em indivíduos tratados com medicamentos que o tenham na sua composição. Os ratos utilizados neste estudo foram divididos em cinco grupos: Controle sedentário (**C/SD**), Diabético sedentário (**DB/SD**), Diabético treinado (**DB/TR**), Diabético sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**), Diabético treinado e tratado com aminoguanidina (**DB/TR-AG**). Os resultados obtidos revelaram alterações citológica, morfo-histológica e histoquímica nos órgãos analisados e retirados de indivíduos diabéticos (treinados e/ou tratados). As alterações foram comparadas as encontradas nos indivíduos do grupo controle sedentário e diabético sedentário e se resumem em: (1) hipertrofia dos hepatócitos, (2) presença e distribuição de polissacarídeos no citoplasma dos hepatócitos e, principalmente, (3) congestão dos capilares sinusóides hepáticos, (4) mudança da forma dos tireócitos e dos seus núcleos (passaram de cúbicos a pavimentosos), (5) variação na composição química do colóide, (6) marcação e morfologia das células parafoliculares, bem como (7) aumento da irrigação sanguínea no tecido conjuntivo o que permitiu sugerir que a aminoguanidina não é hepatotóxica quando utilizada na dosagem 1g/L para o tratamento das complicações do diabetes, mas causa alteração no metabolismo da tireóide.

**Palavras chave:** Diabetes, aminoguanidina, exercício físico, tireóide, fígado

*Abstract*

---

**ABSTRACT**

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder that affects various organs and is considered the fifth major cause of death worldwide. May be characterized: or the absence or deficiency in the secretion, or by insulin resistance resulting in hyperglycemia and glycosuria. The exercise training interferes in the effects of diabetes by improving glucose uptake by cells. Just as physical training is of great importance, the use of substances such as anti-AGE aminoguanidine therapy are effective in diabetic rats. The present study examined the thyroid and liver of diabetic rats subjected to physical and treated with aminoguanidine, using histological and histochemical techniques to detect possible changes caused by this chemical in people treated with drugs that have in their composition. The mice used in this study were divided into five groups: sedentary control (**C/SD**), sedentary diabetic (**DB/SD**), trained diabetic (**DB/TR**), sedentary diabetic and treated with aminoguanidine (**DB/ SD-AG**), Diabetic trained and treated with aminoguanidine (**DB/TR-AG**). The results revealed cytological, morphological, histological and histochemical changes in analyzed organs and taken from diabetic subjects (trained and / or treated). The changes were compared with those found in control subjects and diabetic sedentary and can be summarized as: (1) hypertrophy of hepatocytes, (2) presence and distribution of polysaccharides in the cytoplasm of hepatocytes and, especially, (3) capillary congestion of sinusoids liver, (4) changes the shape of thyrocytes and its core (changed from the cubic pavimentosos), (5) varying the chemical composition of the colloid, (6) marking and morphology of the parafollicular cells, and (7) increased irrigation blood in the tissue allowing suggested that aminoguanidine is hepatotoxic dose when used at 1 g/L for treating complications of diabetes, but causes alteration in the metabolism of the thyroid.

**Keywords:** Diabetes, aminoguanidine, exercise, thyroid, liver.

# *Introdução*

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

### **Epidemiologia do Diabetes Mellitus**

O Diabetes Mellitus (DM) é uma patologia que atualmente atinge uma grande parcela da população, podendo manifestar-se e ser detectado em qualquer idade. A prevalência e a taxa de mortalidade causada pelo DM crescem com a idade, sendo, por isso preocupante o aumento de pessoas mais velhas (as mais atingidas pela doença) na população brasileira (Manual de Diabetes, 1993). Outros fatores que interferem no aumento da incidência dessa doença no mundo, além do aumento da idade da população, são: o maior número de pessoas obesas e a maior urbanização das cidades (KNOWLER et al., 2009).

O DM ocupa o quinto lugar da causa *mortis* no mundo e, no Brasil ainda é uma das principais causas clínicas de hospitalização, o que traz como consequências os altos custos financeiros para os governos, sendo suas manifestações crônicas ou complicações as causas mais frequentes de invalidez precoce (Manual de Diabetes, 1993). Estima-se que em 2010, foram afetadas 171 milhões de pessoas pela DM (ADA, 2011).

O DM é uma Síndrome Metabólica originada pela ausência, ou deficiência, na secreção do hormônio insulina ou ainda, pela resistência no tecido-alvo em relação a esse hormônio, causando a hiperglicemia. Como consequência dessa deficiência, não há captação da glicose pelas células do corpo, com excessão das células nervosas, que não necessitam de insulina para o transporte de glicose para o seu interior. Esta doença é caracterizada pela ocorrência de alterações endócrino-metabólicas que modificam a homeostase do organismo. As alterações endócrinas são divididas em: diabetes tipo 1, causadas pela deficiência ou ausência na secreção do hormônio insulina pelo pâncreas; e diabetes tipo 2, pela ação deficiente da insulina nos tecidos-alvo. As alterações metabólicas, em decorrência a essas alterações endócrinas, envolvem transtornos no metabolismo de carboidratos, de lipídios e de proteínas, levando a hiperglicemia, bem como danos nos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (GUYTON, 2011).

Especificamente o DM tipo 1 é caracterizado por causar lesões nas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas endócrino, o que compromete a produção de insulina. Estas lesões podem ser causadas por vários agentes,

inclusive virus ou doenças auto-imunes, apesar do fator hereditariedade ter importante influência na suscetibilidade das células  $\beta$  a essas lesões. O DM tipo 1 pode surgir rapidamente (em semanas ou até dias). O DM tipo 2 é caracterizado pela resistência insulínica devido a redução da sensibilidade do efeito metabólico da insulina. Assim como no tipo 1, ocasiona múltiplas alterações metabólicas decorrentes da hiperglicemia. O DM tipo 2 atinge de 80 a 90% dos diabéticos (GUYTON, 2011).

O pâncreas, glândula mista com forma alongada, situada imediatamente abaixo do estômago é formado por dois tipos distintos de tecido: a) o exócrino que corresponde aos ácinos, estes secretores de substâncias digestivas para o lúmen intestinal, e b) o endócrino, formado pelas ilhotas de Langerhans, as quais possuem células que são responsáveis pela produção e secreção de hormônios que são liberados diretamente na corrente sanguínea. O número de ilhotas de Langerhans no pâncreas humano varia em torno de um milhão, e os tipos celulares mais importantes, são  $\alpha$  e  $\beta$ . As células  $\alpha$  secretam o hormônio glucagon enquanto que as  $\beta$  secretam o hormônio insulina (GUYTON, 2011). Cada célula da ilhota tem forma poligonal e/ou arredondada, por entre as quais é encontrada rica rede de capilares sanguíneos, formados por células endoteliais fenestradas. Envolvendo cada ilhota existe um tecido conjuntivo frouxo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008)

A insulina é um hormônio trófico que favorece o armazenamento dos substratos e a manutenção dos tecidos. Em valores normais de glicemia (entre 75-100mg/mL) e na ausência de insulina, o tecido nervoso seria o único que conseguiria utilizar a glicose circulante em quantidades suficientes para manutenção das suas necessidades. A presença da insulina seria, então, necessária para garantir a entrada de quantidades adequadas de glicose nas células. Independente da causa, a falta deste hormônio altera o metabolismo dos glicídios, lipídios e das proteínas nos organismos (NADEU e PERONNET., 1985).

### **Comorbidades**

As principais complicações clínicas encontradas nos indivíduos portadores de DM:

### Retinopatia

Retinopatia diabética: lesão na retina, causada pelos AGEs (advanced glycation end-products) associados aos vasos sanguíneos da retina o que provoca pequenos sangramentos e, conseqüentemente, a perda da acuidade visual. Hoje, é considerada como uma das doenças mais frequentes nos diabéticos, junto com a catarata (SBD, 2011).

### Nefropatia

Nefropatia diabética: doença resultante do excesso de glicose filtrado pelo rim, que é conseqüentemente excretado via urina (glicosúria), o que causa o espessamento da membrana basal do glomérulo, alterações na filtração e perda da função glomerular, aumentando o tamanho do órgão, além de provocar micro-lesões, com o decorrer do tempo, as quais levam à excreção da proteína albumina (proteinúria) e ainda, como consequência esse aumento da excreção pode causar a insuficiência renal (ABC da Saúde, 2011).

### Neuropatias

Neuropatias diabéticas: a periférica é a mais frequente por afetar os membros inferiores, tanto na própria função motora como na função sensitiva (desmielinização e degeneração axonal dos neurônios periféricos, redução da condução nervosa e do fluxo sanguíneo). Esta, e outras alterações neurológicas, podem ser causadas devido à microangiopatias e ao aumento da permeabilidade dos capilares provocando o surgimento de lesões nos nervos decorrentes da alteração no metabolismo (exemplo, o pé diabético, amputações, comprometimento da cicatrização das feridas dos diabéticos) (KUMAR et al., 2008).

### Angiopatias

A hiperglicemia é o principal fator que provoca a redução ou a inibição do relaxamento do endotélio de diferentes tipos de artérias, devido à diminuição ou a produção/disponibilidade de fatores relaxantes (substâncias bioativas) do endotélio tais como o óxido nítrico (NO) (DE VRIESE et al., 2000). Essa disfunção no endotélio provoca complicações vasculares (GOLDBERG, 2004; KIKKAWA et al., 2003). Estudos que avaliaram os vasos sanguíneos de pacientes diabéticos revelaram que existe uma tendência destes a sofrerem hiperplasia na camada íntima com a formação de placas ateroscleróticas

difusas e calcificadas (LORUSSO et al, 2003). Os pacientes portadores, podem ainda apresentar outros tipos de angiopatia, resultantes da obstrução de seus vasos sanguíneos, podendo ser as mesmas de dois tipos: microangiopatia (obstrução dos capilares) e macroangiopatia (deposição de gordura ou formação de coágulos sanguíneos em vasos de maior calibre). Dentre as angiopatias macrovasculares está a doença arterial coronariana. De acordo com Nicholls et al. (2008), os diabéticos apresentam luz arterial menor, progressão mais rápida no volume da placa de ateroma e redução significativa da membrana plasmática externa. Concluindo-se, que a extensão da aterosclerose é mais extensa e o remodelamento arterial compensatório é inadequado.

### **Hormônio Insulina**

A insulina é um hormônio que tem características bioquímicas de um polipeptídeo com duas cadeias lineares, tendo a cadeia  $\alpha$ , 21 aminoácidos e a  $\beta$ , 30 aminoácidos. As diversas posições dos aminoácidos, que diferem do homem para os outros animais, não alteram a sua atividade biológica, permitindo desta forma a manutenção da potencialidade, mesmo quando a insulina tem origem em outro animal e é administrada ao ser humano (FOSTER, 1984). O efeito mais importante da insulina é o de promover o transporte da glicose para o interior das células do corpo, em especial, as musculares, adiposas e hepáticas (GUYTON, 2011). A deficiência de insulina pode causar, entre outras conseqüências, a diminuição na capacidade de sintetizar e acumular glicogênio no fígado (LUCIANO, 1991).

Quanto ao metabolismo dos glicídios, a redução da permeabilidade das membranas celulares à glicose, acarreta, principalmente, no período de pós-prandial, um acúmulo de glicose no líquido extracelular e, portanto, uma hiperglicemia. A insulina é metabolizada tendo como resultado, a despolarização da membrana plasmática, com conseqüente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células  $\beta$  via canais voltagem dependentes (GUYTON, 2011).

O processo de secreção da insulina pelas células pancreáticas é modulado por vários nutrientes, neurotransmissores, bem como pela ação de outros hormônios. O principal fator estimulante para a secreção da insulina é a presença de glicose no sangue, único nutriente, *in vitro*, que promove (sozinho) a liberação de insulina (GUYTON, 2011).



### **Diabetes Mellitus e Exercício Físico**

O treinamento físico tem sido uma atividade promotora da melhora na tolerância à glicose e a diminuição na liberação de insulina em resposta à glicose (oral ou intravenosa), o que significa melhora na eficiência da regulação da glicemia (BERGER et al., 1975).

Sabe-se, que o sucesso do tratamento de indivíduos diabéticos depende também da prática regular de exercícios físicos, os quais promovem efeitos benéficos significativos no controle do grau da glicemia, em relação às outras terapias geralmente utilizadas. Esse efeito tem relação direta com o trabalho muscular, que em resposta ao exercício, tem aumentada a utilização da glicose (pelos músculos esqueléticos), controlando a glicemia, independente da ação da insulina (Manual de Diabetes, 1993; HANSON, 1993; EVANS e CAMPBELL, 1997).

A contribuição efetiva no tratamento do DM é observada quando o exercício físico é praticado por 150 minutos/semanais (30 minutos/dia e cinco vezes por semana), assim como o também indicado para pacientes com doenças cardiovasculares (ACSM, 2001).

Nos últimos anos, o interesse pela atividade física tem estimulado a realização de numerosos estudos clínicos, com objetivo de se obter os melhores treinamentos realizados por pacientes portadores de vários tipos de doenças, incluindo o DM. Nos indivíduos diabéticos a prática do exercício físico provoca ainda um aumento na sensibilidade à insulina, ou sobre o efeito da sua secreção (TANCREDE et al., 1982 apud LUCIANO, 1991).

Praticar exercícios físicos significa realizar repetições sistemáticas de movimentos orientados, o que provoca conseqüente aumento no consumo de oxigênio devido à solicitação muscular. Assim há uma série de respostas fisiológicas nos sistemas corporais, em especial, no cardiovascular, mantendo o equilíbrio celular, frente ao aumento das demandas metabólicas e do consumo de energia (MCARDLE; KATCH; KATCH, 1998). Sabe-se que o exercício físico aeróbio, de intensidade moderada e realizado continuamente, atua tanto prevenindo quanto no tratamento das doenças cardiovasculares. Sua prática regular tem sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo e seus benefícios também foram comprovados na prevenção e no tratamento da hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade e osteoporose

(MORRIS et al., 1980; SISCOVICK et al., 1984; HULL et al., 1994). Sendo assim, o sedentarismo e o baixo nível de condicionamento são fatores desencadeadores dessas doenças (CIOLAC e GUIMARÃES, 2004). Muitos estudos ainda demonstram fortes evidências de que a prática de exercício físico beneficia sim os pacientes portadores de inúmeras doenças, no entanto, os seus efeitos crônicos em algumas delas ainda são desconhecidos (DELBIN, 2009).

Durante a prática de exercícios físicos, o processo de homeostase dos substratos é modulado pela interação entre a insulina e os hormônios contra-regulatórios, especificamente o glucagon e as catecolaminas. O exercício físico também promove a queda na secreção de insulina, aumento na secreção de glucagon e, aumento na atividade do sistema nervoso simpático, o qual inerva diretamente as ilhotas de Langerhans, com conhecida ação via receptores alfa adrenérgicos (predominantemente) (LUCIANO, 1991).

Os dados da literatura têm também revelado que ao final da prática de exercícios físicos, grandes concentrações de lactato ficariam disponíveis na circulação. A remoção deste lactato seria coincidente com a elevação dos níveis de insulina. Provavelmente, o fator de inibição da insulina, ou seja, a secreção adrenérgica deixaria de ocorrer, causando a elevação deste hormônio. Neste momento, observar-se-ia a hiperinsulinemia (que otimizaria a síntese de glicogênio) com hipergluconemia transitória (que levaria a glicogênese hepática), sendo ambos os mecanismos importantes ao organismo para manter a homeostase (CERSOSIMO, 1987 apud GOBATTO, 1989).

O papel da insulina no controle do metabolismo energético durante o exercício físico ainda é discutido. Por um lado, ela prejudica a mobilização das reservas de glicogênio, de glicídios e de lipídios e reduz a gliconeogênese. Por outro, ela é necessária para aumentar a utilização de glicose circulante pelo músculo esquelético. Os dados experimentais demonstraram que a liberação plasmática de insulina não aumentou, nem diminuiu durante a prática prolongada de exercício físico (NADEAU e PERONNET, 1985).

### **Diabetes Mellitus e Pimagedine**

A hiperglicemia causa primária dos problemas diabéticos é consequência da falta de insulina sérica, provocando complicações micro e macrovasculares, por meio da formação de produtos finais de glicação

avançada (AGEs) (moléculas heterogêneas) que por sua vez causam danos celulares e teciduais (BAYNES, 2002; JAKUS, 2004; MONNIER, 2005).

Produtos finais de glicação avançada (AGEs) são descritos como moléculas formadas a partir de interações de natureza não enzimática originadas de aminocarbonilo (açúcar redutores ou lipídeos oxidados) e de proteínas (aminofosfolídeos ou ácidos nucleicos) (HENLE, 2003; AHMED, 2005). Como os AGEs possuem alta capacidade de modificar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas, através da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou da interação com receptores celulares, estes tem efeitos patológicos, gerando radicais livres: promovendo estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (BIERHAUS, 1998; MONNIER, 2003; AHMED, 2005; HUEBSCHMANN, 2006)

São descritos três mecanismos básicos por meio dos quais os AGEs agem provocando danos celulares: 1) modificação das estruturas intracelulares; 2) interação dos AGEs com as proteínas da matriz extracelular, modificando a sinalização entre as moléculas da matriz e a célula; 3) a modificação das proteínas e dos lipídeos séricos responsáveis pelas reações inflamatórias e pelos fatores de crescimento, contribuindo assim, para o surgimento de doenças vasculares (MONNIER, 2003; BROWNLEE, 2005).

A quantidade de AGEs num organismo reflete o balanço cinético entre a formação/ingestão de AGEs e a taxa de degradação/eliminação destes (JAKUS, 2004). A eliminação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) ocorre por duas vias: proteólise extracelular ou por células “scavenger” (macrófagos teciduais). Estes produtos finais da glicação avançada serão finalmente excretados pelos rins (MONNIER, 2003; KIM, 2005; LAPOLLA, 2005).

O Pimagedine (aminoguanidina) ( $\text{CH}_6\text{N}_4$ ) é um dos derivados da guanidina, com muitas propriedades em comum com a hidrazina (LIEBER, 1939; NILSSON, 1999). A aminoguanidina se liga aos grupos carbonila reativos dos produtos de Amadori, formados durante a reação de Maillard, evitando assim a formação de AGEs (MÉNDEZ, 2003). Neste sentido sabe-se que a aminoguanidina é um agente anti-AGE que previne a formação de ROS (Reactive Oxygen Species) e peroxidação lipídica nas células, o qual tem se

mostrado eficaz na terapia contra a formação de placas de aterosclerose em vasos sanguíneos de ratos diabéticos (CORMAN et al., 1998; FORBES et al., 2005).

### **Fígado**

O fígado é um órgão que está situado na cavidade abdominal logo abaixo do diafragma. Recebe 70% do sangue do corpo, que por ele circula por meio da veia porta, trazendo consigo todo o material absorvido pelos intestinos. O restante do sangue entra no fígado pela artéria hepática (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Ele é uma glândula anexa do sistema digestório, responsável pelo armazenamento e metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, bem como pela captação e pela transformação de metabólitos advindos de outras partes do organismo (OLIVEIRA, 2006). De acordo com Hinton e Laurén (1990), o fígado é, também, o órgão responsável pela detoxificação de compostos xenobióticos sendo, portanto, vital para o metabolismo e excreção dos mesmos.

Nos mamíferos, o fígado tem um papel fundamental no metabolismo dos carboidratos, uma vez que a glicose que entra nos hepatócitos pode ser convertida em subprodutos como a glicose-6-fosfato e o piruvato, e principalmente, ser armazenada na forma de glicogênio (LEHNINGER, 2004).

Morfologicamente o fígado é constituído por hepatócitos que estão arranjados em cordões ou em placas hepáticas que se anastomosam e irão formar os lóbulos hepáticos. Os lóbulos são separados em algumas regiões por vasos sanguíneos e linfáticos bem como por tecido conjuntivo. Arteríolas, vênulas e ductos biliares vão também formar o chamado “espaço porta”. Ao microscópio de luz, os hepatócitos são células poligonais com um ou dois núcleos centrais e arredondados, um ou dois nucléolos bem evidentes, e são células que estão em contato com a parede de capilares sinusóides, (células endoteliais) e com as células de Kupffer (macrófagos hepáticos), que possuem núcleo oval ou triangular e nucléolo bem evidente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

### **Tireoide**

A tireoide é um órgão importante no metabolismo dos vertebrados, pois sintetiza os hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), que controlam a taxa de metabolismo do corpo, via atuação sobre as mitocôndrias. Ela é uma

glândula endócrina, formada por dois lóbulos que se unem por um istmo ocupando a região cervical anterior à laringe. Cada lóbulo tireoidiano é composto por uma extensa rede de capilares sangüíneos fenestrados, bem como por milhares de folículos tireoidianos, formados por um epitélio simples cúbico que delimita uma cavidade repleta de colóide, ou também denominado, pré-hormônio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

### **Sistema Circulatório**

Os vasos sangüíneos são formados por células endoteliais que além de terem função estrutural, também são responsáveis pela síntese, pelo metabolismo e pela liberação de grande variedade de substâncias que regulam o tônus e a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e a atividade plaquetária e leucocitária (ZANESCO e ANTUNES, 2005). Essas substâncias produzidas pelas células endoteliais estão divididas em agentes vasodilatadores e vasoconstritores. Dentre estas substâncias, o óxido nítrico (NO) tem merecido atenção especial por participar nos mecanismos de vasodilatação. Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo (IGNARRO, 1988).

As células endoteliais são características também pela sua sensibilidade a estímulos químicos como a acetilcolina, bradicinina e histamina, bem como aos estímulos físicos. As forças físicas quando aplicadas resultam na variação do fluxo sanguíneo, importante estímulo para a célula endotelial produzir NO, como o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), os quais levam à vasodilatação. A capacidade das células endoteliais de captar e responder às mudanças no fluxo sanguíneo é um fator essencial na regulação do tônus vascular, e envolve a ativação de fatores de crescimento celular, promovendo o remodelamento da parede arterial e a manutenção da integridade do endotélio (FISHER et al., 2001; HIGASHI e YOSHIZUMI, 2004; KOJDA e HAMBRECHT, 2005).

Sabe-se que o exercício físico aumenta o fluxo sangüíneo pulsátil. A pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular e a força de cisalhamento sob as células endoteliais, considerados estímulos poderosos para a geração de NO no sistema vascular. Dessa forma, um dos efeitos benéficos do exercício físico regular está estreitamente relacionado à capacidade de estimular a síntese de NO pelas células endoteliais (DELP et al.,

1993; WANG et al., 1993; SESSA et al., 1994; SHEN et al., 1994; WOODMAN et al., 1997, KINGWELL, 2000).

Diversos autores têm demonstrado também uma associação direta entre o aumento na produção de moléculas reativas de oxigênio (EROs) pelas células endoteliais e as diversas doenças humanas, incluindo-se entre elas: diabetes mellitus, câncer, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, aterosclerose, síndrome da isquemia/reperfusão, artrite reumatóide, bem como o próprio envelhecimento (HALIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992; ASHARAF; ZHAI, 1995; FREDERIKS; KOOJI; BOSCH, 1995; GARCIA-VALDECASAS et al., 1995; OREDSSON; PLATE; QVARFORDT, 1995).

*Objetivos*

---

## **2. OBJETIVOS**

Diante das informações, o presente estudo teve como objetivo fornecer dados citológicos, histológicos e histoquímicos de fígados e das tireoides, retirados de ratos Wistar diabéticos em diferentes tratamentos visando avaliar o potencial de ação dessa substância e detectando possíveis alterações causadas decorrentes do uso de Pimagedine (aminoguanidina).



# *Material e Métodos*

---

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### Obtenção dos Indivíduos

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 25 ratos machos, albinos (Wistar), com peso entre 180 e 200gr, adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, SP, Brasil e mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, em condições controladas ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 50% de umidade, e fotoperíodo de 12h). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas coletivas (três animais em cada) e com água e a ração comercial Purina (Campinas, SP, Brasil) *Ad libitum*.

#### Indução do Diabetes tipo 1

Os animais que passaram pelo processo de indução ao diabetes permaneceram em jejum durante 18 horas. Após este período estes receberam injeção única (via intraperitoneal) de estreptozotocina (Sigma-Aldrich CO, Saint Louis, MO, EUA) na concentração de 60 mg/kg diluída em buffer citrato 0.1M e pH 4.5 (STOPPA et al., 2006).

#### Aminoguanidina

A aminoguanidina (AG) (Sigma-Aldrich CO, Saint Louis, MO, EUA) foi administrada via água de beber contendo solução de 0.1% (1g/L) de AG (CORMAN et al., 1998) durante 8 semanas após a indução ao diabetes.

#### Modelo Experimental

Os animais analisados foram divididos em cinco grupos:

**Controle sedentário (C/SD):** ratos sedentários.

**Diabético tipo 1 sedentário (DB/SD):** ratos sedentários induzidos ao diabetes tipo 1.

**Diabético tipo 1 treinado (DB/TR):** ratos induzidos ao diabetes e submetidos ao treinamento físico.

**Diabético tipo 1 sedentário e tratado com aminoguanidina (DB/SD-AG):** ratos sedentários induzidos ao diabetes e tratados com aminoguanidina.

**Diabético tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (DB/TR-AG):** ratos induzidos ao diabetes e submetidos ao treinamento físico e tratados com aminoguanidina.

### **Programa de Treinamento**

O treinamento físico escolhido foi o de corrida em esteira ergométrica. Na primeira semana, os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira e à velocidade, que consistiu de aumentos progressivos, variando de 5m/min (no primeiro dia) até 10m/min (no quinto dia da semana). Progressivamente, a velocidade e o tempo de duração das sessões foram aumentados, até que os animais conseguissem permanecer correndo por 60 minutos. Somente os animais adaptados a esta atividade foram selecionados e utilizados neste estudo.

Na segunda semana, o treinamento físico foi iniciado com velocidade de 10m/min, aumentando-se progressivamente conforme o grupo de animais até atingir a velocidade final correspondente à máxima fase estável de lactato (MFEL) estabelecida anteriormente para ratos. Um grupo de ratos diabéticos foi induzido especialmente para a determinação da intensidade de treinamento. Esta é definida como a mais alta intensidade de trabalho que pode ser mantida sem o acúmulo contínuo de lactato sanguíneo, onde o metabolismo aeróbio prevalece sobre o anaeróbio, sendo assim um importante marcador da capacidade aeróbia (BILLAT et AL., 2003; SVEDAHL e MacINTOSH, 2003). O lactato sanguíneo é um indicador da transição de metabolismo e autores consideram a concentração de 4,0 mmol/L como um marcador do início de acúmulo de lactato (HECK et al, 1985; MANCHADO et al., 2005). Os animais apresentaram estabilização na concentração de lactato nas velocidades 10 m/min ( $3,3 \pm 0,3$  mmol/L) e 15 m/min ( $3,6 \pm 0,3$  mmol/L). No entanto, observou-se crescente acúmulo de lactato na velocidade de 20 m/min ( $6,0 \pm 1,1$  mmol/L). Considerando a definição de MFEL utilizamos a velocidade de 15 m/min para o treinamento físico, 5 dias/semana, 60 minutos cada sessão, por 8 semanas, durante o período da manhã.

Ao término do período total de treinamento, os animais em jejum de 12 horas foram mantidos em repouso por 48 horas. A seguir os mesmos foram anestesiados com 30 mg/Kg de tiopental sódico intraperitoneal e realizou-se

uma incisão longitudinal no abdômen para coleta de amostra de sangue arterial (7 mL), obtida do ramo descendente da artéria aorta. Em seguida, os animais foram sacrificados por exsanguinamento sob anestesia.

Este projeto foi submetido à análise pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP Instituto de Biologia (IB) e obteve aprovação (protocolo número 1753-1).

### **Morfologia**

#### **Histologia**

Todos os animais (tratamento e controle), após o sacrifício, foram colocados em placas de cera para serem dissecados. Os fígados e as tireoides foram retirados e fragmentos destes foram fixados em solução contendo paraformaldeído a 4% por 24 horas. A seguir, o material foi colocado em tampão fosfato 10 % (0.1M pH 7.4) onde permaneceu por mais 24 horas. Logo após, procedeu-se a desidratação em soluções crescentes de etanol a 70, 80, 90 e 95% durante 30 minutos cada banho e a transferência para solução de resina JB4 Polaron Instruments/ Bio Rad, na ausência de catalisador por 24 horas.

Após esses procedimentos, os fragmentos dos órgãos foram transferidos para moldes plásticos previamente preenchidos com resina contendo catalisador e colocados em estufa para polimerização.

#### **Técnica da Hematoxilina de Harris e Eosina Aquosa, segundo Junqueira e Junqueira (1983).**

Os blocos contendo o material foram seccionados com 3 µm de espessura em micrótomo Sorvall JB4/ Bio Rad. Os cortes foram hidratados e recolhidos em lâminas de vidro previamente limpas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris e eosina aquosa (HE), conforme rotina histológica, para observação e documentação fotográfica.

#### **Histoquímica**

**Técnica do PAS para detecção de polissacarídeos, segundo Junqueira e Junqueira (1983).**

Fragmentos do fígado e da tireoide foram fixados em Bouin aquoso por 24h. As lâminas contendo as secções permaneceram por 10 minutos em solução de ácido periódico 0.4%, foram lavadas rapidamente em água destilada e submetidas ao reagente de Schiff durante 1h, no escuro. Posteriormente, foram realizadas três lavagens em água sulfurosa por 3 minutos cada e, a seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 30 minutos. Após secagem, as lâminas contendo as secções foram diafanizadas em xilol e montadas com Bálsamo do Canadá.

**Técnica do azul de bromofenol para detecção de proteínas, segundo Pearse (1985).**

Fragmentos do fígado e da tireoide foram fixados em paraformaldeído 4% e NaCl 0.9% em tampão fosfato 10% (0.1M – pH 7.4) por aproximadamente 24 horas. Todas as lâminas contendo as secções foram coradas com solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente durante 2 horas, sendo em seguida, banhados em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos. Logo após, as lâminas foram passadas no álcool butílico terciário por 5 minutos, e em seguida, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá.

**Técnica de Baker para detecção de lipídios, segundo Baker (1946):**

Fragmentos da tireoide foram fixados em formol cálcio por 15 horas. Para este teste histoquímico, todas as lâminas foram tratadas por 18 horas com bicromato de cálcio. Na sequência foram lavadas em água destilada, e colocadas em solução de hemateína durante 5 horas. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente e rapidamente diferenciadas pela mistura de Weigert. Logo depois, ocorreu a última lavagem em água destilada. Após a secagem, as lâminas foram montadas com glicerina e recobertas com lamínula.

Todas as lâminas foram observadas e fotografadas com auxílio de fotomicroscópio MOTIC BA 300, acoplado a microcomputador INTEL.

*Resultados*

---

---

#### **4. RESULTADOS**

Na dissertação, os resultados obtidos estão apresentados sob a forma de capítulos onde cada um deles contém um artigo em fase de preparação para submissão em periódico internacional especializado na área. Cada artigo traz os resultados da análise dos diferentes órgãos obtidos a partir de ratos diabéticos (controle, tratados com aminoguanidina e submetido a programa de exercício físico).

Desta forma, a dissertação está composta por dois capítulos:

##### **Capítulo 1:**

MEIRA-NICO, E.T; Delbin, M.A; Zanesco, A.; Oliveira, P.R.; Camargo-Mathias, M.I.; **Ação da Aminoguanidina sobre o Fígado de Ratos Diabéticos Treinados**

##### **Capítulo 2:**

MEIRA-NICO, E.T; Delbin, M.A; Zanesco, A.; Oliveira, P.R.; Camargo-Mathias, M.I.; **Ação da Aminoguanidina sobre a Tireoide de Ratos Diabéticos Treinados.**

# *Capítulo 1*

---



**3.1 Capítulo 1****Título:****AÇÃO DA AMINOGUANIDINA SOBRE O FÍGADO DE RATOS  
DIABÉTICOS TREINADOS****Autores:** Edmara Tereza Meira e Nico; Maria Andréia Delbin, Angelina Zanesco, Patrícia Rosa de Oliveira, Maria Izabel Camargo Mathias\*.

UNESP, Avenida 24 A, nº 1515 –Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro –  
SP – Brasil.

\*Autor correspondente: Tel.: +55-19-35264135, Fax: +55-19-35264136. E-mail:  
micm@rc.unesp.br.

**RESUMO**

O presente estudo analisou o fígado de ratos diabéticos submetidos ao exercício físico e tratados com aminoguanidina, fazendo o uso de técnicas histológicas e histoquímicas, para detectar possíveis alterações provocadas por este químico em animais tratados com medicamentos que o tenham na sua composição. Os ratos utilizados neste estudo foram divididos em cinco grupos: Controle sedentário (**C/SD**), Diabético tipo 1 sedentário (**DB/SD**), Diabético tipo 1 treinado (**DB/TR**), Diabético tipo 1 sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**), Diabético tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (**DB/TR-AG**). Os resultados não demonstraram ação da aminoguanidina sobre o tecido hepático, entretanto houve melhora com o treinamento físico mostrando alterações citológicas, morfohistológicas e histoquímicas nos indivíduos diabéticos (treinados e/ou tratados) que foram comparadas aqueles indivíduos do grupo controle sedentário e diabético sedentário. As alterações variaram desde: (1) hipertrofia dos hepatócitos, (2) presença e distribuição de polissacarídeos no citoplasma dos hepatócitos e, principalmente, (3) congestão dos capilares sinusóides hepáticos, o que permitiu sugerir que a aminoguanidina não é hepatotóxica, quando utilizada na dosagem 1g/L para o tratamento das complicações do diabetes, bem como confirmou que a prática moderada de exercícios físicos amenizou os prejuízos oriundos do diabetes (aumentando a utilização de glicose pelas células musculares) sem a utilização de insulina.

**Palavras chave:** aminoguanidina; diabetes tipo 1; fígado de ratos; exercício físico.

**ABSTRACT**

This study examined the liver of diabetic rats subjected to the physical exercise and treated with aminoguanidine, using histological and histochemical techniques to detect possible changes caused by this chemical in individuals treated with drugs that have it in their composition. The rats used in this study were divided into five groups: sedentary control (**C/SD**), sedentary diabetic (**DB/SD**), trained diabetic (**DB/TR**), sedentary diabetic and treated with aminoguanidine (**DB/SD-AG**), trained diabetic and treated with aminoguanidine (**DB/TR-AG**). The results showed no effect of aminoguanidine on the liver tissue, although there was improvement with exercise training showing cytologic, and immunohistochemical morfohistológicas in diabetic subjects (trained and/or treated) were compared to those individuals in the sedentary control and sedentary diabetic. The changes found ranged from: (1) hepatocytes hypertrophy, (2) presence and distribution of polysaccharides in the hepatocytes cytoplasm and, especially, (3) congestion of the liver blood vessels, leading to suggest that aminoguanidine is not hepatotoxic, when used at dosage of 1g/L for the treatment of diabetes complications, and confirmed that the practice of moderate physical exercise alleviated the damage caused by diabetes (increased glucose utilization by muscle cells) without the use of insulin.

**Keywords:** aminoguanidine, diabetes type 1, rat's liver, exercise.

## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que acomete diversos órgãos. Em recentes pesquisas, foi considerado o quinto maior causador de morte no mundo (KNOWLER, 2009), sendo caracterizado pela falta ou pela secreção deficiente do hormônio insulina ou ainda devido à resistência periférica a este, afetando o metabolismo de carboidratos, de lipídios e de proteínas e resultando em hiperglicemia e glicosúria (PETERSEN, 2002).

Exercícios físicos regulares induzem mudanças estruturais e funcionais que aumentam o metabolismo do organismo (CORIGLIANO, 2006). Durante o exercício físico há a utilização de várias fontes de energia, incluindo o glicogênio dos músculos e do fígado, bem como os triglicerídeos armazenados no tecido adiposo. A principal fonte de energia utilizada durante os primeiros 20 ou 30 minutos de prática de um exercício físico de intensidade moderada é o glicogênio. Após esse período, torna-se predominante a oxidação de lipídios (CORIGLIANO, 2006; ARKINSTALL, 2004).

Exercícios físicos de intensidade moderada seriam recomendados para melhorar o controle metabólico de diabéticos, particularmente daqueles resistentes à insulina, exceto no caso de contra-indicações (OSTERGARD, 2007). Por si só, o treinamento físico melhora a captação de glicose pelas células e aumenta a glicogênese promovendo, ao mesmo tempo, adaptações no músculo esquelético que estimulam o aumento da utilização de lipídios (CORIGLIANO, 2006).

A prática de exercícios físicos traz resultados visíveis tais como a queda na secreção de insulina e o aumento na de glucagon, devido à atividade do sistema nervoso simpático, o qual inerva diretamente as ilhotas de Langerhans (porção endócrina do pâncreas), via receptores alfa adrenérgicos (predominantemente) (LUCIANO, 1991).

Dessa forma, o exercício físico seria um dos responsáveis pela queda da secreção de insulina e pelo aumento da secreção de glucagon, superando até mesmo estímulos metabólicos como a glicemia que, ou não se alteraria, ou poderia estar elevada no exercício prolongado (LUCIANO, 1991).

Dados da literatura demonstraram a ocorrência de efeito benéfico do treinamento físico sobre o DM, ou por um aumento na sensibilidade à insulina, ou pelo efeito na sua secreção (TANCREDE et al., 1982 apud LUCIANO, 1991).

O processo de secreção da insulina pelas células pancreáticas é modulado por vários fatores incluindo nutrientes, neurotransmissores, bem como outros hormônios. O principal fator estimulante para a secreção da insulina é a glicose, único nutriente, *in vitro*, que promove (sozinho) a liberação de insulina (GUYTON, 2011).

O efeito mais importante da insulina no organismo é o de promover o transporte da glicose para o interior das células, em especial, das células musculares, adiposas e hepáticas (GUYTON, 2011). Já a deficiência de insulina pode causar, entre outras conseqüências, a diminuição na capacidade de sintetizar e acumular glicogênio no fígado (LUCIANO, 1991).

Desta forma, a insulina, por ser um hormônio trófico, favorece o armazenamento dos substratos e a manutenção dos tecidos. Em valores normais de glicemia (entre 75 e 100mg/mL) e na ausência de insulina, o tecido nervoso seria o único que conseguiria utilizar a glicose circulante em quantidades suficientes para manutenção das suas necessidades metabólicas. A presença da insulina seria então necessária para garantir a entrada de quantidades adequadas de glicose nas demais células. Independente da causa, a falta da insulina alteraria o metabolismo dos glicídios, lipídios e das proteínas nos organismos (NADEU e PERONNET, 1985).

Segundo estudos de diversos autores, a ocorrência de danos vasculares em indivíduos diabéticos estaria relacionada à formação de AGEs (advanced glycation end products), moléculas formadas a partir da glicação (interações aminocarbonilo – natureza não enzimática) de proteínas e de lipídios em decorrência da hiperglicemia podendo estes se ligarem as paredes dos vasos sanguíneos (DEVANGELIO et al., 2007). Neste sentido sabe-se que a aminoguanidina seria um agente anti-AGEs, o qual teria se mostrado eficaz na terapia contra a formação de placas de aterosclerose em vasos de ratos diabéticos (CORMAN et al., 1998;).

A aminoguanidina previne a formação das AGEs devido a presença da hidrazina em sua estrutura química, a qual reage com o glioxal, metilglioxal e 3-

desoxiglicosona (THORNALLEY, 2003). Além dos efeitos sobre a glicação avançada, a aminoguanidina, atua de maneira específica inibindo a atividade da enzima iNOS (óxido nítrico sintetase) reduzindo o estresse nitrosativo (SZABÓ, 1997).

O fígado é uma glândula anexa ao sistema digestório, responsável pelo armazenamento e metabolismo de nutrientes absorvidos pelo intestino, tais como lipídios, proteínas e carboidratos, bem como pela captação e transformação de metabólitos advindos de diversas partes do organismo (OLIVEIRA, 2006). De acordo com Hinton e Laurén (1990), o fígado é também o órgão responsável pela detoxificação de compostos xenobióticos, sendo um órgão essencial tanto para o metabolismo quanto para a excreção dos mesmos.

Desta forma e diante das informações acima expostas, o presente estudo teve como objetivo analisar por meio da utilização de técnicas citológicas, histológicas e histoquímicas, fragmentos de fígados de ratos diabéticos submetidos tanto ao tratamento com aminoguanidina quanto ao exercício físico, detectando o potencial de ação dessa substância, bem como detectando possíveis comprometimentos que este químico poderia causar nos indivíduos tratados com medicamentos que o tivessem na sua composição.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados 25 ratos machos, albinos (Wistar), com peso entre 180 e 200g, adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, SP, Brasil e mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, em condições controladas (22°C ± 2°C, 50% de umidade, e foto período de 12h). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas (três animais/ caixa) e tiveram água e a ração comercial Purina (Campinas, SP, Brasil) *Ad libitum*.

### **2.2 Indução do Diabetes**

Os animais que foram induzidos ao diabetes tipo 1 permaneceram em jejum por 18 horas e após este período receberam dose única (intrapertoneal) de estreptozotocina (Sigma-Aldrich CO, Saint Louis, MO, EUA) na

concentração de 60mg/kg diluída em buffer citrato 0.1M e pH 4.5 (STOPPA et al., 2006).

### **2.3 Obtenção da Pimagedine (Aminoguanidina)**

A aminoguanidina (AG) (Sigma-Aldrich CO, Saint Louis, MO, EUA) foi administrada via água de beber em solução de 0.1% (1g/L) de AG (CORMAN et al., 1998) durante 8 semanas após a indução do diabetes.

### **2.4 Modelo Experimental**

Os ratos a serem estudados foram divididos em cinco grupos: Controle sedentário (**C/SD**), Diabético tipo 1 sedentário (**DB/SD**), Diabético tipo 1 treinado (**DB/TR**), Diabético tipo 1 sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**), Diabético tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (**DB/TR-AG**).

### **2.5 Programa de Exercício Físico**

O treinamento físico escolhido foi o de corrida em esteira ergométrica. Na primeira semana, os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira e à velocidade que consistiu de aumentos progressivos variando de 5 (no primeiro dia) até 10m/min (no quinto dia da semana). Progressivamente, a velocidade e o tempo de duração das sessões foram aumentados até que os animais conseguissem permanecer correndo por 60 minutos. Somente os animais adaptados a esta atividade foram selecionados e utilizados neste estudo.

Na segunda semana, o treinamento físico foi iniciado com velocidade de 10m/min, aumentando-se progressivamente conforme o grupo de animais até atingir a velocidade final correspondente à máxima fase estável de lactato (MFEL) estabelecida anteriormente para ratos. Um grupo de ratos diabéticos foi induzido especialmente para a determinação da intensidade de treinamento. A intensidade do treinamento em esteira para os animais diabéticos tipo 1 foi determinada através da realização do teste de MFEL. Esta é definida como a mais alta intensidade de trabalho que pode ser mantida sem o acúmulo contínuo de lactato sanguíneo, onde o metabolismo aeróbio prepondera sobre o anaeróbio, sendo um importante marcador da capacidade aeróbia (BILLAT et al., 2003; SVEDAHL e MacINTOSH, 2003). O lactato sanguíneo é um indicador da transição de metabolismo e autores consideram a concentração de 4,0 mmol/L como um marcador do início de acúmulo de lactato (HECK et al., 1985;

MANCHADO et al., 2005). Os animais apresentaram estabilização na concentração de lactato nas velocidades 10 m/min ( $3,3 \pm 0,3$  mmol/L) e 15 m/min ( $3,6 \pm 0,3$  mmol/L). No entanto, observou-se crescente acúmulo de lactato na velocidade de 20 m/min ( $6,0 \pm 1,1$  mmol/L). Considerando a definição de MFEL utilizamos a velocidade de 15 m/min para o treinamento físico, 5 dias/semana, 60 minutos cada sessão, por 8 semanas, durante o período da manhã.

Ao término do período total de treinamento, os animais em jejum de 12 horas foram mantidos em repouso por 48 horas. A seguir os mesmos foram anestesiados com 30 mg/Kg de tiopental sódico intraperitoneal e uma incisão longitudinal foi feita no abdômen para coleta de amostra de sangue arterial (7 mL), obtida do ramo descendente da artéria aorta. Em seguida, os animais foram sacrificados por exsanguinamento sob anestesia.

Este projeto foi submetido à análise pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP Instituto de Biologia (IB) e obteve aprovação (protocolo número 1753-1).

## **2.6 Métodos**

### **2.6.1 Histologia**

Após o sacrifício os ratos foram colocados em placas de cera para dissecação. Fragmentos do fígado foram retirados com o auxílio de tesoura e pinça de dissecação, e papel toalha absorvente. Na sequência foram fixados por 24 horas em paraformaldeído a 4% (ou outro fixador quando exigido pela técnica), transferido para tampão fosfato 10 % (0.1M pH 7.4) por mais 24 horas. A seguir, foram desidratados em soluções crescentes de etanol a 70, 80, 90 e 95% durante 30 minutos cada banho, embebidos em resina Leica por 24 horas e transferidos para moldes plásticos que posteriormente foram preenchidos com resina polimerizada Leica. Após a polimerização da resina, todos os blocos contendo o material foram seccionados em espessura de 3µm e corados com hematoxilina e eosina. O material foi examinado em fotomicroscópio Motic BA300.

### **2.6.2 Histoquímica**

Visando detectar a presença, a frequência e a distribuição de componentes proteicos e polissacarídicos nos fígados dos ratos aqui



estudados, após a eutanásia procederam-se a retirada de fragmentos dos fígados os quais foram submetidos às seguintes técnicas histoquímicas:

**Técnica do Azul de Bromofenol para Detecção de Proteínas (Segundo PEARSE, 1985):**

Os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas. As secções obtidas foram coradas com azul de bromofenol por duas horas em temperatura ambiente. Após serem lavadas com ácido acético 0.5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos, as mesmas foram rapidamente passadas por solução de álcool butílico terciário. A seguir, foram secas ao ar, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá.

**Técnica do PAS para Detecção de Polissacarídeos (Segundo JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983):**

Fragmentos dos fígados foram fixados em Bouin aquoso por 24h. As lâminas contendo as secções permaneceram por 10 minutos em solução de ácido periódico 0.4%, foram lavadas rapidamente em água destilada e submetidas ao reagente de Schiff durante 1h, no escuro. Posteriormente, realizou-se três lavagens em água sulfurosa por 3 minutos cada e, a seguir, as lâminas foram lavadas por 30 minutos em água corrente. Após secagem, as lâminas contendo as secções foram diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá.

Todas as lâminas foram observadas e fotografadas em fotomicroscópio MOTIC BA 300, acoplado a microcomputador INTEL.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1. Histologia do Fígado**

Os resultados obtidos no presente estudo mostram as alterações citológicas nas células hepáticas obtidas de ratos induzidos ao diabetes, submetidos a exercício físico em esteira e ao tratamento com aminoguanidina.

##### **- Grupo Controle Sedentário (C/SD)**

Os resultados revelaram que o fígado dos indivíduos do grupo C/SD. Os hepatócitos poligonais estão organizados formando extensas placas anastomosadas. O citoplasma destas células é pouco acidófilo apresentando reduzida quantidade de componentes básicos (Fig. 1A). Os hepatócitos apresentam um ou dois núcleos grandes, centrais, arredondados e fortemente

corados pela hematoxilina. Em alguns hepatócitos ainda é possível observar a presença de um ou mais nucléolos (Fig. 1A).

Entre as placas de hepatócitos existem numerosos capilares hepáticos sinusóides, em cuja parede encontra-se aderidas as células de Kupffer, observadas na microscopia de luz pela presença de seus núcleos alongados e/ou triangulares e fortemente corados (Fig. 1A).

#### **- Grupo Diabético tipo 1 Sedentário (DB/SD)**

As alterações encontradas no fígado dos indivíduos deste grupo evidenciam as modificações morfofisiológicas causadas pela diabetes. Os hepatócitos estão menores, assim como seus núcleos. O citoplasma apresenta-se mais acidófilo, ou seja, com elevada quantidade de componentes básicos (Fig. 1B).

Os núcleos das células de Kupffer apresentam a mesma morfologia observada nos indivíduos do grupo controle sedentário (Fig. 1B).

#### **- Grupo Diabético tipo 1 Treinado (DB/TR)**

Os indivíduos desse grupo, ao contrário do observado nos grupos anteriores, apresentam os hepatócitos hipertrofiados. Os núcleos destes também estão maiores e com nucléolos evidentes. O citoplasma dos hepatócitos se apresenta homogêneo e acidófilo (Fig. 1C). Alguma vacuolização interplacas é observada nestes indivíduos, ao contrário, dos grupos anteriores (Fig. 1C).

Neste grupo, o lúmen dos capilares sinusóides está repleto de células sanguíneas da linhagem vermelha (hemácias) (Fig. 1C).

#### **- Grupo Diabético tipo 1 Sedentário e Tratado com Aminoguanidina (DB/SD-AG)**

O fígado dos indivíduos (DB/SD-AG) exibe hepatócitos, com tamanho ainda mais aumentado em relação àqueles encontrados no grupo diabético treinado (DB/TR). O núcleo dessas células também está maior e o citoplasma apresenta elevada acidofilia (Fig. 1D).

Observa-se diminuição da presença de vacuolização (espaços intercelulares) ao contrário do que foi observado no grupo diabético treinado (Fig. 1D).

#### **- Grupo Diabético tipo 1 Treinado e Tratado com Aminoguanidina (DB/TR-AG)**

O fígado dos indivíduos treinados e tratados (DB/TR-AG) apresenta alterações histológicas significativas quando comparados àquelas do grupo controle (Fig. 1E).

Neste grupo são observados os hepatócitos mais hipertrofiados, com forma variando de arredondada a ovalada, consequência da hipertrofia dos mesmos (Fig. 1E).

O núcleo dos hepatócitos é grande e os nucléolos são evidentes. Em seu citoplasma são encontrados grânulos acidófilos. Na maioria dos hepatócitos também é verificada a presença de vacúolos citoplasmáticos. Alguns hepatócitos chegam a apresentar extensa vacuolização, principalmente, ao redor do núcleo (Fig. 1E).

Aqui novamente é observada grande vacuolização por entre as placas de hepatócitos, bem como a presença de grande quantidade hemácias (Fig. 1E).

Há diminuição do número de células de Kupffer (observadas pela presença dos núcleos alongados e/ou triangulares) porém, observam-se núcleos atípicos, picnóticos e de tamanho menor (Fig. 1E).

### **3.2. Histoquímica do Fígado**

#### **3.2.1. Detecção de proteínas – Técnica do Azul de Bromofenol**

##### **- Grupo Controle Sedentário (C/SD)**

A aplicação deste teste histoquímico revela forte reação positiva no citoplasma dos hepatócitos dos indivíduos (C/SD) como era de se esperar, indicando a presença de grande quantidade de proteínas. O núcleo de todas as células (hepatócitos e de Kupffer) também reagiu fortemente ao teste (Fig. 2A). Já os espaços interplacas de células hepáticas são negativos ao teste (Fig. 2A).

##### **- Grupo Diabético tipo 1 Sedentário (DB/SD)**

Não houve alterações histoquímicas em relação ao C/SD exceto pelo aumento da presença de hemácias fortemente coradas na luz dos vasos maiores (Fig. 2B).

##### **- Grupo Diabético tipo 1 Treinado (DB/TR)**

Não houve alterações histoquímicas em relação ao grupo controle exceto pelo aumento da presença de hemácias fortemente coradas na luz dos vasos maiores (Fig. 2C).

### **- Grupo Diabético tipo 1 Sedentário e Tratado com Aminoguanidina (DB/SD-AG)**

Não houve alterações histoquímicas em relação ao grupo controle exceto pelo aumento presença de hemácias fortemente coradas na luz dos vasos maiores (Fig. 2D). Há um aumento dos espaços interplacas que são negativos ao teste.

### **- Grupo Diabético tipo 1 Treinado e Tratado com Aminoguanidina (DB/TR-AG)**

Observa-se concentração de material proteico positivo por entre as placas de hepatócitos, bem como concentração de hemácias (Fig. 2E).

## **3.2.2. Detecção de Polissacarídeos Neutros – Técnica do PAS**

### **- Grupo Controle Sedentário (C/SD)**

Este teste histoquímico revela que o fígado dos indivíduos controle apresenta-se positivo para polissacarídeos, os quais estão sob a forma de fina granulação, fortemente positiva, distribuída pelo citoplasma dos hepatócitos com preferência de localização na região periférica das células (Fig. 3A).

Como essa técnica não é específica para demonstração de núcleo, as células de Kupffer (antes identificadas na microscopia de luz pela observação do núcleo) não são evidenciadas, assim como não são os núcleos dos hepatócitos (Fig. 3A).

### **- Grupo Diabético tipo 1 Sedentário (DB/SD)**

Os indivíduos do grupo sedentário (DB/SD) apresentam hepatócitos que reagem fracamente ao teste, ou mesmo não reagem demonstrando a redução na quantidade de polissacarídeos no citoplasma. Somente em algumas regiões do parênquima hepático é observada a presença de granulação grosseira fortemente positiva (Fig. 3B).

### **- Grupo Diabético tipo 1 Treinado (DB/TR)**

O fígado dos indivíduos submetidos ao treinamento exhibe aumento da intensidade de marcação positiva para polissacarídeos sob a forma de granulação mais grosseira: que se concentra preferencialmente em alguns locais das células (periferia das mesmas) (Fig. 3C).

A aplicação deste teste histoquímico mostra também variação na intensidade da reação dependendo da região do órgão. Nas regiões próximas

às veias centro-lobulares, observa-se fraca positividade ao teste, já naquelas mais afastadas observa-se fina granulação fortemente positiva (Fig. 3C).

**- Grupo Diabético tipo 1 Sedentário e Tratado com Aminoguanidina (DB/SD-AG).**

Os indivíduos deste grupo mostram hepatócitos com reação semelhante àquela observada no grupo diabético sedentário (DB/SD), ou seja, com fraca positividade citoplasmática e granulação grosseira fortemente positiva em algumas regiões (Fig. 3D).

**- Grupo Diabético tipo 1 Treinado e Tratado com Aminoguanidina (DB/TR-AG).**

O fígado dos indivíduos treinados e tratados (DB/TR-AG) apresentam a mesma distribuição de polissacarídeo observada no fígado dos indivíduos do grupo DB/TR: com granulações polissacarídicas positivas distribuídas em grande quantidade por todo o citoplasma dos hepatócitos (Fig. 3E).

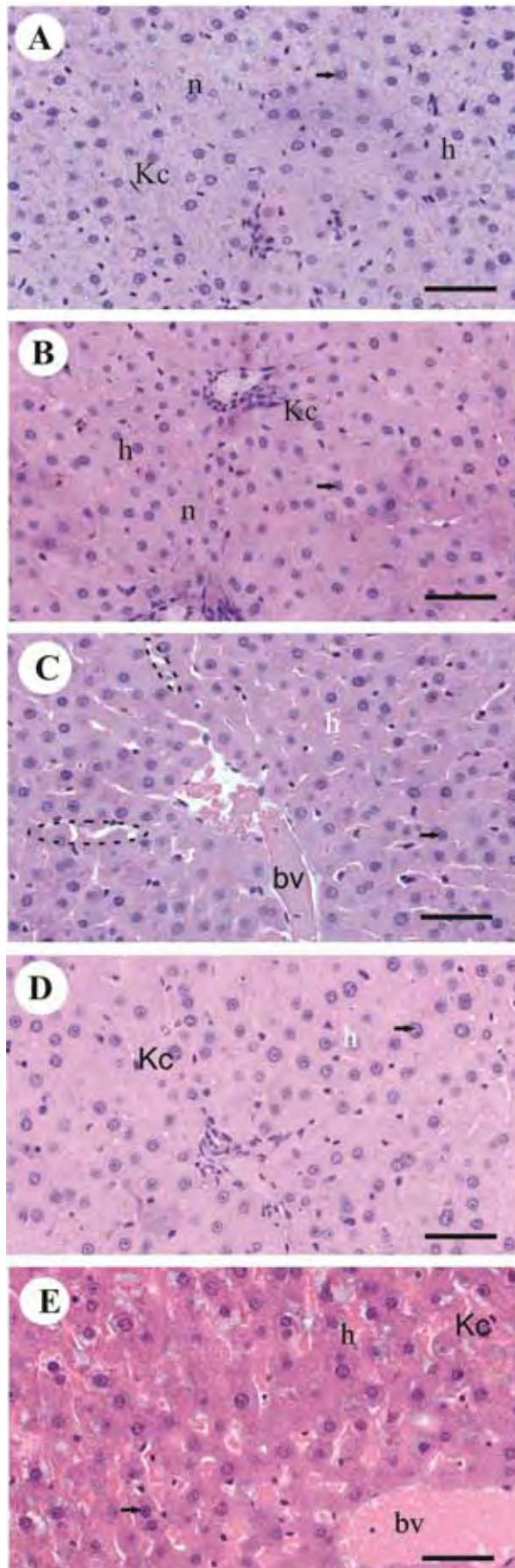
Os resultados obtidos estão representados na Tabela 1.

**Figura 1. A-E.** Secções histológicas de fígados de ratos. Coloração pela hematoxilina e eosina (HE) **A.** Grupo Controle Sedentário (**C/SD**). **B.** Grupo Diabético tipo 1 Sedentário (**DB/SD**). **C.** Grupo Diabético tipo 1 Treinado (**DB/TR**). **D.** Grupo Diabético tipo 1 Sedentário e Tratado com Aminoguanidina (**DB/SD-AG**). **E.** Grupo Diabético tipo 1 Treinado e Tratado com Aminoguanidina (**DB/TR-AG**).

c= capilares sinusóides, h=hepatócitos, Kc= células de Kupffer, n= núcleo de hepatócito; bv= vasos sanguíneos, linha pontilhada=espaço interplacas, seta= nucléolo.

**Barra de escala:** A-E=0.02 mm.

1



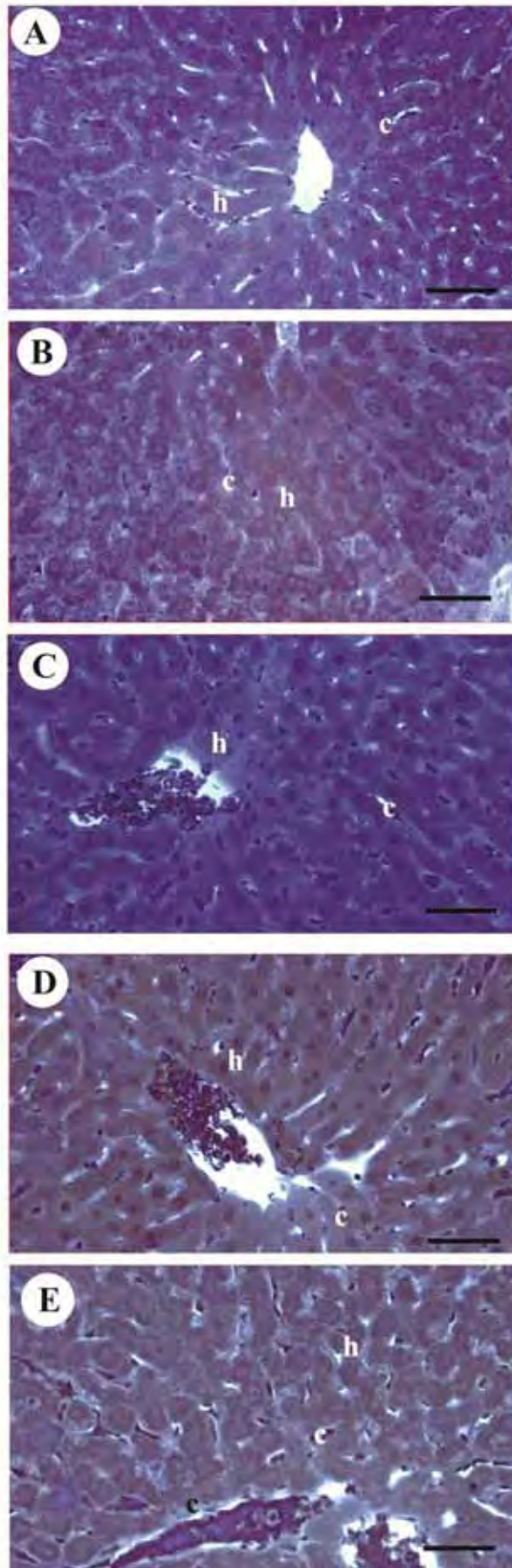
**Figura 2. A-E.** Secções histológicas de fígados de ratos. Coloração pelo azul de bromofenol para detectar proteínas. **A.** Grupo Controle Sedentário (**C/SD**). **B.** Grupo Diabético tipo 1 Sedentário (**DB/SD**). **C.** Grupo Diabético tipo 1 Treinado (**DB/TR**). **D.** Grupo Diabético tipo 1 Sedentário e Tratado com Aminoguanidina (**DB/SD-AG**). **E.** Grupo Diabético tipo 1 Treinado e Tratado com Aminoguanidina (**DB/TR-AG**).

c= capilares sinusóides, h=hepatócitos, he= hemácias.

**Barra de escala:** A-E=0.02 mm.



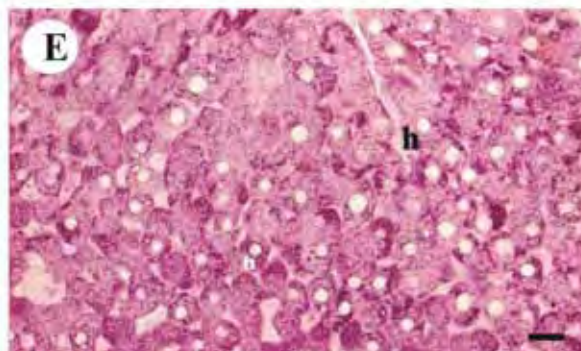
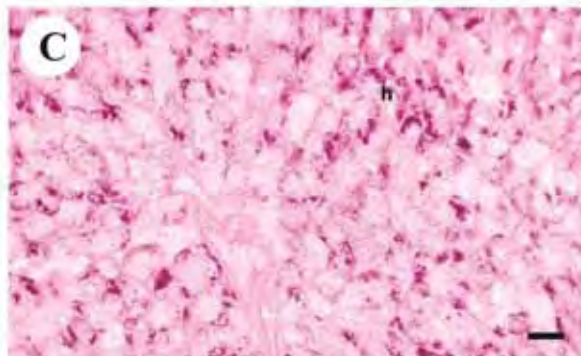
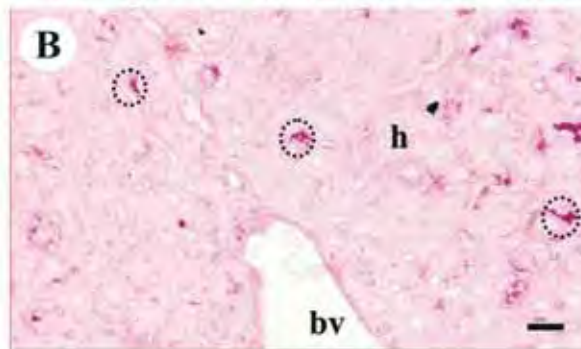
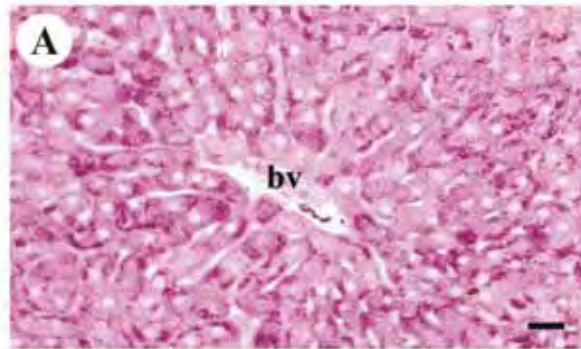
2



**Figura 3. A-E.** Secções histológicas de fígados de ratos. Coloração pelo PAS para detectar polissacarídeos. **A.** Grupo Controle Sedentário (**C/SD**). **B.** Grupo Diabético tipo 1 Sedentário (**DB/SD**). **C.** Grupo Diabético tipo 1 Treinado (**DB/TR**). **D.** Grupo Diabético tipo 1 Sedentário e Tratado com Aminoguanidina (**DB/SD-AG**). **E.** Grupo Diabético tipo 1 Treinado e Tratado com Aminoguanidina (**DB/TR-AG**).  
h=hepatócitos; bv= vasos sanguíneos, linha pontilhada=espaço interplacas,

**Barra de escala:** A-E=0.02 mm.

3



**Tabela 1.** Resultados dos testes histoquímicos aplicados nos fígados de ratos submetidos às seguintes situações: Controle Sedentário (**C/SD**), Diabético Sedentário (**DB/SD**), Diabético Treinado (**DB/TR**), Diabético Sedentário Tratado com Aminoguanidina (**DB/SD-AG**), Diabético Treinado Tratado com Aminoguanidina (**DB/SD-TR**)

Testes histoquímicos	C/SD			DB/SD			DB/TR			DB/SD-AG			DB/TR/AG						
	NH	NK	EI	NH	NK	EI	NH	NK	EI	NH	NK	EI	NH	NK	EI	NH	NK	EI	LV
Azul de Bromofenol	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	++	++	+	+	+++	+	++	+	+++	++	++
PAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+++) fortemente positivo, (++) mediamente positivo, (+) fracamente positivo, (-) negativo, (**NH**) núcleo do hepatócito, (**NK**) núcleo da célula de Kupffer, (**EI**) espaço interplaca, (**LV**) lúmen dos vasos.

## 4 DISCUSSÃO

A hiperglicemia (elevado nível de glicose no sangue), é uma característica encontrada em indivíduos portadores do DM tipos 1 e 2, sendo considerada o fator primário que desencadeia as complicações micro e macrovasculares nesses indivíduos. Tais complicações causam degenerações crônicas como: cardiopatia, nefropatia, retinopatia e neuropatia, as quais afetam a qualidade de vida dos indivíduos (JAKUS, 2004). Dentre as vias conhecidas que levam as lesões vasculares associadas ao DM, aquela de formação endógena dos produtos de glicação avançada, também denominados (AGEs), tem sido considerada atualmente a mais importante (BROWNLEE et al., 1986).

Os AGEs por serem altamente reativos causam danos as células, uma vez que modificam as estruturas intracelulares, devido a interação das AGEs com as proteínas da matriz extracelular (modificando a sinalização celular) bem como, modificando as proteínas ou os lipídios sanguíneos. Dessa forma, os AGEs reagem com diversos compostos presentes no organismos dos indivíduos diabéticos, alterando sua propriedade química e funcional, causando o estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento dos processos inflamatórios (JAKUS, 2004; BIERHAUS, 2005; AHMED, 2005).

O Pimagedine é um composto que previne a formação de AGEs (THORNALLEY, 2003), bem como age como um agente antioxidante prevenindo a formação de ROS (reactive oxygen species – espécies reativas de oxigênio) e a peroxidação lipídica nas células e tecidos (GIARDINO et al., 1998).

No presente estudo foi observado que nos indivíduos do grupo controle sedentário (**C/SD**), o fígado exibiu morfologia e histologia conhecida e já amplamente descrita na literatura de mamíferos (CARVALHO; COLARES-BUZATO, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008), ou seja: parênquima hepático composto por placas de hepatócitos que se anastomosam permeadas por capilares sinusóides e por células de Kupffer (macrófagos hepáticos).

Nos fígados dos indivíduos diabéticos sedentários (**DB/SD**) foram encontradas alterações morfológicas provavelmente causadas pelo diabetes tais como a presença de hepatócitos menores, sugerindo a diminuição do

metabolismo celular hepático, visto que a glicose disponível no sangue não pode ser absorvida pela célula devido à diminuição ou ausência da insulina, dados que corroboraram aqueles obtidos por Remédio et al. (2010), ao estudarem ratos diabéticos da linhagem Wistar.

Nos indivíduos diabéticos e submetidos a treinamento (**DB/TR**), os hepatócitos e os seus núcleos passaram por um processo de hipertrofia o que os tornou aumentados, quando se comparou com os indivíduos do grupo controle (**C/SD**) e diabético sedentário (**DB/SD**). Segundo Rhodes et al (1987) e Teh (1997), a hipertrofia celular (aumento gradativo da área citoplasmática dos hepatócitos) dar-se-ia em função de vários fatores, dentre os quais estariam a ocorrência de sobrecarga metabólica imposta à célula, situação esta que provavelmente ocorreu nos indivíduos deste estudo, o que justificou o inchaço observado nos hepatócitos do fígado dos indivíduos treinados. A mesma situação também foi observada nos ratos do grupo diabético sedentário tratados com aminoguanidina (**DB/SD-AG**).

No fígado dos indivíduos do grupo diabético tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (**DB/TR-AG**) a hipertrofia das células hepáticas persistiu e aqui foram observados os maiores hepatócitos, acompanhado de um aumento no espaço interplacas, sugerindo um efeito positivo e somatização do treinamento e do tratamento com a aminoguanidina nos grupos (**DB/TR**) e no (**DB/SD-AG**), o que levou às maiores alterações observadas em relação ao grupo controle sedentário

No presente estudo o emprego de técnicas histoquímicas, permitiu observar a marcação e a distribuição das proteínas e dos polissacarídeos no fígado dos indivíduos de todos os grupos estudados.

Dessa forma a presença de proteínas no fígado dos indivíduos do grupo controle sedentário (**C/SD**) foi elevada e demonstrada pela forte reação ao azul de bromofenol no citoplasma dos hepatócitos e no núcleo celular. Entre os ratos dos grupos diabéticos, não se observou maiores variações, ou seja, em todos os grupos foi detectada distribuição semelhante àquela encontrada no fígado do grupo controle sedentário (**C/SD**), corroborando dados obtidos por Bond (1980), em ratos diabéticos. No entanto, os resultados são contrários aqueles de Bahnak e Gold (1982), que registraram que a síntese de proteínas nos indivíduos diabéticos seria reduzida, devido ao elevado catabolismo

protéico (quebra de proteína para obtenção de energia quando não há presença de carboidrato).

Os polissacarídeos foram também aqui estudados, os quais exercem importante papel nos hepatócitos, visto que são armazenados na forma de glicogênio. Nos fígados dos indivíduos do grupo controle sedentário (**C/SD**), os polissacarídeos foram observados sob a forma de fina granulação fortemente PAS positiva distribuída por todo o citoplasma. Como o fígado tem a função de intermediar a conversão de energia vinda do alimento e de suprir tecidos extra-hepáticos, sugere-se que ele estaria captando a glicose proveniente da digestão e transformando-a em glicogênio para ser armazenado no hepatócito (LEHNINGER, 2004).

No grupo diabético sedentário (**DB/SD**), ficou evidente a redução de marcação para polissacarídeos na maior parte do citoplasma dos hepatócitos, o que corroborou dados de Vallance-Owen (1952); Whitton e Hems (1975), que também registraram que a hiperglicemia nos indivíduos diabéticos estaria associada à diminuição do glicogênio hepático, devido a um defeito no processo de retenção de glicogênio no fígado. A falta de insulina e o excesso de glucagon, condições típicas de indivíduos diabéticos afetariam o desempenho das enzimas glicogenolíticas e glicogênicas, o que também poderia estar contribuindo para o menor armazenamento de glicogênio pelo fígado (CLORE et al., 1992). Dessa forma, os dados obtidos no presente estudo sugeririam que nos indivíduos diabéticos, as síntese e atuação de enzimas glicogenolíticas e glicogênicas poderiam estar prejudicadas, o que viria a diminuir ou mesmo impedir a síntese de glicogênio ou aumento das suas quebras (lise) no fígado. Essa quebra do glicogênio, em diabéticos, seria um facilitador para a liberação de maior quantidade de polissacarídeos no sangue, elevando ainda mais a hiperglicemia, e gerando ainda mais prejuízos ao fígado e ao organismo como um todo.

Nos ratos do grupo diabético treinado (**DB/TR**), observou-se marcação mais intensa para polissacarídeos no citoplasma dos hepatócitos quando comparada a dos indivíduos do grupo diabético sedentário **DB/SD**, sugerindo que a prática regular e periódica de exercícios físicos melhoraria o processo de acúmulo de glicogênio hepático (re-síntese) (GOBATTO, 1993; LEME et al.,



2007) no fígado dos indivíduos treinados, provavelmente pela menor produção de glicose, com conseqüente redução da hiperglicemia.

Ainda no fígado dos indivíduos desse grupo verificou-se a marcação diferenciada para os polissacarídeos que variou de acordo com a proximidade ou não dos grandes vasos (veias centro lobulares). Os hepatócitos localizados ao redor destes reagiram fracamente ao PAS, sugerindo que os mesmos seriam os primeiros a fornecer o glicogênio durante o exercício físico, diminuindo assim seus estoques. Resultados semelhantes também foram encontrados por Ferranini (1990) em ratos diabéticos.

No fígado dos indivíduos do grupo diabético sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**), foram observadas alterações semelhantes às daquelas do grupo diabético sedentário (**DB/SD**): hepatócitos fracamente positivos ao PAS indicando que a aminoguanidina não interferiu no metabolismo de polissacarídeos os quais ficaram estocados no fígado dos indivíduos diabéticos.

Nos indivíduos diabéticos treinados e tratados (**DB/TR-AG**) foi detectada marcação de polissacarídeos e distribuição semelhante à encontrada no fígado dos indivíduos do grupo **DB/TR**, o que poderia ser justificado pela interferência do treinamento físico e pela ausência da ação da aminoguanidina (já confirmada no grupo anterior), confirmando os benefícios advindos da prática de exercícios físicos moderados por indivíduos diabéticos, já que há elevação do acúmulo de glicogênio hepático. De acordo com Guyton, (2011) a ausência de insulina prejudicaria o transporte da glicose para o interior das células, em especial, das musculares, adiposas e das hepáticas.

Com esses resultados observados no presente estudo que permitiu sugerir que a aminoguanidina não é hepatotóxica, quando utilizada na dosagem 1g/L para o tratamento das complicações do diabetes, bem como confirmou que a prática moderada de exercícios físicos amenizou os prejuízos oriundos do diabetes (aumentando a utilização de glicose pelas células musculares) sem a utilização de insulina.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

ARKINSTALL, M. J.; BRUCE, C. R.; CLARK, S. A; *et al.* Regulation of fuel metabolism by preexercise muscle glycogen content and exercise intensity. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 6, p. 2275-83, 2004.

BAHNAKS, B. R.; GOLD, A. H. Effects of Alloxan Diabetes on the Turnover of Rat Liver Glycogen Synthase,.**Journal of Biological Chemistry** v. 257, n. 15, p. 8775-8780, 1982.

BILLAT, V.; LEPRETRE, P.-M.; HEUGAS, A.-M. *et al.* Training and bioenergetic characteristics in elite male and female Kenyan runners. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 2, p. 297-304; discussion 305-6, 2003.

BIERHAUS,A, HUMPERT, P. M., MORCOS, M. *et al.* Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products **Journal of Molecular Medicine** v83, p 876–886.2005

BROWNLEE, M.; VLISSARA, H.; KOONEY, A.; ULRICH, P.; CERAMI, A. Aminoguanidine Prevents Diabetes-Induced Arterial Wall Protein Cross-Linking. **Science**, v. 232, p. 1629–1632, 1986.

CARVALHO, H. F.; COLARES-BUZATO, C. B. **Células: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005. 495 p.

CLORE, J. N.; POST, E. P.; BAILY, D. J.; NESTLER, J. E.; BLACKARD, W. G. Evidence for increased liver glycogen in patients with noninsulindependent diabetes mellitus after a 3-day fast. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.74, n.3, p. 660-666, 1992.

CORIGLIANO, G.; IAZZETTA, N.; CORIGLIANO, M.; STROLLO, F. Blood glucose changes in diabetic children and adolescents engaged in most common sports activities. **Acta Bio-medica**, v. 77 Suppl 1, p. 26-33, 2006.

CORMAN, B.; DURIEZ, M.; POITEVIN, P. *et al.* Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 3, p. 1301-6, 1998.

DEVANGELIO, E.; SANTILLI, F.; FORMOSO, G. *et al.* Soluble RAGE in type 2 diabetes: association with oxidative stress. **Free radical biology & medicine**, v. 43, n. 4, p. 511-518, 2007.

FERRANNINI, E.; MANFREDINI, G. Influence of Long-Term Diabetes on Liver Glycogen Metabolism in the Rat. **Metabolism**, v. 39, n. 10, p. 1082-1088, 1990.

GIARDINO, I.; FARD, A. K.; HATCHELL, D. L.; BROWNLEE, M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes**, v. 47, n. 7, p. 1114-20, 1998.

GOBATTO, C. A. **Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados**. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. 122p, 1993.

GUYTON, A.C. **Fisiologia Humana**. 12ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 800p.

HECK, H. D. A.; CASANOVA-SCHMITZ, M.; DODD, P. B.; SCHACHTER, E. N.; WITEK, T. J.; TOSUN, T. Formaldehyde (CH<sub>2</sub>O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH<sub>2</sub>O under controlled conditions. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 46, n. 1, p. 1-3. 1985

HINTON, D. E.; LAURÉN D. J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potencial biomarkers of exposure. In: MCCARTHY, J. F., SHUGGART, L. R. **Biom. Of Environ**. Contaimin. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. p. 17-57. 1990.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological research**, v. 53, n. 2, p. 131-42, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U. ; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p. 230-290.

KNOWLER, W. C.; FOWLER, S. E.; HAMMAN, R. F.; CHRISTOPHI, C. A.; HOFFMAN, H. J.; BRENNEMAN, A. T.; BROWN-FRIDAY, J. O.; GOLDBERG, R.; VENDITTI, E.; NATHAN, D. N.; Diabetes prevention program research group 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Programs Outcomes Study . **Lancet**. v. 374, n. 9707, p:1677-1686, 2009.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; Cox, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier. 2004. 1232p.

LEME, J. A., GOMES R. J., de MELLO, M. A., Luciano, E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. **Growth factors**, v. 25, n. 1, p. 9-14, 2007.

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

MANCHADO, F. D.; GOBATTO, C. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M.; MELLO, M. A. R. Journal of Exercise Physiology online. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 8, n. 4, p. 29-35, 2005.

NADEU, M.; PERONNET, F. **Fisiologia Aplicada na Atividade Física**. São Paulo: Manole. 1985. 243 p

OLIVEIRA, L. M. **Histopatologia de fígados de peixes Oreochromis niloticus expostos em águas e sedimentos do rio Guacá – São Sebastião, SP – Impactado pelo vazamento do oleoduto OSBAT**. Monografia do curso de bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Rio Claro – São Paulo, p. 40-46.2006

OSTERGARD, T.; JESSEN, N.; SCHMITZ, O.; MANDARINO, L. J. The effect of exercise, training, and inactivity on insulin sensitivity in diabetics and their relatives: what is new? **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 3, p. 541-8, 2007.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. Livingstone: Churchill, 1985, p.123-214.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 5A, p. 11G-18G, 2002.

REMEDIO, R. N. **Alterações Histoquímicas e ultraestruturais do fígado e intestino grosso de ratos diabéticos tipo I e os efeitos do treinamento físico**. 2010. 56f. Monografia do curso de bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Rio Claro – São Paulo, 2010.

RHODES, L.D., MYERS, M.S., GRONLUND, W.D., MCCAIN, B.B., Epizootic characteristics of hepatic and ranal lesions in English sole, *Parophris vetulus*, from Puget Sound. **Journal Fish Biology**. v. 38, p. 395-407. 1987.

ROSS, M. H., PAWLINA, W. **Histologia Texto e Atlas - em correlação com biologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

STOPPA, G. R.; CESQUINI, M.; ROMAN, E. A F. R.; OGO, S. H.; TORSONI, M. A. Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 12, p. 1352-61, 2006.

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 28, n. 2, p. 299-323, 2003.

SZABÓ, C.; FERRER-SUETA, G.; ZINGARELLI, B. et al., Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9030-6, 1997.

TANCREDE, G.; ROSSEAU-MIGNERON, S.; NADEU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin – induced Diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 31, n. 1, p. 406-409, 1982.

TEH, S. J.; ADAMSB, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51-70, 1997.

THORNALLEY, P. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

VALLANCE OWEN, J. Liver glycogen in diabetes mellitus. **Journal of Clinical Pathology**, v. 5, n. 1, p. 42-53, 1952.

WHITTON, P. D.; HEMS, D. A. Glycogen synthesis in the perfused liver of streptozotocin-diabetic rats. **The Biochemical Journal**, v. 150, n. 2, p. 153-65, 1975.

## *Capítulo 2*

---

---

### **3.2 Capítulo 2**

**Título:**

**AÇÃO DA AMINOGUANIDINA SOBRE A TIREOIDE DE RATOS  
DIABÉTICOS TREINADOS.**

**Autores:** Edmara Tereza Meira e Nico; Maria Andréia Delbin, Angelina Zanesco, Patrícia Rosa de Oliveira, Maria Izabel Camargo Mathias\* .

UNESP, Avenida 24 A, nº 1515 –Cx. Postal 199 – CEP: 13506-900 – Rio Claro – SP  
– Brazil.

\*Autor correspondente: Tel.: +55-19-35264135, Fax: +55-19-35340009. E-mail:  
micm@rc.unesp.br.

**RESUMO**

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que acomete diversos órgãos, sendo considerado o quinto maior causador de morte no mundo e caracterizado pela ausência ou secreção deficiente do hormônio insulina resultando em hiperglicemia e glicosúria. A tireoide é uma glândula endócrina constituída por dois lobos, ligados por um ístmo. Cada lobo tireoidiano está formado por folículos tireoidianos os quais contém colóide (pré-hormônio) no seu interior. O treinamento físico interfere nos efeitos do diabetes, melhorando a captação de glicose pelas células. Assim como o treinamento, é de grande importância o desenvolvimento e o emprego de substâncias anti-AGE como a aminoguanidina, têm se mostrado eficazes na terapia de ratos diabéticos. No presente estudo ratos Wistar foram divididos em cinco grupos: Controle sedentário (**C/SD**), Diabético tipo 1 sedentário (**DB/SD**), Diabético tipo 1 treinado (**DB/TR**), Diabético tipo 1 sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**), Diabético tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (**DB/TR-AG**). Os resultados revelaram alterações citológica, morfo-histológica e histoquímica na tireoide dos indivíduos diabéticos (treinados e/ou tratados) que foram comparadas às encontradas nos indivíduos do grupo controle sedentário e diabético sedentário e se resumem em: (1) mudança da forma dos tireócitos e dos seus núcleos (passaram de cúbicos a pavimentosos), (2) variação na composição química do colóide, (3) marcação e morfologia das células parafoliculares, bem como (4) aumento da irrigação sanguínea no tecido conjuntivo. Dessa forma, conclui-se, a partir dos resultados obtidos que a aminoguanidina interfere na histoquímica da tireoide notando-se interferência também causada pela diabetes e pelo exercício físico.

**Palavras chave:** Aminoguanidina; Diabetes; ratos; treinamento físico; tireoide.

**ABSTRACT**

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder that affects many organs and is considered the fifth major cause of death worldwide and is characterized by absent or deficient secretion of the hormone insulin resulting in hyperglycemia and glycosuria. The thyroid is an endocrine gland consisting of two lobes, connected by an isthmus. Each thyroid lobe is composed of thyroid follicles which contain colloid (pre-hormone) inside. Physical training interferes on the effects of diabetes because these improving glucose to the cells. As the training is of great importance is the development and use of substances such as anti-AGE aminoguanidine, which has proven effective in the treatment of diabetic rats. In this study Wistar rats were divided into five groups: sedentary control (**C/SD**), sedentary diabetic type 1 (**BD/SD**), trained diabetic type 1 (**DB/TR**), sedentary diabetic type 1 and treated with aminoguanidine (**DB/SD-AG**), type 1 diabetes trained and treated with aminoguanidine (**DB/TR-AG**). The results showed cytological changes, morphological and histological and histochemistry of the thyroid in diabetic subjects (trained and/or treated) were compared to those found in control subjects and diabetic sedentary sedentary and can be summarized as: (1) changing the shape of thyrocytes and their nucleus (changed from cubic to floors), (2) variation in the chemical composition of the colloid, (3) marking and parafollicular cell morphology, and (4) increased blood flow in tissue. Thus, it is concluded through the results that aminoguanidine interferes with thyroid histochemistry noting interference also caused by diabetes and exercise.

**Keywords:** Aminoguanidine, diabetes, rats, physical training; thyroid.



## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico que acomete diversos órgãos dos animais. Esta síndrome é a quinta maior causadora de morte no mundo (KNOWLER, 2009), sendo caracterizada pela ausência ou secreção deficiente do hormônio insulina ou pela resistência periférica a este o que, afeta o metabolismo dos carboidratos, lipídios e das proteínas, resultando em hiperglicemia e glicosúria (PETERSEN, 2002).

A insulina é o hormônio trófico responsável por promover a entrada da glicose no interior das células do organismo, principalmente nas células musculares, adiposas e hepáticas (estas últimas responsáveis por armazenar energia na forma de lipídio e glicogênio, respectivamente) (GUYTON, 2011). Em valores normais de glicemia (entre 75 e 100mg/mL) e na ausência de insulina, o tecido nervoso seria o único que conseguiria utilizar a glicose circulante em quantidades suficientes para manutenção das suas necessidades. Independente da causa, a falta da insulina alteraria o metabolismo dos glicídios, lipídios e das proteínas nos organismos, tornando, então necessária à presença da insulina para garantir a entrada de quantidades adequadas de glicose nas demais células (NADEU et al., 1985).

A prática de exercício físico interfere nos efeitos causados pelo diabetes, ou pelo aumento na sensibilidade à insulina, ou pelo efeito sobre sua secreção (TANCREDE et al., 1982 apud LUCIANO, 1991). Por si só, o exercício físico além de melhorar a captação de glicose pelas células ainda aumenta a glicogênese promovendo, ao mesmo tempo, adaptações nas células dos músculos esqueléticos as quais estimulam o aumento da utilização dos lipídios (CORIGLIANO, 2006).

A hiperglicemia crônica, característica dos indivíduos diabéticos, leva a danos celulares e teciduais os quais são causados pelos produtos finais da glicação avançada (AGEs – advanced glycation end-products) (BROWNLEE, 2001; PEPPA, 2003). Os efeitos patológicos causados pelos AGEs estão relacionados a grande capacidade destes compostos de modificarem as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas presentes em diabéticos, promovendo assim o estresse oxidativo, alterações

morfofuncionais e o aumento da expressão de mediadores inflamatórios (BIERHAUS, 1998; JAKUS, 2004; AHMED, 2005;). Dessa forma, tem se tornado de grande interesse o desenvolvimento e o emprego de substâncias anti-AGEs, que se mostrem eficazes na terapia contra a formação de placas de aterosclerose em vasos sanguíneos (CORMAN et al., 1998; FORBES et al., 2005).

A aminoguanidina ( $\text{CH}_6\text{N}_4$ ) é um dos derivados da guanidina, com muitas propriedades em comum com a hidrazina. Esta reage com o glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicossoma, grupos carbonila reativos dos produtos de Amadori, formados durante a reação de Maillard, evitando assim a formação de AGEs (LIEBER, 1939; NILSSON, 1999; MÉNDEZ, 2003; THORNALLEY, 2003).

A tireoide é uma glândula endócrina responsável pela síntese dos hormônios tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e calcitonina, envolvidos no controle metabólico do corpo. Morfologicamente é constituída por dois lobos unidos por um istmo estando localizada na região cervical e, anterior à laringe (JUNQUEIRA, 2008).

Cada lobo tireoidiano é composto por uma extensa rede capilar sanguínea, com vasos fenestrados, bem como por milhares de folículos tireoidianos, formados por um epitélio simples cúbico que delimita uma cavidade preenchida por substância gelatinosa denominada de colóide ou ainda pré-hormônio (JUNQUEIRA, 2008). Além das células foliculares que revestem externamente os folículos tireoidianos, são encontradas as células parafoliculares (ou células C), que não atingem a luz folicular, ficando agrupadas entre os folículos tireoidianos e sendo responsáveis pela síntese da calcitonina, hormônio regulador do teor de cálcio no sangue (AUMÜLLER, 2009).

Thornalley (2003), em estudos *in vitro* e *in vivo*, registrou a ação terapêutica da aminoguanidina no tratamento de nefropatia, retinopatia e neuropatias causadas pelo acúmulo de AGEs em indivíduos diabéticos. No entanto, até o presente momento, não foram encontrados estudos que analisaram a ocorrência de alterações morfohistológicas, sobre a tireoide, causadas pelo uso da aminoguanidina sozinha, ou associadas a outras terapias.

Sabe-se atualmente que exercícios físicos são benéficos no controle de diversas doenças (inclusive a DM) e provocam o aumento do metabolismo do corpo, estimulando a utilização de várias fontes de energia, incluindo o glicogênio dos músculos e do fígado (após 20 ou 30 minutos de exercício com intensidade moderada), bem como os triglicerídeos armazenados no tecido adiposo (após 30 minutos há predomínio da oxidação de lipídios) (ARKINSTALL, 2004; CORIGLIANO, 2006). Ainda os exercícios físicos de intensidade moderada são recomendados para melhorar o controle metabólico de indivíduos diabéticos, particularmente daqueles resistentes à insulina, exceto no caso de declaração de contra-indicações (OSTERGARD, 2007).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo fornecer dados citológicos, morfohistológicos e histoquímicos de tireoides retiradas de ratos diabéticos submetidos a tratamento com aminoguanidina e a programa de exercício físico concomitantemente, visando avaliar o potencial anticitotóxico dessa substância e detectando possíveis alterações morfológicas nas tireoides dos indivíduos tratados com medicamentos que a tenham na sua composição.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais**

Foram utilizados 25 ratos machos, albinos (Wistar), com peso entre 180 e 200g, adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, SP, Brasil e mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Rio Claro, SP, Brasil, em condições controladas ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 50% de umidade, e fotoperíodo de 12h). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas (três animais/caixa) e tiveram ração comercial Purina (Campinas, SP, Brasil) e água *ad Libitum*.

### **2.2 Indução do Diabetes**

Os animais que foram induzidos ao diabetes tipo 1 permaneceram em jejum por 18 horas e após este período receberam dose única (intraperitoneal) de estreptozotocina (Sigma-Aldrich CO, Saint Louis, MO, EUA) na concentração de 60 mg/kg diluída em buffer citrato 0.1M e pH 4.5 (STOPPA et al., 2006).

### **2.3 Obtenção da Aminoguanidina**

A aminoguanidina (Pimagedine, AG) (Sigma-Aldrich CO, Saint Louis, MO, EUA) foi administrada via água de beber em solução de 0.1% (1g/L) de AG (CORMAN et al., 1998) durante 8 semanas após a indução do diabetes tipo 1.

#### **2.4. Modelo Experimental**

Os ratos neste estudo foram divididos em cinco grupos: Controle sedentário (**C/SD**), Diabético tipo 1 sedentário (**DB/SD**), Diabético tipo 1 treinado (**DB/TR**), Diabético tipo 1 sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**), Diabético tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (**DB/TR-AG**).

#### **2.5. Programa de Exercício Físico**

O exercício físico escolhido foi o de corrida em esteira ergométrica. Na primeira semana, os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira e à velocidade que consistiu de aumentos progressivos variando de 5 (no primeiro dia) até 10m/min (no quinto dia da semana). Progressivamente, a velocidade e o tempo de duração das sessões foram aumentados até que os animais conseguissem permanecer correndo por 60 minutos. Somente os animais adaptados a esta atividade foram selecionados e utilizados neste estudo.

Na segunda semana, o treinamento físico foi iniciado com velocidade de 10m/min, aumentando-se progressivamente conforme o grupo de animais até atingir a velocidade final correspondente à máxima fase estável de lactato (MFEL) estabelecida anteriormente para ratos. Um grupo de ratos diabéticos foi induzido especialmente para a determinação da intensidade de treinamento. A intensidade do treinamento em esteira dos animais diabéticos tipo 1 foi determinada através da realização do teste de MFEL. Esta é definida como a mais alta intensidade de trabalho que pode ser mantida sem o acúmulo contínuo de lactato sanguíneo, onde o metabolismo aeróbio prepondera sobre o anaeróbio, sendo um importante marcador da capacidade aeróbia (BILLAT et al, 2003; SVEDAHL e MacINTOSH, 2003). O lactato sanguíneo é um indicador da transição de metabolismo e autores consideram a concentração de 4,0 mmol/L como um marcador do início de acúmulo de lactato (HECK et al, 1985; MANCHADO et al., 2005). Os animais apresentaram estabilização na concentração de lactato nas velocidades 10 m/min ( $3,3 \pm 0,3$  mmol/L) e 15

m/min ( $3,6 \pm 0,3$  mmol/L). No entanto, observou-se crescente acúmulo de lactato na velocidade de 20 m/min ( $6,0 \pm 1,1$  mmol/L). Considerando a definição de MFEL utilizamos a velocidade de 15 m/min para o treinamento físico, 5 dias/semana, 60 minutos cada sessão, por 8 semanas, durante o período da manhã.

Ao término do período total de treinamento, os animais em jejum de 12 horas foram mantidos em repouso por 48 horas. A seguir os mesmos foram anestesiados com 30 mg/Kg de tiopental sódico intraperitoneal e uma incisão longitudinal foi feita no abdômen do animal para coleta de amostra de sangue arterial (7 mL), obtida do ramo descendente da artéria aorta. Em seguida, os animais foram sacrificados por exsanguinamento sob anestesia.

Este projeto foi submetido à análise pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP Instituto de Biologia (IB) e obteve aprovação (protocolo número 1753-1).

## **2.6. Métodos**

### **2.6.1. Histologia**

Após o sacrifício os ratos foram colocados em placas de cera para dissecação. Fragmentos das tireóides foram retirados com o auxílio de tesoura e pinça de dissecação, e de papel toalha absorvente. Na sequência foram fixados por 24 horas em paraformaldeído a 4% (ou outro fixador, segundo protocolo das diferentes técnicas), transferido para tampão fosfato 10 % (0.1M pH 7.4) por mais 24 horas. A seguir, foram desidratados em soluções crescentes de etanol a 70, 80, 90 e 95% durante 30 minutos cada banho, embebidos em resina Leica por 24 horas e transferidos para moldes plásticos que posteriormente foram preenchidos com resina polimerizada Leica. Após a polimerização da resina, todos os blocos foram seccionados com espessura de 3  $\mu$ m e corados com hematoxilina e eosina. O material foi examinado em fotomicroscópio Motic BA300.

### **2.6.2. Histoquímica**

Visando detectar a presença, a frequência e a distribuição de componentes protéicos, polissacarídicos e lipídicos, nas tireóides dos ratos

aqui estudados, após sacrifício, procedeu-se a retirada de fragmentos das tireóides os quais foram submetidos às seguintes técnicas histoquímicas:

**Técnica do Azul de Bromofenol para Detecção de Proteínas (Segundo PEARSE, 1985):**

Os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas. As secções obtidas foram coradas com azul de bromofenol por duas horas a temperatura ambiente. Após serem lavadas com ácido acético 0.5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos, as mesmas foram rapidamente passadas por solução de álcool butílico terciário. A seguir, foram secas ao ar, diafanizadas e montadas em bálsamo do Canadá.

**Técnica de Baker para Detecção de Lipídios (Segundo BAKER, 1946):**

Fragmentos das tireóides foram fixados em Formol Cálcio por 15 horas. Para aplicação deste teste histoquímico, o material foi tratado por 18 horas com bicromato de cálcio. Na sequência procedeu-se a lavagem em água destilada e reação em solução de hemateína durante 5 horas. Em seguida, procedeu-se nova lavagem e a rápida diferenciação em mistura de Weigert. Logo depois, ocorreu a última lavagem com água destilada. Após a secagem, as lâminas contendo o material foram montadas em glicerina e recobertas com lamínula.

**Técnica do PAS para Detecção de Polissacarídeos (Segundo JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983):**

Fragmentos das tireóides foram fixados em mistura aquosa de Bouin. As lâminas contendo as secções permaneceram por 10 minutos em solução de ácido periódico 0.4%, foram lavadas rapidamente em água destilada e foram submetidas ao reagente de Schiff durante 1h, no escuro. Posteriormente, realizou-se três lavagens em água sulfurosa por 3 minutos cada e, a seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 30 minutos. Após secagem, as lâminas contendo as secções foram diafanizadas em xilol e montadas em Bálsamo do Canadá.

Todas as lâminas foram observadas e fotografadas em fotomicroscópio MOTIC BA 300, acoplado a microcomputador INTEL.

### **3. RESULTADOS**

### 3.1. Histologia de Tireóide

Os resultados obtidos no presente estudo mostram as alterações, pelas quais passam o tecido da tireóide extraída de ratos diabéticos após o treinamento e/ou tratamento com a aminoguanidina (Figs. 1A-E).

#### **Grupo Controle Sedentário (C/SD)**

Os resultados histológicos revelam que a tireóide dos indivíduos do grupo **C/SD**, como já descrito na literatura, apresenta folículos tireoidianos íntegros envoltos por epitélio folicular formado por células foliculares que delimitam uma cavidade preenchida por colóide (pré-hormônio). Este é evidenciado pela eosina, destacando-se o seu teor acidófilo. As células foliculares apresentam forma cúbica e núcleo único arredondado e central. Entre os folículos tireoideanos é encontrado um estroma de tecido conjuntivo que sustenta os folículos e por onde chegam vasos sanguíneos e linfáticos. Em algumas regiões do tecido conjuntivo nota-se a presença de células maiores mais claras, as células parafoliculares (Fig. 1A).

#### **Grupo Diabético tipo 1 sedentário (DB/SD)**

As alterações encontradas na tireóide dos indivíduos deste grupo evidenciam as modificações morfofisiológicas causadas provavelmente pelo diabetes. As células foliculares mudam sua morfologia passando de cúbicas a escamosas, o que torna o epitélio também escamoso e agora abrigando colóide menos acidófilo no seu interior (Fig. 1B). Por entre os folículos tireoidianos, observa-se aparente aumento de tecido conjuntivo, o que provoca maior separação entre um folículo e outro, situação que ocorre quando se compara aos indivíduos do grupo controle sedentário (**C/SD**).

#### **Grupo Diabético tipo 1 treinado (DB/TR)**

Os indivíduos desse grupo apresentam folículos com as células foliculares aparentemente ativas, visto que parecem retomar a sua forma cúbica. O colóide tem o mesmo aspecto daquele foi observado no grupo controle sedentário (**C/SD**). Em alguns folículos pode-se observar regiões do colóide com pontuações escurecidas (Fig. 1C). O tecido conjuntivo possui grande vascularização e a presença de grande quantidade de células sanguíneas vermelhas (hemácias). Nele encontram-se as células parafoliculares as quais começam a apresentar vacuolização citoplasmáticas (Fig. 1C).

### **Grupo Diabético tipo 1 Sedentário e Tratado com Aminoguanidina (DB/SD-AG)**

A tireoide destes indivíduos (**DB/SD-AG**) exhibe suas células foliculares, com aspecto morfológico e tamanho semelhantes àqueles encontrados nos indivíduos do grupo diabético sedentário (**DB/SD**). O núcleo das células foliculares varia entre arredondado e achatado. O epitélio folicular abriga um colóide com baixa acidofilia. Aqui também parece ocorrer à desorganização de alguns folículos, bem como a vacuolização das células foliculares (Fig. 1D).

### **Grupo Diabético tipo 1 Treinado e Tratado com Aminoguanidina (DB/TR-AG)**

As tireóides obtidas a partir de indivíduos treinados e tratados com aminoguanidina (**DB/TR-AG**) apresentam células foliculares com forma que transitam entre cúbicas e escamosas predominando as primeiras. Existe evidente presença de maior quantidade de hemácias por entre os folículos tireoidianos (Fig. 1E). No interior desses folículos, o colóide encontra-se semelhante ao observado no grupo controle (**C/SD**). E assim como no grupo diabético treinado (**DB/TR**) observa-se em alguns folículos regiões do colóide com pontuações escurecidas (Fig. 1E). As células parafoliculares além de apresentar aparente hipertrofia possuem vacuolização citoplasmática assim como observado no grupo diabético treinado (**DB/TR**) (Fig. 1E).

## **3.2. Histoquímica da Tireoide**

### **Grupo Controle sedentário (C/SD)**

A aplicação do corante azul de bromofenol para detectar presença de proteína revela forte reação positiva no núcleo e moderada reação no citoplasma das células foliculares e parafoliculares dos indivíduos (**C/SD**), indicando a presença de proteínas. O colóide no interior dos folículos tireoidianos reage fracamente a este teste histoquímico (Fig. 2A).

O teste para detecção de polissacarídeos mostra o citoplasma, das células tireoidianas dos indivíduos controle sedentário (**C/SD**), negativo a marcação de polissacarídeos, havendo apenas uma fina granulação positiva concentrada em algumas regiões das células, preferencialmente na apical. Já o colóide apresenta-se fortemente positivo, ao contrário do tecido conjuntivo (Fig. 2B). Como essa técnica não é específica para demonstração de núcleo não há marcação dessas organelas.



Com a aplicação do teste histoquímico de Baker observa-se a presença de pouco lipídio o qual foi marcado moderadamente no citoplasma das células foliculares dos indivíduos do controle sedentário **(C/SD)** (Fig. 2C). O tecido conjuntivo ao redor dos folículos tireoidianos, ou não reagiram, ou reagiram fracamente ao teste. Os núcleos das células foliculares estão corados devido à utilização da hemateína, solução obtida através da oxidação da hematoxilina (Fig. 2C).

#### **Grupo Diabético tipo 1 sedentário (DB/SD)**

Nesse grupo não se observou alterações quando aplicados os testes histoquímicos do PAS e do azul de bromofenol nos indivíduos do grupo **(DB/SD)** sendo os resultados semelhantes aos observado no grupo controle **(C/SD)** (Figs. 2 D, E).

Já para o teste histoquímico de Baker, foi possível observar diferenças na marcação do colóide no interior dos folículos, indicando aí quantidade maior de lipídio (Fig. 2 F).

#### **Grupo Diabético tipo 1 treinado (DB/TR)**

Nos indivíduos do grupo **(DB/TR)** o teste histoquímico do azul de bromofenol, mostrou marcação semelhante a dos indivíduos dos grupos anteriores **(C/SD)** e **(DB/SD)** (Fig. 2 G).

Para o teste histoquímico PAS houve marcação diferenciada do colóide em diferentes folículos tireoidianos (Fig. 2H). Uns apresentaram forte positividade para polissacarídeos e em outros, fraca positividade. Além disso, alguns folículos apresentaram colóide com regiões que não foram marcadas.

No teste de Baker, o grupo **DB/TR**, mostrou folículos com colóide com marcação próxima à encontrada no grupo **DB/SD**. As células foliculares foram marcadas como nos grupos anteriores **C/SD** e **DB/SD** (Fig. 2 I).

#### **Grupo Diabético tipo 1 sedentário e tratado com aminoguanidina (DB/SD-AG)**

No grupo **DB/SD-AG**, foi possível observar alteração com a técnica de azul de bromofenol. As células parafoliculares quando comparadas as do grupo **C/SD**, evidenciaram seu citoplasma menos marcado (fracamente positiva) (Fig. 2 J).

Para o teste do PAS a marcação observada no colóide foi tão intensa quanto nos outros grupos, porém neste grupo as células foliculares reagiram com mediana positividade (Fig. 2 K).

Quando utilizada a coloração Baker no grupo **DB/SD-AG** o colóide apresentou reação semelhante a do grupo **DB/SD** o que mostra uma concentração maior de lipídio no pré-hormônio quando comparado ao grupo **C/SD** (Fig. 2 L).

#### **Grupo Diabético tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (DB/TR-AG)**

Não foi possível observar no grupo **DB/TR-AG** alterações com a aplicação da técnica do azul de bromofenol quando comparado ao grupo anterior (Fig. 2 M).

Na tireóide dos indivíduos do grupo **DB/TR-AG** a técnica histoquímica do PAS reage fortemente na região do colóide e com menor intensidade nas células foliculares (Fig. 2 N).

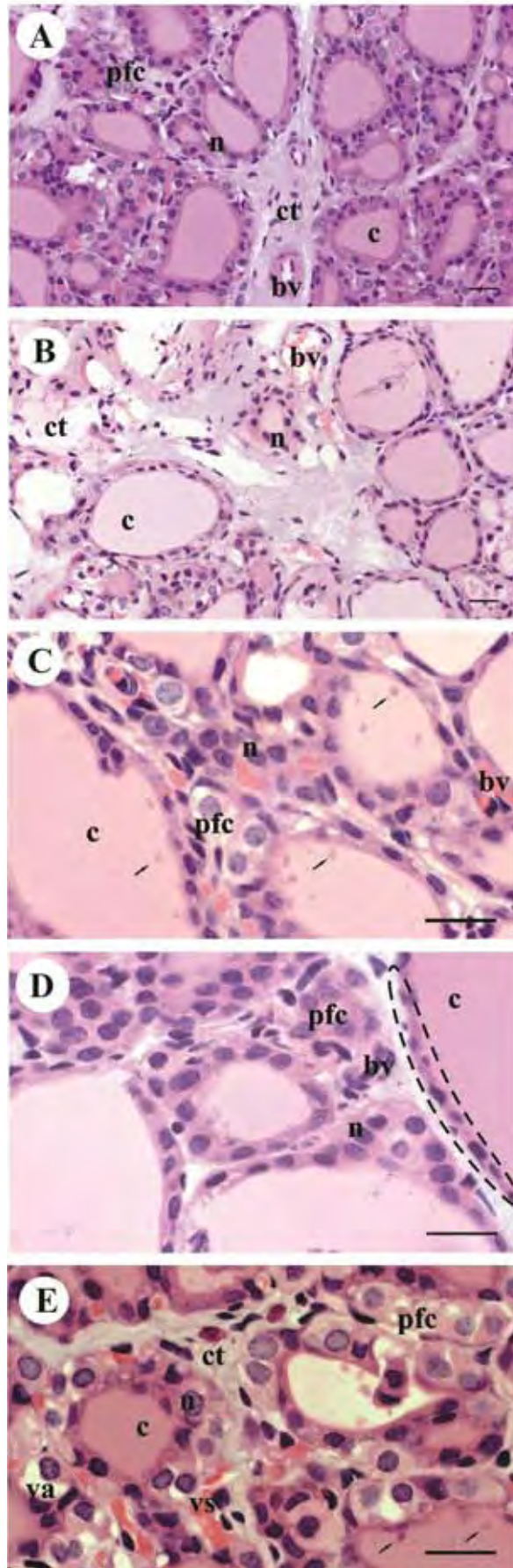
Na coloração de Baker, as tireóides dos indivíduos do grupo **DB/TR-AG** tem marcação semelhante a do grupo controle **C/SD** (Fig. 2 O).

**Figura 1.** Cortes histológicos de tireoide de ratos. **A-E.** Hematoxilina e eosina (HE). **A.** Grupo Controle sedentário (**C/SD**). **B.** Grupo Diabético tipo 1 sedentário (**DB/SD**). **C.** Grupo Diabético tipo 1 treinado (**DB/TR**). **D.** Grupo Diabético tipo 1 sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**). **E.** Grupo Diabético tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (**DB/TR-AG**).

c= colóide, n=núcleo, bv= vasos sanguíneos, pfc= células parafoliculares, linha pontilhada= desorganização das células foliculares, seta= colóide com marcação

**Barra de escalas:** A-E=0.02 mm.

1

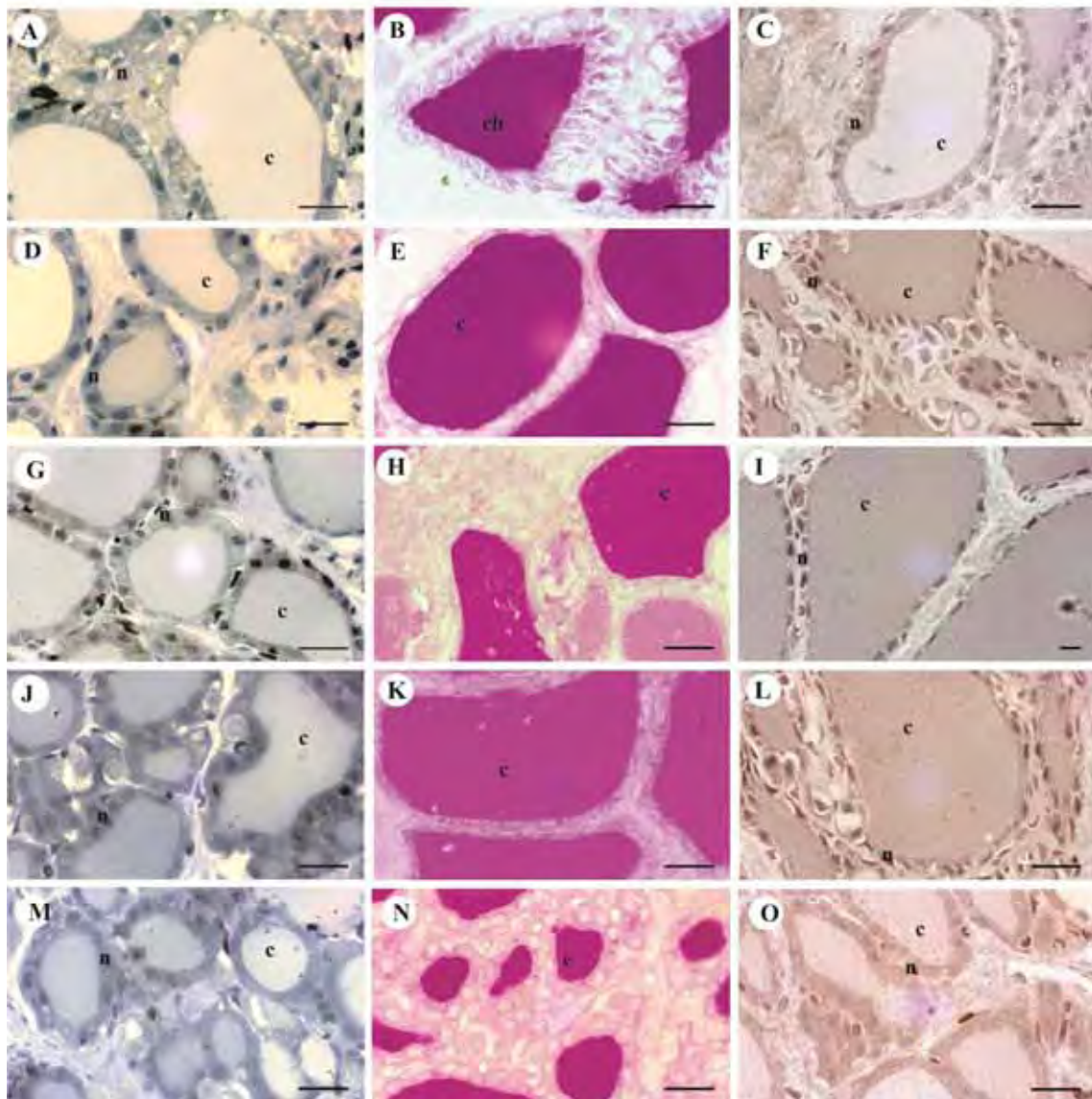


**Figura 2.** Cortes histológicos de tireoide de ratos. **A,D,G,J e M.** Azul de bromofenol **B,E,H,K e N.** PAS. **C,F,I,L e O.** Baker. **A, B e C** Grupo Controle sedentário (**C/SD**). **D, E e F** Grupo Diabético tipo 1 sedentário (**DB/SD**). **G, H e I** Grupo Diabético tipo 1 treinado (**DB/TR**). **J, K e I** Grupo Diabético tipo 1 sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**). **M, N e O** Grupo Diabéticos tipo 1 treinado e tratado com aminoguanidina (**DB/TR-AG**).

c= colóide, n=núcleo, bv= vasos sanguíneos, pfc= células parafoliculares, linha pontilhada= desorganização das células foliculares, seta= colóide com marcação

**Barra de escalas:** A-E=0.02 mm.

2



#### 4. DISCUSSÃO

O Diabetes Mellitus é um problema de saúde pública mundial, e está alcançando proporções epidêmicas em países desenvolvidos. Caracteriza-se por ser uma doença metabólica decorrente da deficiência absoluta ou relativa de insulina, ou ainda da baixa sensibilidade dos tecidos periféricos a este hormônio, o que resulta na elevação característica dos níveis de glicose no sangue, hiperglicemia (LERCO et al, 2003; WEI et al, 2003), considerada o fator primário desencadeador das complicações micro e macrovasculares nos indivíduos acometidos pelo DM. Tais complicações causam degenerações crônicas como cardiopatia, nefropatia, retinopatia e neuropatia (JAKUS, 2004). Dentre as vias conhecidas que levam a essas lesões vasculares associadas à diabetes, a via de formação endógena dos produtos de glicação avançada (AGEs) é a mais importante (BROWNLEE et al., 1986).

AGEs são altamente reativos e podem danificar as células pela modificação das estruturas intracelulares, pela sua interação com proteínas da matriz extracelular (modificando a sinalização celular) e pela modificação de proteínas ou de lipídios sanguíneos. Dessa forma, os AGEs reagem com diversos compostos presentes no organismos dos diabéticos, alterando sua propriedade química e funcional, o que causa estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento de processos inflamatórios (JAKUS, 2004; BIERHAUS, 2004; AHMED, 2005).

A aminoguanidina é um composto que previne a formação de AGEs, bem como um agente antioxidante que previne a formação de ROS e a peroxidação lipídica nas células e tecidos (GIARDINO et al., 1998; THORNALLEY, 2003).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram a presença de alterações nas tireoides dos ratos submetidos aos diferentes grupos de estudos e que provavelmente tiveram influência da administração da aminoguanidina e do treinamento físico.

Nos indivíduos do grupo controle sedentário **C/SD**, a tireoide exibiu morfologia e histologia conhecida, ou seja, folículos envoltos por epitélio folicular cúbico, formado pelas células foliculares ou tireócitos (produtoras de colóide) que abrigam o colóide (pré-hormônio) no seu interior. Entre os folículos



tireoidianos é encontrado um estroma de tecido conjuntivo, o qual é também a rota de chegada de vasos sanguíneos e linfáticos na glândula, bem como a presença de células parafoliculares ou células C, responsáveis pela produção de calcitocina (hormônio responsável por diminuir a quantidade de cálcio plasmático) corroborando assim dados encontrados em Carvalho e Colares-Buzato, (2005); Junqueira e Carneiro, (2008); Ross e Pawlina, (2008); Aumuller, (2009); Guyton, (2011).

Na tireoide dos indivíduos do grupo diabético tipo 1 sedentário **DB/SD** foram encontradas modificações morfofisiológicas causadas pela diabetes tais como: a presença de células foliculares menores e mais escamosas formando o epitélio, folicular marcação menos intensa das células parafoliculares e tecido conjuntivo com menor presença de células sanguíneas vermelhas (hemácias), sugerindo o menor metabolismo das células foliculares com conseqüente menor produção de pré-hormônio e de calcitonina. Dados semelhantes foram encontrados por Daneman et al. (2006), uma vez que os indivíduos diabéticos em seus estudos apresentaram mudanças metabólicas, bioquímicas e morfológicas em diversos tecidos.

Nos indivíduos do grupo diabético tipo 1 treinado **DB/TR**, as características gerais das células tireoidianas desse grupo foram mais semelhantes àquelas encontradas nos indivíduos do grupo controle sedentário **C/SD** do que aquelas dos indivíduos do grupo diabético sedentário **DB/SD**, sugerindo que o treinamento físico moderado favoreceu a recuperação parcial destas características celulares, tornando-as mais próximas daquelas apresentadas nos indivíduos do grupo controle sedentário **C/SD**. Isso poderia significar no resgate da atividade celular tireoideana, com conseqüente modificação no metabolismo, dados que corroboraram os obtidos nos estudos de Giannini et al. (2007) que também mostraram que a prática de exercício físico amenizaria os danos causados pelo diabetes.

No estroma conjuntivo da tireoide desse mesmo grupo **DB/TR** também foi observado aumento da vascularização e presença de grande quantidade de células sanguíneas vermelhas (hemácias), o que permitiria inferir que a tireoide desses indivíduos poderia estar recuperando sua atividade de síntese e secreção de maiores quantidades de pré-hormônio e de calcitonina, os quais passariam rapidamente para o interior dos vasos sanguíneos e seriam



transportados pelo sangue para todo o organismo, recuperando parte da atividade metabólica dos indivíduos. Este aumento da vascularização confirmaria que o exercício físico quando realizado continuamente, atuaria tanto prevenindo, quanto no tratamento das doenças cardiovasculares e para tanto seria recomendado por diferentes associações de saúde do mundo, visto serem seus benefícios comprovados na prevenção e no tratamento da hipertensão arterial, diabetes e de outras doenças (MORRIS et al., 1980; SISCOVICK et al., 1984; HULL et al., 1994).

Na tireoide dos indivíduos do grupo diabético sedentário e tratado **DB/SD-AG** foram observadas alterações semelhantes às aquelas observadas no grupo diabético sedentário **DB/SD**: ou seja, células foliculares menores e escamosas, colóide pouco acidófilo, menor quantidade de células sanguíneas vermelhas (hemácias) no tecido conjuntivo e células parafoliculares pouco frequentes, sugerindo que a aminoguanidina não provocou modificações morfohistológicas no tecido tireoidiano dos indivíduos diabéticos, bem como não alterou a fisiologia da atividade tireoidiana, visto que nesses indivíduos ficou caracterizada a pouca produção de colóide e, portanto, pouca atividade de síntese e de secreção dos hormônios tireoidianos.

Na tireoide dos indivíduos do grupo diabético treinado e tratado **DB/TR-AG** foi observado que as células foliculares apresentaram tamanho similar ao do grupo diabético treinado **DB/TR**, além de terem a forma cubóide e com núcleo arredondado, indicando novamente que modificações morfológicas e de síntese ocorreram devido ao exercício físico confirmando o grande auxílio que o exercício físico moderado traz no tratamento dos efeitos causados pelo diabetes (GOBATTO, 1993; LEME et al, 2007). Nos indivíduos treinados pareceu ter havido o restabelecimento da atividade funcional da tireoide na produção de colóide (DE ANGELIS et al, 2006).

No presente estudo o emprego de técnicas histoquímicas, permitiu observar a marcação e a distribuição das proteínas e dos polissacarídeos nas tireoides dos indivíduos de todos os grupos aqui estudados.

A presença de proteínas, na tireoide dos indivíduos do grupo controle sedentário **C/SD**, foi demonstrada pela forte reação no núcleo e mediana no citoplasma das células foliculares, ao contrário da fraca positividade no colóide no interior dos folículos. Esse padrão permaneceu no grupo **DB/SD** permitindo

inferir que a diabetes, não teve influência no acúmulo de proteína na tireoide. Estes dados foram contrários aos de Bahnak e Gold (1982), que registraram reduzida síntese de proteínas em indivíduos diabéticos. Nos grupos **DB/TR**, **DB/SD-AG** e **DB/TR-AG** foi observada positividade mediana no interior dos folículos, indicando influência do exercício e da aminoguanidina na síntese de proteínas. Outra alteração notada para essa marcação foi no grupo **DB/SD-AG**, onde as células parafoliculares apresentaram citoplasma menos positivo a proteínas, indicando assim menor produção de hormônio calcitonina.

O polissacarídeo, outro elemento que exerce importante papel na tireoide, nos grupos em questão apresentou-se como fina granulação medianamente positiva no citoplasma das células foliculares nos grupos **C/SD** e **DB/SD-AG**, mostrando influência da aminoguanidina na concentração de polissacarídeo do citoplasma das células foliculares de indivíduos diabéticos, os outros grupos **DB/SD**, **DB/TR** e **DB/SD-TR** apresentaram fraca granulação PAS positiva. A forte marcação notada no colóide foi do grupo **C/SD** e **DB/SD**, esta marcação é devido ao mesmo ser composto por complexos glicoprotéicos (tireoglobulina), corroborando dados de Carvalho e Colares-Buzato (2005), Junqueira e Carneiro (2008), Ross e Pawlina (2008) e Aumuller (2009). No grupo **DB/TR** foi observada diferença na marcação entre o colóide dos diferentes folículos tireoidianos, indicando ter o exercício físico influência sobre o metabolismo da tireoide e consequente composição do colóide, o qual também apresentou regiões onde não houve marcação para polissacarídeo nos grupos **DB/TR** e **DB/SD-AG**.

Com a aplicação da técnica de Baker, ficou demonstrada a média marcação para os lipídios no citoplasma das células foliculares, no colóide armazenado pelos folículos e no tecido conjuntivo da tireoide dos indivíduos do grupo controle sedentário (**C/SD**). A diferença foi um acúmulo maior de lipídio no colóide dos grupos **DB/SD**, **DB/TR** e **DB/SD-AG** indicando assim a influência do DM no metabolismo de lipídios, corroborando dados da literatura (NADEU et al, 1985) que registraram que a falta da insulina alteraria o metabolismo dos carboidratos, dos lipídios e das proteínas nos organismos, tornando, então necessária à presença da insulina para garantir a entrada de quantidades adequadas de glicose nas células. No grupo **DB/TR-AG** foi notado um colóide fracamente marcado pela técnica de Baker, assim com o grupo

**C/SD**, indicando assim a influência do exercício físico concomitante com o tratamento com a aminoguanidina minimizando os efeitos negativos da DM, pois, a literatura tem mostrado a forte evidência benéfica do exercício físico em pacientes portadores de inúmeras doenças (DELBIN, 2009) e mostrando também que um agente anti-AGE (aminoguanidina) e antioxidante previniria a formação de ROS e peroxidação lipídica nas células e tecidos (GIARDINO et al., 1998; THORNALLEY, 2003).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

ARKINSTALL, M. J.; BRUCE, C. R.; CLARK, S. A; *et al.* Regulation of fuel metabolism by preexercise muscle glycogen content and exercise intensity. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 6, p. 2275-83, 2004.

AUMULLER, G.; AUST, G.; DOLL, A.; ENGELE, J.; KIRSCH, J; MENSE, S.; *et al.*, **Anatomia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BAHNAKS, B. R.; GOLD, A. H. Effects of Alloxan Diabetes on the Turnover of Rat Liver Glycogen Synthase. v. 257, n. 15, p. 8775-8780, 1982.

BAKER, J. R. The histochemical recognition of lipine. **Quarterly Journal of Microscopical Science**. v. 87, p. 441-70. 1946.

BIERHAUS, A; HOFMANN, M. A; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular research**, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998.

BIERHAUS,A, HUMPERT, P. M., MORCOS, M. *et al.* Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products **Journal of Molecular Medicine** v83, p 876–886. 2005

BILLAT, V.; LEPRETRE, P.-M.; HEUGAS, A.-M. *et al.* Training and bioenergetic characteristics in elite male and female Kenyan runners. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 2, p. 297-304; discussion 305-6, 2003.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; KOONEY, A.; ULRICH, P.; CERAMI, A. Aminoguanidine Prevents Diabetes-Induced Arterial Wall Protein Cross-Linking. **Science**, v. 232, p. 1629–1632, 1986.

BROWNLEE, M, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications **Nature** v414, p. 813-820. 2001

BROWNLEE, M., The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-25, 2005.

CARVALHO, H. F.; COLARES-BUZATO, C. B. **Células: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005. 495 p.

CORIGLIANO, G.; IAZZETTA, N.; CORIGLIANO, M.; STROLLO, F. Blood glucose changes in diabetic children and adolescents engaged in most common sports activities. **Acta Bio-medica**, v. 77 Suppl 1, p. 26-33, 2006.

CORMAN, B.; DURIEZ, M.; POITEVIN, P. *et al.* Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 3, p. 1301-6, 1998.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, p. 847-858, 2006.

DE ANGELIS, K.; PUREZA, D. Y. DA; FLORES, L. J. F. *et al.* Efeitos Fisiológicos do Treinamento Físico em Pacientes Portadores de Diabetes Tipo 1. **Endocrinology And Metabolism**, v. 50, p. 1005-1013, 2006.

DELBIN, M. A. **Reatividade vascular de artérias mesentérica e pulmonar de ratos após isquemia/reperfusão pulmonar: efeito do treinamento físico**. 2009. 89f . Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista- UNESP, Rio Claro, 2009.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Below the Radar : Advanced Glycation End Products that Detour “around the side.” **Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 123-134, 2005.

GIANNINI, C.; GIORGIS, T.; MOHN, A.; CHIARELLI, F. Role of physical exercise in children and adolescents with diabetes mellitus. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 2, p.173-184, 2007.

GIARDINO, I.; FARD, A K.; HATCHELL, D. L.; BROWNLEE, M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes**, v. 47, n. 7, p. 1114-20, 1998.

GOBATTO, C. A. **Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados**. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. 122p, 1993.

GUYTON, A.C. **Fisiologia Humana**. 12ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 800p.

HECK, H. D. A.; CASANOVA-SCHMITZ, M.; DODD, P. B.; SCHACHTER, E. N.; WITEK, T. J.; TOSUN, T. Formaldehyde (CH<sub>2</sub>O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH<sub>2</sub>O under controlled conditions. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 46, n. 1, p. 1-3. 1985

HULL, S. S.; VANOLI, E.; ADAMSON, P. B. *et al.* Brief Communications Exercise Training Confers Anticipatory Protection From Sudden Death During

Acute Myocardial Ischemia. **Journal of the American Heart Association**, v. 89, p. 548-552, 1994.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological research**, v. 53, n. 2, p. 131-42, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U. ; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p. 230-290.

KNOWLER, W. C.; FOWLER, S. E.; HAMMAN, R. F.; CHRISTOPHI, C. A.; HOFFMAN, H. J.; BRENNEMAN, A. T.; BROWN-FRIDAY, J. O.; GOLDBERG, R.; VENDITTI, E.; NATHAN, D. N.; Diabetes prevention program research group 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevetion Programs Outcomes Study . **Lancet**. v. 374, n. 9707, p:1677-1686, 2009.

LEME, J. A., GOMES R. J., de MELLO, M. A., LUCIANO, E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. **Growth factors**, v. 25, n. 1, p. 9-14, 2007.

LERCO, M. M.; SPADELLA, T. S.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus , induzido pela aloxana em ratos . **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132- 142, 2003.

LIEBER, E; SMITH, G. B. L The Chemistry of Aminoguanidine and Related Substances. **Chem. Rev.**, 25 (2), pp 213–271, 1939

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

MANCHADO, F. D.; GOBATTO, C. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M.; MELLO, M. A. R. Journal of Exercise Physiology online. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 8, n. 4, p. 29-35, 2005.

MENDEZ, J. D. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. **Gaceta Médica de México**, v. 139, n. 1, p. 49-55, 2003.

MORRIS, J. N.; POLLARD, R.; EVERITT, M. G.; CHAVE, S. P. W. Vigorous Exercise in Leisure-Time: Protection Against Coronary Heart Disease. **Work**, 1980.

NADEU, M.; PERONNET, F. **Fisiologia Aplicada na Atividade Física**. São Paulo: Manole. 1985. 243 p

NILSSON, B. O. Biological effects of aminoguanidine: an update. **Inflammation Research**, v. 48, n. 10, p. 509-15, 1999.

OSTERGARD, T.; JESSEN, N.; SCHMITZ, O.; MANDARINO, L. J. The effect of exercise, training, and inactivity on insulin sensitivity in diabetics and their relatives: what is new? **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 3, p. 541-8, 2007.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Livingstone: Churchill, 1985, p.123-214.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. 4, p. 186-187, 2003.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **The American journal of cardiology**, v. 90, n. 5A, p. 11G-18G, 2002.

ROSS, M. H., PAWLINA, W. **Histologia Texto e Atlas - em correlação com biologia celular e molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SISCOVICK, D. S.; WEISS, M. D.; FLETCHER, R. H.; LASKY, T. The Incidence of Primary Cardiac Arrest during Vigorous Exercise. **The New England Journal of Medicine**, v. 311, p. 874-877, 1984.

STOPPA, G. R.; CESQUINI, M.; ROMAN, E. A F. R.; OGO, S. H.; TORSONI, M. A. Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. **Life sciences**, v. 78, n. 12, p. 1352-61, 2006.

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Canadian journal of applied physiology**, v. 28, n. 2, p. 299-323, 2003.

TANCREDE, G.; ROSSEAU-MIGNERON, S.; NADEU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin – induced Diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 31, n. 1, p. 406-409, 1982.

THORNALLEY, P. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

WEI, M.; ONG, L.; SMITH, M. T. *et al.* The Streptozotocin-Diabetic Rat as a Model of the Chronic Cmplication of Human Diabetes. **Heart, Lung and Circulation**, p. 44-50, 2003.

# *Discussão Geral*

---

---

## 5. DISCUSSÃO

O Diabetes Mellitus é uma síndrome metabólica decorrente da deficiência absoluta ou relativa de insulina, ou ainda da baixa sensibilidade dos tecidos periféricos a este hormônio, o que resulta na elevação característica dos níveis de glicose no sangue, processo este denominado hiperglicemia (LERCO et al, 2003; WEI et al, 2003). A hiperglicemia é uma característica encontrada em indivíduos portadores do DM tipos 1 e 2, sendo considerado o fator primário que desencadeia as complicações micro e macrovasculares nesses indivíduos, complicações estas que causam degenerações crônicas como: cardiopatia, nefropatia, retinopatia e neuropatia, as quais afetam a qualidade de vida dos indivíduos (JAKUS, 2004).

Dentre as vias conhecidas que levam as lesões vasculares associadas ao DM, aquelas de formação endógena dos produtos de glicação avançada, também denominados (AGEs), tem sido consideradas atualmente as mais importantes (BROWNLEE et al., 1986). Os produtos de glicação avançada (AGEs) são altamente reativos e podem danificar as células modificando suas estruturas internas, pela interação dos AGEs com proteínas da matriz extracelular (modificando a sinalização celular), bem como modificando as proteínas e/ou lipídios sanguíneos. Dessa forma, os AGEs reagem com diversos compostos presentes no organismo dos diabéticos, alterando sua propriedade química e funcional, causando estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento de processos inflamatórios (BIERHAUS, 1998; JAKUS, 2004; AHMED, 2005).

A aminoguanidina (composto do produto comercial Pimagedine) que previne a formação de AGEs (THORNALLEY, 2003), atua como um agente antioxidante que previne a formação de ROS e a peroxidação lipídica nas células e tecidos (GIARDINO et al., 1998).

Desta forma os resultados obtidos no presente estudo revelaram a presença de alterações morfológicas no fígado e na tireoide de ratos submetidos aos diferentes grupos de estudo e que sugerem a influência da administração da aminoguanidina e do treinamento físico.

Nos indivíduos do grupo **C/SD** o fígado exibiu morfologia e histologia conhecidas e já amplamente descritas na literatura de mamíferos



(CARVALHO; COLARES-BUZATO, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008). Assim como na morfologia, os testes histoquímicos demonstraram células (hepatócitos e de Kupffer) fortemente marcadas pelo azul de bromofenol e contendo polissacarídeos (PAS positivos) devido a grande quantidade de glicogênio presente (LEHNINGER, 2004).

Nos indivíduos diabéticos sedentários (**DB/SD**) foram encontradas alterações morfológicas provavelmente causadas pelo diabetes, bem como pelo próprio sedentarismo, tal como a presença de hepatócitos menores, o que sugeriu a diminuição do metabolismo celular hepático, uma vez que a glicose disponível no sangue não pode ser absorvida pelas células, provavelmente devido à diminuição ou ausência da insulina. Estes, dados corroboraram aqueles obtidos por Remédio et al. (2010), ao estudarem ratos diabéticos da linhagem Wistar. Para estes mesmos indivíduos, os testes histoquímicos aqui aplicados mostraram marcação do azul de bromofenol semelhante àquela encontrada no fígado dos animais do grupo controle sedentário (**C/SD**), não corroborando Bahnak e Gold (1982), que registraram que a síntese de proteínas nos indivíduos diabéticos estaria reduzida, devido ao elevado catabolismo protéico. O mesmo resultado para a marcação de polissacarídeos, ficou evidente na redução de grânulos PAS positivos no citoplasma da maioria dos hepatócitos, o que corroborou dados de Vallance-Owen (1952). Whitton e Hems (1975) registraram ainda que a hiperglicemia característica de indivíduos diabéticos provavelmente estaria associada à redução do glicogênio hepático, devido a um defeito no processo de retenção deste no fígado. Por outro lado a falta de insulina e o excesso de glucagon, condições típicas de indivíduos diabéticos, afetariam o desempenho das enzimas glicogenolíticas e glicogênicas, o que também poderia estar contribuindo para o menor armazenamento de glicogênio pelo fígado (CLORE et al, 1992).

Nos indivíduos do grupo **DB/TR** os hepatócitos e os seus núcleos passaram por processos de hipertrofia, quando se comparou essas células com as dos indivíduos dos grupos **C/SD** e **DB/SD**. Segundo Rhodes et al. (1987) e Teh (1997), a hipertrofia celular (aumento gradativo do citoplasma dos hepatócitos) dar-se-ia em função de vários fatores, dentre os quais

estaria a ocorrência de sobrecarga metabólica imposta à célula, situação esta que provavelmente ocorreu nos indivíduos deste estudo, o que poderia justificar essa hipertrofia observada nos hepatócitos dos indivíduos treinados. Também observou-se neste grupo a forte e intensa marcação para polissacarídeos no citoplasma dos hepatócitos quando comparada a dos indivíduos do grupo **DB/SD**, sugerindo que a prática regular e periódica de exercícios físicos estimularia o processo de acúmulo de glicogênio hepático (re-síntese) (GOBATTO, 1993; LEME et al, 2007). A diferença de marcação para polissacarídeos variou também de acordo com a proximidade ou não dos hepatócitos dos grandes vasos hepáticos (veias centro lobulares). Os hepatócitos localizados ao redor destes reagiram fracamente ao teste do PAS, sugerindo que os mesmos seriam os primeiros a fornecer o glicogênio para a circulação durante o exercício físico, diminuindo assim seus estoques celulares. Resultados semelhantes também foram encontrados por Ferranini (1990) em ratos diabéticos.

Nos indivíduos do grupo diabético sedentário e tratado com aminoguanidina **DB/SD-AG** também observou-se a ocorrência de hipertrofia nos hepatócitos, indicando possível interferência da aminoguanidina no metabolismo dos indivíduos diabéticos a ela expostos. Foram também observadas alterações semelhantes às aquelas do grupo diabético sedentário **DB/SD** (alterações devidas ao DM) tal como hepatócitos fracamente positivos ao PAS indicando que a aminoguanidina não interferiu no metabolismo de polissacarídeos os quais foram normalmente estocados no fígado dos indivíduos diabéticos. Devido à ausência de dados na literatura sobre a exposição à aminoguanidina, pode se apenas afirmar que a concentração aqui utilizada (1g/L) não provocou alterações celulares significativas, em nível de microscopia de luz.

A hipertrofia dos hepatócitos também ficou clara nos indivíduos do grupo **DB/TR-AG**, onde foram encontradas as maiores células, além de um aumento no espaço interplacas, sugerindo um efeito somatizado do treinamento físico e da exposição à aminoguanidina nos indivíduos dos grupos **DB/TR** e no **DB/SD-AG**, resultando, portanto, nas alterações mais severas observadas em relação aquelas do grupo **C/SD**. A marcação para polissacarídeo foi semelhante a encontrada no fígado dos indivíduos do

grupo **DB/TR**, o que poderia ser justificado pela interferência do treinamento físico e pela ausência da ação da aminoguanidina (já confirmada no grupo **DB/SD-AG**). Os dados aqui obtidos confirmaram os benefícios provenientes da prática de exercícios moderados em indivíduos diabéticos, com a nítida elevação do acúmulo de glicogênio hepático. De acordo com Guyton, (2011) a ausência de insulina prejudicaria o transporte da glicose para o interior das células, em especial, das células musculares, adiposas e hepáticas.

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram ainda a presença de alterações nas tireoides dos ratos submetidos aos diferentes grupos de estudo, que provavelmente também tiveram influência da administração da aminoguanidina e do treinamento físico.

Nos indivíduos do grupo controle sedentário (**C/SD**), a tireoide exibiu morfologia e histologia conhecidas corroborando Junqueira e Carneiro, (2008); Ross e Pawlina, (2008), ou seja, com a presença de folículos constituídos por epitélio cúbico, formado por células foliculares ou tireócitos (produtores de colóide) abrigando o colóide (pré-hormônio) no seu interior e células parafoliculares (produtoras de calcitonina). O colóide é formado por uma glicoproteína homodimérica (complexo protéico com duas proteínas idênticas), correspondente a 75% do conteúdo protéico da tireoide, sendo 10% dessa massa constituída por polissacarídeos. Recém sintetizada no retículo endoplasmático a proteína (tirosina) é encaminhada para o Golgi (onde sofre glicosilação) e é exocitada para luz do folículo mediante reações com o iodo na forma de tireoglobulina, sendo esta precursora dos hormônios tireoidianos (tiroxina,  $T_4$  e triiodotironina,  $T_3$ ). A presença de proteínas, na tireoide dos indivíduos do grupo controle sedentário **C/SD**, foi demonstrada pela forte reação no núcleo e mediana reação no citoplasma das células foliculares, devida a alta produção de tireoglobulina e fraca positividade observada no colóide no interior dos folículos, assim como descrito por Ross e Pawlina (2008). Ainda no grupo controle **C/SD**, a marcação de polissacarídeo (outro elemento que exerce importante papel na tireóide) apresentou-se como fina granulação medianamente positiva no citoplasma das células foliculares e, no colóide com forte marcação devido a este ser composto por complexos glicoprotéicos (tireoglobulina),

corroborando dados de Carvalho e Colares-Buzato (2005), Junqueira e Carneiro (2008), Ross e Pawlina (2008) e Aumuller (2009). Com a aplicação da técnica de Baker, visualizou-se a fraca marcação para lipídios tanto no citoplasma das células foliculares quanto no tecido conjuntivo, e média marcação no colóide armazenado pelos folículos da tireoide dos indivíduos do grupo controle sedentário **C/SD**, possivelmente pela sua constituição glicoprotéica citada acima.

Na tireoide dos indivíduos do grupo diabético sedentário **DB/SD** foram encontradas modificações morfofisiológicas causadas pela diabetes tais como: a presença de células foliculares menores e escamosas formando o epitélio folicular, marcação menos intensa das células parafoliculares e tecido conjuntivo com menor presença de células sanguíneas vermelhas (hemácias), sugerindo o menor metabolismo das células foliculares com consequente menor produção de pré-hormônio e de calcitonina. A tireoide é um órgão extremamente vascularizado, o que facilita o transporte de substâncias para a própria glândula e dela para os outros órgãos do corpo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Daneman et al. (2006), em estudos com pacientes diabéticos mostraram mudanças metabólicas, bioquímicas e morfológicas em diversos tecidos devido a hiperglicemia. Para a marcação de proteínas a tireoide dos indivíduos do grupo **DB/SD**, apresentou marcação semelhante à observada no grupo **C/SD** o que permitiu inferir que o diabetes, não influenciaria no acúmulo de proteína na tireoide, dados não corroborados por aqueles de Bahnak e Gold (1982), que registraram reduzida síntese de proteínas em indivíduos diabéticos. A tireoide dos indivíduos do grupo **DB/SD** apresentou forte marcação PAS no colóide assim como observado nas tireoides dos indivíduos do grupo **C/SD**. A diferença foi o acúmulo maior de lipídio no colóide dos grupos **DB/SD**, **DB/TR** e **DB/SD-AG** indicando assim a influência do DM no metabolismo deste elemento, corroborando dados de outros autores (NADEU et al, 1985) que registraram que a falta de insulina alteraria o metabolismo dos carboidratos, dos lipídios e das proteínas nos organismos portadores de doenças deste tipo, tornando, então necessária à presença da insulina para garantir a entrada de quantidades adequadas de glicose nas células.

Nos indivíduos do grupo diabético treinado (**DB/TR**), as características gerais das células tireoidianas foram mais semelhantes às aquelas encontradas nos indivíduos do grupo controle sedentário (**C/SD**) do que aquelas dos indivíduos do grupo diabético sedentário **DB/SD**, sugerindo que o treinamento físico moderado favoreceria a recuperação parcial das características celulares, tornando-as mais próximas daquelas encontradas nos indivíduos do grupo controle sedentário **C/SD**, o que poderia sugerir o resgate da atividade celular tireoidiana, com consequente modificação no metabolismo do corpo, corroborando dados obtidos por Giannini et al. (2007) que também mostraram que a prática de exercício físico amenizaria os danos causados pelo diabetes. No estroma conjuntivo da tireóide desse mesmo grupo (**DB/TR**) também foi observado aumento da vascularização, sugerindo que a tireóide desses indivíduos poderia estar recuperando suas atividades de síntese e de secreção do pré-hormônio e da calcitonina, substâncias estas que passariam rapidamente para o interior dos vasos sanguíneos e seriam daí transportados (pelo sangue) para todo o organismo, para agir na atividade metabólica geral dos indivíduos. Este aumento da vascularização provavelmente seria consequência da prática de exercício físico quando realizada continuamente e, atuaria tanto prevenindo, quanto tratando as doenças cardiovasculares. Devido a isto, esta seria uma prática recomendada pelas diferentes associações de saúde do mundo, visto serem seus benefícios comprovados na prevenção e no tratamento da hipertensão arterial, diabetes, bem como de outras doenças (MORRIS et al., 1980; SISCOVICK et al., 1984; HULL et al., 1994).

Nos indivíduos do grupo **DB/TR** foi observada no interior dos folículos positividade mediana para a marcação de proteínas, indicando a influência do exercício na síntese desses elementos. Esses indivíduos também apresentaram fraca marcação PAS positiva no citoplasma das células foliculares, bem como marcação diferenciada do colóide armazenado no interior dos diversos folículos tireoidianos. Isso poderia ser influência do exercício físico sobre o metabolismo das células foliculares com consequente ação sobre a composição do colóide. Como não foram encontrados dados semelhantes na literatura sobre estes achados poder-se-ia inferir que nos locais (onde não houve marcação para polissacarídeo)

o colóide teria sofrido algum tipo de alteração na sua composição. Ainda no colóide dos grupos **DB/TR** notou-se um maior acúmulo de lipídio indicando a provável influência do DM no metabolismo de lipídios, o que corroborou dados da literatura (NADEU et al, 1985) que registraram que a falta da insulina alteraria o metabolismo dos carboidratos, dos lipídios e das proteínas nos organismos, tornando, então necessária à presença da insulina para garantir a entrada de quantidades adequadas de glicose nas células.

Na tireoide dos indivíduos do grupo diabético sedentário e tratado com aminoguanidina (**DB/SD-AG**) foram observadas alterações semelhantes àquelas do grupo diabético sedentário (**DB/SD**) o que sugeriu que a aminoguanidina não provocou modificações morfohistológicas no tecido tireoidiano dos indivíduos diabéticos, bem como não alterou a fisiologia da atividade tireoidiana, visto que nesses indivíduos ficou caracterizada a pouca produção de colóide e, portanto, a pouca atividade de síntese e de secreção dos hormônios tireoidianos.

No grupo **DB/SD-AG** observou-se positividade mediana no interior dos folículos tireoidianos, indicando influência da aminoguanidina na síntese de proteínas. Outra alteração foi nas células parafoliculares, cujo citoplasma apresentou-se mais reativo à marcação de proteínas, indicando a maior produção de elementos protéicos. Para os polissacarídeos o colóide apresentou pontos com ausência de marcação, indicando diferença na sua composição. Devido à ausência de dados na literatura sobre a exposição à aminoguanidina, pode-se apenas afirmar que a concentração aqui utilizada (1g/L) provocou alterações histoquímicas nos folículos tireoidianos.

Na tireoide dos indivíduos do grupo diabético treinado e tratado (**DB/TR-AG**) foi observado que as células foliculares apresentaram-se similares as do grupo diabético treinado (**DB/TR**), confirmando o auxílio que o exercício físico moderado traz no tratamento dos efeitos causados pelo diabetes (GOBATTO, 1993; LEME et al, 2009), além de sugerir um possível restabelecimento da atividade funcional da tireoide na produção de colóide (DE ANGELIS et al, 2006). Para a marcação de polissacarídeo as células foliculares apresentaram fraca marcação, foi notada também diferença na coloração do colóide, indicando possível influência do tratamento na

composição do pré-hormônio. Com a técnica de Baker notou-se um colóide fracamente marcado, assim com o grupo **C/SD**, indicando assim a influência do exercício físico concomitante com o tratamento com a aminoguanidina na diminuição dos efeitos negativos da DM, afinal muitos estudos mostraram a forte evidência benéfica do exercício físico em pacientes portadores de inúmeras doenças (DELBIN, 2009) e mostrando também que um agente anti-AGE (aminoguanidina) e antioxidante previne a formação de ROS e peroxidação lipídica nas células e tecidos (GIARDINO et al., 1998; THORNALLEY, 2003).

*Conclusão*

---

---



## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

A aminoguanidina não demonstrou atividade hepatotóxica nos ratos submetidos ao tratamento **DB/SD-AG** e **DB/TR-AG**, ou seja, não provocou nenhuma alteração morfohistológica e histoquímica no fígado, quando utilizada na concentração de 1g/L como aplicada neste estudo. Foram observadas apenas alterações causadas pelo diabetes (diminuição no tamanho das células hepáticas e no número de células de Kupffer, significando diminuição do metabolismo) e pelo exercício físico (hipertrofia dos hepatócitos e aumento no número de células de Kupffer, demonstrando o aumento do metabolismo).

A aminoguanidina não causa alteração morfohistológica na tireoide dos ratos submetidos ao tratamento aparentemente, mas afeta sua composição química, provocando o aumento de acúmulo de polissacarídeos nos grupos **DB/SD-AG** e **DB/TR-AG** e, concomitantemente com o exercício físico provoca à diminuição do acúmulo de lipídio no colóide no grupo **DB/TR-AG**.

Foi possível notar também que a prática regular de exercícios físicos moderados amenizou e reduziu os efeitos prejudiciais oriundos do diabetes (nos grupos **DB/TR** e **DB/TR-AG**), aproximando os indivíduos diabéticos das características celulares dos indivíduos normais, tais como tamanho celular e nuclear, assim como a composição química das células hepáticas e tireoidianas nos animais aqui estudados.

# *Referências Bibliográficas*

---

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABC DA SAÚDE, **Rim e Diabete Melito**, Porto Alegre – RS [2001]. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?367>>. Acesso em: 15 mar 2012.

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes research and clinical practice**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE, ACSM stand position on the appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Medicine Science Sports Exercise**. Volume 33 pag 2145-2156. Indianapolis USA, 2001

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, ADA Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus , **Diabetes Care**, volume 34 suplemento 1, Buregard, Santa Alexandria, 2011

ARKINSTALL, M. J.; BRUCE, C. R.; CLARK, S. A; *et al.* Regulation of fuel metabolism by preexercise muscle glycogen content and exercise intensity. **Journal of Applied Physiology**, v. 97, n. 6, p. 2275-83, 2004.

ASHARAF, M.; ZHAI, X. Patophysiology of myocardial reperfusion injury: role of oxygen free radicals. **Transplantation Proceedings**, v. 27, p. 2000-2001, 1995.

AUMULLER, G.; AUST, G.; DOLL, A.; ENGELE, J.; KIRSCH, J; MENSE, S.; *et al.*, **Anatomia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BAHNAKS, B. R.; GOLD, A. H. Effects of Alloxan Diabetes on the Turnover of Rat Liver Glycogen Synthase. **Journal Biological Chemistry**, v. 257, n. 15, p. 8775-8780, 1982.

BAKER, J. R. The histochemical recognition of lipine. **Quarterly Journal of Microscopical Science**. v. 87, p. 441-70. 1946.

BAYNES, J. W. The Maillard Hypothesis on Aging : Time to Focus on DNA. **New York**, v. 959, p. 360-367, 2002.

BERGER, B. M.; HAGG, S.; RUDERMAN, N. B. Glucose Metabolism in Perfused Skeletal Muscle. **Biochemical Journal**, v. 146, p. 231-238, 1975.

BIERHAUS, A, HUMPERT, P. M., MORCOS, M. *et al.* Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products **Journal of Molecular Medicine** v83, p 876–886.2005

BIERHAUS, A; HOFMANN, M. A; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998.

BILLAT, V.; LEPRETRE, P.-M.; HEUGAS, A.-M. *et al.* Training and bioenergetic characteristics in elite male and female Kenyan runners. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 2, p. 297-304; discussion 305-6, 2003.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; KOONEY, A.; ULRICH, P.; CERAMI, A. Aminoguanidine Prevents Diabetes-Induced Arterial Wall Protein Cross-Linking. **Science**, v. 232, p. 1629–1632, 1986.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-25, 2005.

CARVALHO, H. F.; COLARES-BUZATO, C. B. **Células: Uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005. 495 p.

CERSOSIMO, E. Fisiologia da Nutrição. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1987. 91 p.

CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Revista Brasileira De Medicina**, v. 10, n. 4, p. 319-324, 2004.

CLORE, J. N.; POST, E. P.; BAILY, D. J.; NESTLER, J. E.; BLACKARD, W. G. Evidence for increased liver glycogen in patients with noninsulindependent diabetes mellitus after a 3-day fast. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.74, n.3, p. 660-666, 1992.

CORIGLIANO, G.; IAZZETTA, N.; CORIGLIANO, M.; STROLLO, F. Blood glucose changes in diabetic children and adolescents engaged in most common sports activities. **Acta Bio-medica**, v. 77 Suppl 1, p. 26-33, 2006.

CORMAN, B.; DURIEZ, M.; POITEVIN, P. *et al.* Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 3, p. 1301-6, 1998.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, p. 847-858, 2006.

DE ANGELIS, K.; PUREZA, D. Y. DA; FLORES, L. J. F. *et al.* Efeitos Fisiológicos do Treinamento Físico em Pacientes Portadores de Diabetes Tipo 1. **Endocrinology And Metabolism**, v. 50, p. 1005-1013, 2006.

DE VRIESE, A S.; VERBEUREN, T. J.; VOORDE, J. VAN DE; LAMEIRE, N. H.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction in diabetes. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 5, p. 963-74, 2000.

DELBIN, M. A. **Reatividade vascular de artérias mesentérica e pulmonar de ratos após isquemia/reperfusão pulmonar: efeito do treinamento físico**. 2009. 89f . Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista- UNESP, Rio Claro, 2009.

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

EVANS, W. J.; CAMPBELL, D. C.-. Nutrition, exercise, and healthy aging. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 97, p. 632-638, 1997.

FERRANNINI, E.; MANFREDINI, G. Influence of Long-Term Diabetes on Liver Glycogen Metabolism in the Rat. **Metabolism**, v. 39, n. 10, p. 1082-1088, 1990.

FISHER, G. H.; WELLEN, S. L.; KLIMSTRA, D. *et al.* Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. **Genes & Development**, p. 3249-3262, 2001.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Below the Radar: Advanced Glycation End Products that Detour "around the side". **Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 123-134, 2005.

FOSTER, D. From glycogen to ketones – and back, Banting Lecture. **Diabetes**, v.33. p. 1188. 1984.

FREDERIKS, W.M; KOOJI, A.; BOSCH, K.S. Role of xanthine oxidase activity in tissue damage of rat liver after ischemia. **Transplantation Proceedings**, v. 27, p. 2855-2856, 1995.

GARCIA-VALDECASAS, J. C. *et al.* Prostacyclin, thromboxane, and oxygen free radicals and postoperative liver function in human liver transplantation. **Transplantation**, v. 60, p. 662-667, 1995.

GIANNINI, C.; GIORGIS, T.; MOHN, A.; CHIARELLI, F. Role of physical exercise in children and adolescents with diabetes mellitus. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 2, p.173-184, 2007.

GIARDINO, I.; FARD, A. K.; HATCHELL, D. L.; BROWNLEE, M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes**, v. 47, n. 7, p. 1114-20, 1998.

GOBATTO, C. A. **Alterações metabólicas decorrentes do treinamento físico em ratos previamente desnutridos e recuperados.** Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. 122p, 1993.

GOBATTO, C.A. **Estudo das adaptações metabólicas ao treinamento físico em ratos adultos de ambos os sexos.** (Monografia apresentada à Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Rio Claro, como requisito parcial para a obtenção do título de licenciado em Educação Física). Rio Claro: Unesp. 1989. 44p

GOLDBERG, T.; CAI, W.; PEPPA, MELPOMENI; *et al.* Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 8, p. 1287-91, 2004.

GUYTON, A.C. **Fisiologia Humana**. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 800p.

HALLIWELL B, CROSS CE, GUTTERIDGE JMC. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, p. 598-620, 1992.

HECK, H. D. A.; CASANOVA-SCHMITZ, M.; DODD, P. B.; SCHACHTER, E. N.; WITEK, T. J.; TOSUN, T. Formaldehyde (CH<sub>2</sub>O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH<sub>2</sub>O under controlled conditions. **American Industrial Hygiene Association Journal**, v. 46, n. 1, p. 1-3. 1985

HENLE, T.; AGEs in foods: Do they play a role in uremia? **Kidney International** v 63, p.S145–S147,2003

HIGASHI Y, YOSHIKUNI M., Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n 1, p. 87-96, 2004

HINTON, D.E.; LAURÉN D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In **Biom. of Environ. Contamin.** (ed By J. F. McCarthy and L.R. Shuggart) Lewis Publishers, Boca Raton, FL. p. 17-57.1990.

HUEBSCHMANN, A. G.; REGENSTEINER, J. G.; VLASSARA, HELEN; REUSCH, J. E. B. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes care**, v. 29, n. 6, p. 1420-32, 2006.

HULL, S. S.; VANOLI, E.; ADAMSON, P. B. *et al.* Brief Communications Exercise Training Confers Anticipatory Protection From Sudden Death During Acute Myocardial Ischemia. **Journal of the American Heart Association**, v. 89, p. 548-552, 1994.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; CHAUDHURI, G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 244, n. 1, p. 181-9, 1988.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological research**, v. 53, n. 2, p. 131-42, 2004.

JUNQUEIRA, L. C. U. ; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p. 230-290.

KIKKAWA, T.; ISHIMATSU, A.; KITA, J. Acute CO<sub>2</sub> tolerance during the early developmental stages of four marine teleosts. **Environmental toxicology**, v. 18, n. 6, p. 375-82, 2003.

KIM, W.; HUDSON, B. I.; MOSER, B. *et al.* Receptor for advanced glycation end products and its ligands: a journey from the complications of diabetes to its pathogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 553-61, 2005.

KINGWELL, B. A. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise : effects of training in health and. **The FASEB Journal**, p. 1685-1696, 2000

KNOWLER, W. C.; FOWLER, S. E.; HAMMAN, R. F.; CHRISTOPHI, C. A.; HOFFMAN, H. J.; BRENNEMAN, A. T.; BROWN-FRIDAY, J. O.; GOLDBERG, R.; VENDITTI, E.; NATHAN, D. N.; Diabetes prevention program research group 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Programs Outcomes Study . **Lancet**. v. 374, n. 9707, p:1677-1686, 2009.

KOJDA, G.; HAMBRECHT, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovascular research**, v. 67, n. 2, p. 187-97, 2005.

KUMAR, V.; ROBBINS, S. T.; COTRAN, R. S. **Patologia Básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008.

LAPOLLA, A.; FEDELE, D.; TRALDI, P. Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. **International Journal of Clinical Chemistry**, v. 357, n. 2, p. 236-50, 2005.

LEHNINGER, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier. 2004. 1232p.

LEME, J. A., GOMES R. J., de MELLO, M. A., Luciano, E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. **Growth Factors**, v. 25, n. 1, p. 9-14, 2007.

LERCO, M. M.; SPADELLA, T. S.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus , induzido pela aloxana em ratos . **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132- 142, 2003.

LIEBER, E; SMITH, G. B. L The Chemistry of Aminoguanidine and Related Substances. **Chemical Reviews**, 25 (2), pp 213–271, 1939

LORUSSO, R.; PENTIRICCI, S.; RADDINO, R. *et al.* Influence of Type 2 Diabetes on Functional and Conduits. **Diabetes**, v. 52, p. 2814-2820, 2003.

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

MANCHADO, F. D.; GOBATTO, C. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M.; MELLO, M. A. R. Journal of Exercise Physiology online. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 8, n. 4, p. 29-35, 2005.

MCARDLE, W.; KATCH, F.; KATCH, V.; **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998

MENDEZ, J. D. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. **Gaceta Médica de México**, v. 139, n. 1, p. 49-55, 2003.

MONNIER, V. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 1-15, 2003.

MONNIER, V. M.; SELL, D. R.; GENUTH, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 567-81, 2005.

MORRIS, J. N.; POLLARD, R.; EVERITT, M. G.; CHAVE, S. P. W. Vigorous Exercise in Leisure-Time: Protection Against Coronary Heart Disease. **Work**, 1980.

NADEU, M.; PERONNET, F. **Fisiologia Aplicada na Atividade Física**. São Paulo: Manole. 1985. 243 p

NICHOLLS, S. J.; TUZCU, E.M.; KALIDINDI, S.; WOLSKI, K.; MOON, K. W.; SIPAHI, I; et al., Effect of diabetes on progression of coronary atherosclerosis and arterial remodeling: a pooled analysis of 5 intravascular ultrasound trials. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 52, n.4, p. 255-62. 2008.

NILSSON, B. O. Biological effects of aminoguanidine: an update. **Inflammation research**, v. 48, n. 10, p. 509-15,1999.

OLIVEIRA, L. M. **Histopatologia de fígados de peixes Oreochromis niloticus expostos em águas e sedimentos do rio Guaecá – São Sebastião, SP – Impactado pelo vazamento do oleoduto OSBAT**. Monografia do curso de bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Rio Claro – São Paulo, p. 40-46, 2006.

OREDSON, S.; PLATE, G.; QVARFORDT, P. Reperfusion injury in skeletal muscle. **Transplantation Proceedings** v. 27, p. 2831-2833, 1995.

OSTERGARD, T.; JESSEN, N.; SCHMITZ, O.; MANDARINO, L. J. The effect of exercise, training, and inactivity on insulin sensitivity in diabetics and their relatives: what is new? **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 3, p. 541-8, 2007.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Livingstone: Churchill, 1985, p.123-214.



PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works. **Clinical Diabetes**, v. 21, n. 4, p. 186-187, 2003.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 5A, p. 11G-18G, 2002.

REMEDIO, R. N. **Alterações Histoquímicas e ultraestruturais do fígado e intestino grosso de ratos diabéticos tipo I e os efeitos do treinamento físico**. 2010. 56f. Monografia do curso de bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Rio Claro – São Paulo, 2010.

RHODES, L.D., MYERS, M.S., GRONLUND, W.D., MCCAIN, B.B., Epizootic characteristics of hepatic and ranal lesions in English sole, *Parophris vetulus*, from Puget Sound. **Journal of Fish. Biology**. v. 38, p. 395-407. 1987.

ROSS, M. H., PAWLINA, W. **Histologia Texto e Atlas - em correlação com Biologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SESSA, F.; SOLCIA, E.; CAPELLA, C.; BONATO, M. SCARPA, A.; ZAMBONI, G.; PELLEGGATA, N. S. G. RANZANI, G. N. Intraductal papillary-mucinous tumours represent a distinct group of pancreatic neoplasms: an investigation of tumour cell differentiation and K-ras, p53 and c-erbB-2 abnormalities in 26 patients. **Virchows Archiv**. v. 425, n. 4, p. 357-367. 1994

SHEN, W.; LUNDBORG, M.; WANG, J. *et al.* Role of EDRF in the regulation of regional blood flow and vascular resistance at rest and during exercise in conscious dogs. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 1, p. 165-72, 1994.

SISCOVICK, D. S.; WEISS, M. D.; FLETCHER, R. H.; LASKY, T. The Incidence of Primary Cardiac Arrest during Vigorous Exercise. **The New England Journal of Medicine**, v. 311, p. 874-877, 1984.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, **Retinopatia diabética**, São Paulo - SP [2011]. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/component/content/article/116-complicacoes-cronicas/130-retinopatia-diabetica>>. Acesso em: 15 mar 2012.

STOPPA, G. R.; CESQUINI, M.; ROMAN, E. A F. R.; OGO, S. H.; TORSONI, M. A. Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 12, p. 1352-61, 2006.

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B. R. Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 28, n. 2, p. 299-323, 2003.

SZABÓ, C.; FERRER-SUETA, G.; ZINGARELLI, B. *et al.* Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9030-6, 1997.

TANCREDE, G.; ROSSEAU-MIGNERON, S.; NADEU, A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin – induced Diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 31, n. 1, p. 406-409, 1982.

TEH, S. J.; ADAMSB, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51-70, 1997.

THORNALLEY, P. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 31-40, 2003.

VALLANCE OWEN, J. Liver glycogen in diabetes mellitus. **Journal of Clinical Pathology**, v. 5, n. 1, p. 42-53, 1952.

WANG J, WOLIN MS, HINTZE TH. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circulation Research*, v. 73, p. **829-838**, 1993

WHITTON, P. D.; HEMS, D. A. Glycogen synthesis in the perfused liver of streptozotocin-diabetic rats. **The Biochemical Journal**, v. 150, n. 2, p. 153-65, 1975.

WOODMAN, C. R.; MULLER, J. M.; LAUGHLIN, M HAROLD; *et al.* Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs skeletal muscle feed arteries Induction of nitric oxide synthase mRNA in coronary resistance arteries isolated from exercise-trained pigs. **The American Physiological Society**, p. H2574- H2579, 1997.

YOSHIZUMI, H. E. Forearm endothelial function and bone mineral loss in postmenopausal women. **Atherosclerosis**. v. 176, p. 387–392, 2004.

ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Células Endoteliais. In: CARVALHO, H. F.; COLARES-BUZATO, C. B. (Org.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**, São Paulo: Manole, 2005. p. 184-191.

---

**Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo**

---

**Edmara Tereza Meira e Nico**