

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO PRÉVIO SOBRE A SEVERIDADE DO
DIABETES INDUZIDO POR DOSE ÚNICA DE ALOXANA EM RATOS**

JULIO WILSON DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do campus Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade (Área
de Motricidade Humana)

RIO CLARO

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro de 2000

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO PRÉVIO SOBRE A SEVERIDADE DO
DIABETES INDUZIDO POR DOSE ÚNICA DE ALOXANA EM RATOS**

JULIO WILSON DOS SANTOS

Orientadora: Profa. Dra. MARIA ALICE ROSTOM DE MELLO

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do campus Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Motricidade (Área
de Motricidade Humana)

RIO CLARO

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro de 2000

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	04
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3.1. Insulina e Metabolismo glicídico.....	05
3.1.1. <i>Secreção de Insulina</i>	05
3.1.2. <i>Ação da Insulina</i>	07
3.1.3. <i>Diabetes Mellitus</i>	08
3.1.4. <i>Diabetes Experimental</i>	10
3.1.4.1. <i>Ação da Aloxana nas Ilhotas Pancreáticas</i>	10
3.2. Treinamento Físico	11
3.2.1. <i>Treinamento Físico e Insulina</i>	11
3.2.2. <i>Treinamento Físico, Prevenção e Controle da diabetes</i>	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. Animais.....	16
4.2. Procedimentos e Grupos Experimentais.....	16
4.3. Treinamento Físico.....	19
4.4. Avaliação do Condicionamento Físico dos Animais.....	19
4.5 - Indução do Diabetes: administração da Aloxana ou Tampão Citrato.....	20
4.6. Avaliação da Severidade do Diabetes.....	20
4.7. Avaliação da Secreção e da Ação Periférica da Insulina.....	21
4.7.1. <i>Teste de Tolerância à Glicose (GTT_o)</i>	21
4.7.2. <i>Teste de Tolerância à Insulina (ITT_{sc})</i>	22

4.8. Métodos Analíticos.....	22
4.8.1. <i>Glicogênio Hepático.....</i>	22
4.8.2. <i>Extração da Insulina Pancreática.....</i>	23
4.8.3. <i>Insulina dos Extratos Pancreáticos Séricos.....</i>	23
4.8.4. <i>Proteínas Musculares Totais.....</i>	23
4.8.5. <i>Glicose Sérica.....</i>	24
4.8.6. <i>Lactato Sangüíneo.....</i>	24
4.8.7. <i>Ácidos Graxos Livres.....</i>	25
4.8.4. <i>Proteínas Séricas Totais.....</i>	25
4.9. Procedimentos Estatísticos.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Parâmetros Avaliados antes da Administração da Aloxana.....	27
5.1.1. <i>Ingestão Alimentar no Início e Após 60 dias de Experimento.....</i>	27
5.1.2. <i>Avaliação do Condicionamento Físico dos Animais.....</i>	27
5.2. Parâmetros Avaliados após a Administração da Aloxana.....	30
5.2.1. <i>Parâmetros Avaliados antes do Sacrifício dos Animais.....</i>	30
5.2.1.1. <i>Administração da Aloxana e Indução do Diabetes</i>	30
5.2.1.2. <i>Peso Corporal, Ingestão Alimentar e Hídrica.....</i>	30
5.2.1.3. <i>Teste de Tolerância á Glicose oral (GTT_o).....</i>	32
5.2.1.4. <i>Teste de Tolerância á Insulina subcutâneo (ITT_{sc}).....</i>	37
5.2.2. <i>Parâmetros Avaliados após o Sacrifício dos Animais.....</i>	39
5.2.2.1. <i>Parâmetros Sangüíneos.....</i>	39
5.2.2.2. <i>Parâmetros Teciduais.....</i>	39
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	51
8. REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE.....	57

RESUMO

Atualmente tem se dado muita importância à atividade física na promoção da saúde. No caso da diabetes Mellitus, estudos realizados tanto com modelos experimentais com ratos ou com humanos têm demonstrado que o treinamento físico melhora o quadro geral da diabetes. Contudo, até o presente tais estudos têm abordado os efeitos do treinamento físico quando o quadro diabético já se encontra instalado. Dessa forma nosso objetivo foi verificar se o treinamento físico realizado previamente poderia exercer efeito protetor contra ação diabetogênica da aloxana em ratos. Foram utilizados neste estudo ratos machos Wistar (30 dias) separados inicialmente em dois grupos: Treinados (T, n=12, animais que realizaram exercício de natação 1h/dia, com sobrecarga de 5% do peso corporal p.c.); Sedentários (S, n=22, animais que não foram submetidos a nenhum tipo de treinamento físico). Ao final de 60 dias foram compostos 3 novos grupos experimentais: T-ALO (n=12, animais treinados que receberam aloxana, 30 mg/Kg pc); S-ALO (n=14, animais sedentários que receberam aloxana, 30 mg/Kg pc) e S-CIT (n=8, animais sedentários que receberam apenas tampão citrato). Foram realizados Testes de Tolerância à Glicose oral (GTT_o), com determinação da área sob a curva de glicose (AG) e insulina (AI) e, e à Insulina (TTI_{sc}) com determinação da Taxa de remoção de glicose (Kitt), assim como a determinação dos teores séricos de Glicose (GS), Insulina (IS), Proteínas Totais (PT), e ácidos graxos livres (AGL) e dos teores teciduais de Proteínas Musculares (PM), glicogênio Muscular (GM) e Hepático (GL), Insulina Pancreática (IP) foram feitas. A incidência de diabetes (glicemia no estado alimentado > 13,75) não diferiu entre os grupos T-ALO e S-ALO. IS, AGL, GL foram semelhantes nos três grupos estudados. PT foi inferior em T-ALO com relação a

S-CIT, ocorrendo o inverso com GS. O Kitt de T-ALO foi maior em relação a S-ALO, enquanto que o GM do T-ALO foi maior do que o de S-CIT. Estes últimos resultados indicam que adaptações duradouras, ao nível muscular, proporcionadas pelo treinamento físico prévio exerceram algum efeito protetor contra a ação deletérica da aloxana.

ABSTRACT

Today there is an increasing interest about the effects of physical activity in promoting health. With respect to Diabetes Mellitus, studies performed both in human and experimental models indicate attenuation of the diabetic picture with physical training. However, most of these studies were carried out diabetes when already have been installed. There is little information whether physical activity can prevent or attenuate the appearance of diabetes as well as its complications. The present study was designed to evaluate if previous physical training would be able to attenuate the diabetogenic effects of alloxan in rats. Male Wistar (30 days old) were separated in 2 groups: Exercise Trained (T, n=12, animals exercised in swimming 1h/day, supporting an overload of 5% of body weight and Sedentary (S, n=22, animals not submitted to physical training). At the end of 60 days, 3 new experimental groups were formed: T-ALO (n=12, trained animals injected i.v. with alloxan, 30 mg Kg/body weight); S-ALO (n=14, sedentary animals injected i.v. with alloxan) and S-CIT (n=8, sedentary animals injected with vehicle -citrate buffer-). The following evaluation were performed: oral glucose test tolerance (GTT_o), with determination of the areas under serum glucose (AG) and serum insulin (AI) curves; subcutaneous insulin tolerance test (ITT_{sc}), with determination of serum glucose disappearance rate (Kitt); serum levels, in the fed state, of: glucose (SG), insulin (SI), total protein (TP) and free fatty acid (FFA); muscle protein (MP) liver glycogen (LG), muscle glycogen (MG) and pancreas insulin (PI). Diabetes incidence (serum glucose in the fed state $\geq 13,75$ mM) was not different between T-ALO and S-ALO rats. SI, FFA and LG were similar for all studied groups. Kitt was higher in T-ALO than in S-ALO while MG was higher in T-ALO than in S-

CIT. These two last results demonstrate that lasting adaptations to physical training counteracted some diabetogenic effects of alloxan.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente tem se dado muita importância à atividade física como forma de melhorar o nível de aptidão física e a qualidade de vida. O exercício físico regular tem sido recomendado no processo de prevenção e reabilitação de doenças cardiorespiratórias, osteoporose, diabetes e no combate ao estresse. ASTRAND (1991) cita em uma ampla revisão sobre os benefícios da atividade física no organismo humano, onde fatores extrínsecos como a dieta e o exercício físico regular são essenciais para uma ótima função do corpo humano e que os mesmos influenciam nas estatísticas de mortalidade, especialmente no caso dos idosos.

No caso da diabetes mellitus, estudos têm demonstrado que a atividade física melhora o quadro do diabetes em modelo experimental com ratos (LUCIANO, 1991; LUCIANO & LIMA, 1997) sendo também recomendado na prevenção e terapia da doença em humanos (WALLBERG-HENRIKSSON, 1992; KRISKA et al., 1994).

É importante destacar que a diabetes mellitus é caracterizada por um quadro de hiperglicemia, resultante de uma relativa ou absoluta deficiência de secreção de insulina. A diabetes mellitus pode ser classificada em dois grupos, de acordo com a quantidade de secreção de insulina, ou seja, a ausência ou presença da funcionalidade das células beta da ilhotas pancreáticas de Langerhans (WILSON & FOSTER, 1992; IVY et al., 1999).

A Diabetes Mellitus Insulino Dependente (DMID), também chamada do tipo I, é resultado da destruição autoimune da célula beta, que é suficientemente completa, havendo uma deficiência na produção de insulina que resulta em cetoacidose e

hiperglicemia (EIZIRICK, 1995). Neste caso, o tratamento com insulina, atividade física e controle da dieta através de reeducação alimentar permite ao paciente diabético manter uma vida produtiva dentro de padrões normais. Contudo, uma percentagem destes pacientes eventualmente desenvolvem ao longo da vida complicações como nefropatia, retinopatia, neuropatia que aumentam o risco das doenças cardiovasculares, diminuindo a qualidade e a expectativa de vida (WILSON & FOSTER, 1992; IVY et al., 1999).

Já na Diabetes Mellitus Não Insulino Dependente (DMNID), a do tipo II, a produção endógena de insulina é suficiente para prevenir a cetoacidose, mas não para manter os níveis glicêmicos normais, não ocorrendo uma destruição autoimune das células beta (WILSON & FOSTER, 1992; IVY et al., 1999). A diabetes do tipo II é a mais comum, ocorrendo entre 90 e 95% dos casos de diabetes, com maior incidência em pessoas obesas (KRISKA et al., 1994)

Através de pesquisas realizadas com modelos experimentais em animais demonstrou-se que o treinamento físico age como atenuador dos sintomas da diabetes. No caso da diabetes em seres humanos, a atividade física também tem sido indicada como terapia no tratamento da doença, favorecendo o equilíbrio metabólico. A atividade física deve ser realizada conjuntamente com controle da dieta e insulina, nos casos dos pacientes dependentes de insulina exógena. É importante destacar que a atividade física aumenta o efeito da insulina, porém só reduz a glicemia em casos que ainda exista alguma síntese de insulina pelo organismo, caso da DMNID (LUCIANO, 1991; MANSON, 1999).

Os programas de atividade física desenvolvidos para pacientes diabéticos devem ser de intensidade leve a moderada, com objetivo de controlar a glicemia, uma vez que o treinamento físico aumenta a sensibilidade do músculo à insulina,

aumentando sua ação, e diminui a secreção de insulina estimulada pela glicose (ZAWALICH et al., 1982; FARRELL et al., 1992).

No entanto, deve-se tomar muito cuidado com a atividade física para pacientes severamente insulino dependentes, quanto à duração e intensidade do exercício, o estado alimentar e a qualidade da alimentação, uma vez que o exercício físico pode conduzir a um quadro de hipoglicemia.

2. OBJETIVOS

Apesar de existirem diversos estudos abordando os efeitos do exercício físico sobre os sintomas da diabetes, poucos trabalhos foram realizados com animais antes da instalação do quadro diabético. Dentro deste contexto, procuraremos estudar os efeitos do treinamento físico prévio sobre a instalação da diabetes induzido pela aloxana em modelo experimental utilizando ratos. Para atingir esse objetivo utilizamos dosagem única de aloxana, administrada a ratos sedentários e previamente treinados através do exercício de natação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Insulina e Metabolismo Glicídico

3.1.1. Secreção de Insulina

A secreção de insulina pelas células beta das ilhotas pancreáticas desempenha papel fundamental no controle da glicemia e, por sua vez, a variação da concentração de glicose no líquido extracelular representa um dos controles mais importantes sobre a liberação de insulina (GRODSKY, 1989; MORGAN, 1981).

O processo de secreção de insulina estimulado por glicose consiste numa seqüência de etapas que se inicia com o reconhecimento do secretagogo pela célula β das ilhotas, através de sua metabolização, passando pelo aumento da concentração citosólica do íon cálcio e ativação do sistema de microtúbulos e miofilamentos e finalizando com a liberação do hormônio.

A estimulação pancreática com glicose resulta em secreção de insulina em três fases distintas (GRODSKY, 1989; MORGAN, 1981). Na primeira fase de liberação de insulina, após a exposição à glicose, ocorre um pulso imediato de liberação de insulina, que atinge seu pico em 1 minuto, voltando a linha de base logo em seguida (BERNE & LEVY, 1996). A secreção de insulina através da estimulação de glicose, parece estar relacionada à utilização do substrato pelas células beta, como consequência da liberação de íons hidrogênio e do aumento na razão de ATP/ADP gerados por tal utilização

(MALAISSE, 1972; MALAISSE, 1976; MALAISSE et al., 1979a; MALAISSE, 1979b; MALAISSE et al., 1981).

A presença da glicose causa despolarização da membrana da célula β desencadeando potenciais de ação. A despolarização da membrana e a descarga do potencial de ação decorrem da redução da permeabilidade da membrana ao íon K^+ , envolvendo canais de potássio ATP-dependentes (BOSCHERO et al. 1988). Essa descarga de potencial de ação induz elevação do teor de cálcio citosólico que ocorre principalmente inibição do efluxo do íon a partir da célula e da mobilização ou da redução do seqüestro do mesmo pelas organelas intracelulares (MALAISSE, 1972; MALAISSE, 1978). O cálcio acumulado no interior da célula ativa o sistema de microtúbulos microfilamentos finalizando na migração de vesículas, contendo insulina, em direção a membrana plasmática e extrusão do conteúdo granular para o líquido intersticial (MORGAN, 1981).

O cálcio citosólico e a secreção de insulina aumentam até serem ativados mecanismos que reagem contra o aumento de cálcio no citoplasma, o que resulta na conseqüente diminuição da secreção de insulina (HENQUIN 1979; KIKUCHI et al., 1979).

Na Segunda fase, se o estímulo de glicose persistir ocorre influxo de cálcio para o interior da célula através de canais de cálcio voltagem-dependentes, resultando num aumento gradual da secreção de insulina (GRODSKY, 1989). Nesta fase a elevação da secreção de insulina é mais lenta, atingindo um segundo patamar, após 10 minutos de estimulação contínua de glicose (BERNE & LEVY, 1996). O índice de secreção permanece elevado por um período de tempo mais prolongado MORGAN (1981); KANATSUKA et al. (1987), que pode ser mantido por horas em pessoas normais (BERNE & LEVY, 1996).

Mais recentemente foi observada uma terceira fase na secreção de insulina, onde ocorre um declínio espontâneo da secreção durante 24 horas de exposição do pâncreas à glicose, sendo que os mecanismos reguladores responsáveis por esta terceira fase secretória de insulina ainda são poucos conhecidos (GRODSKY, 1989).

3.1.2. *Ação da Insulina*

As ações da insulina, em nível celular iniciam-se através da ligação a um receptor de membrana, que se encontra em todos os tecidos dos mamíferos. O receptor apresenta subunidades extracelulares que tem como função fazer o reconhecimento do hormônio e ligar-se a ele, e subunidades intracelulares citoplasmática que possui atividade enzimática tirosina quinase, que fosforilizam seus substratos ativando-os através de um sinal transmembrana (KAHN & WHITE, 1988).

O receptor de insulina é constituído de quatro subunidades: duas subunidades alfa extracelulares, que possuem sítios para ligação com a insulina, e duas subunidades beta, que se encontram em sítios transmembrana (KAHN & WHITE, 1988). A ligação da insulina à subunidade alfa promove uma alteração conformacional no receptor anulando a inibição da subunidade beta. Em seguida uma molécula de ATP se posiciona junto a um sítio de ligação do receptor, localizado na subunidade beta, intracelular, provocando a autofosforilação do receptor, fazendo com que os substratos receptores de insulina, IRS-1 e shc, façam o papel de proteínas mensageiras (KHAN & WHITE, 1988; GARCIA & KANAAN, 1997).

Os substratos receptores de insulina são proteínas que contem grande número de domínios SH2, transmissoras de mensagens encontradas na tirosina quinase, fazendo a ligação entre a tirosinaquinase e outros elementos celulares (SOS; GAP; GRB2) (GARCIA & KANAAN, 1997). O efeito da insulina na célula alvo ocorre em

função da concentração plasmática e da concentração de receptores na célula. A concentração plasmática de insulina é determinada em função do ritmo de secreção do pâncreas e da depuração plasmática (MELLO, 1997).

Dentre outras funções, a insulina atua sobre o transporte de glicose através da membrana em diferentes tecidos; formação de glicogênio no fígado e nos músculos esqueléticos; glicogênese; conversão de glicose em triglicerídios; síntese de proteínas e inibição da glicogenólise (GARCIA & KANAAN, 1997).

O transporte de glicose transmembrana é iniciado por proteínas transportadoras denominadas (GLUT) que se apresentam em diferentes formas e encontram-se distribuídas em diversos tecidos: GLUT-1: glóbulos vermelhos, músculos cérebro, adipócitos, timócitos; GLUT-2: fígado, células das ilhotas pancreáticas, células epiteliais, renais e intestinais; GLUT-3: músculo esquelético fetal; GLUT-4: sensível à insulina, nas células musculares e adipócitos; GLUT-5: intestino (BERNE & LEVY, 1996). No caso do músculo estriado esquelético, predomina a isoforma GLUT-4, sendo que este transportador é ativado em resposta à insulina ou à contração muscular (RODNICK et al., 1992).

3.1.3 - *Diabetes Mellitus*

Diabéticos têm em comum a ausência completa ou parcial de secreção de insulina, independentemente da herança genética, influências ambientais, ou idade de início da doença, que impede a utilização de glicose pelas células do organismo.

O quadro clínico do diabético caracteriza-se por hiperglicemia resultante da deficiência na secreção parcial ou total de insulina. Com o aumento da concentração de glicose sangüínea ocorre elevação das cargas filtrada e excretada de glicose pelos rins, provocando glicosúria e diurese osmótica. Uma vez que o efeito osmótico impede

a reabsorção do líquido, aparece poliúria, resultando em desidratação e consequentemente polidipsia. O excesso de glicose circulante começa a aparecer na urina quando a glicemia sangüínea atinge valores acima do limiar de reabsorção de glicose pelos rins, que é de 225 mg/dL (WILSON & FOSTER, 1992; IVY et al., 1999).

Devido à diminuição da utilização de carboidratos pelo organismo ocorre uma intensa mobilização de ácidos graxos, e aminoácidos para fornecimento de energia, que são metabolizados no fígado e em outros tecidos, formando grandes quantidades de Acetil-CoA e corpos cetônicos (ac. acetoacético, cetona, D-B hidroxibutilíco), gerando cetose. A alta acidez destes compostos formados bem como o baixo limiar de excreção dificultam sua eliminação através da urina, que é feita juntamente com o íon Na^+ extracelular, essa situação leva à cetoacidose com a perda urinária excessiva de sais e glicose (WILSON & FOSTER, 1992; IVY, et al., 1999).

A redução na utilização de glicose pelo organismo, conjuntamente com a degradação de tecido adiposo e aminoácidos como fontes energéticas causam perda de peso e polifagia (GUYTON & HALL, 1996).

O quadro clínico da diabetes pode apresentar, ao longo do tempo, outras complicações, como problemas renais, arteriosclerose, hipertensão arterial, complicações cardíacas e na retina, que podem reduzir a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes diabéticos (WILSON & FORSTER, 1992; EIZIRICK, 1995). Contudo, dependendo da severidade da diabetes e a fase de diagnóstico a doença pode ser controlada, através de dieta, atividade física regular e nos casos mais graves de diabetes insulino dependente, com a administração de insulina exógena.

3.1.4. *Diabetes Experimental*

3.1.4.1. Ação da Aloxana nas Ilhotas Pancreáticas

Os primeiros experimentos na literatura relataram que a aloxana podia produzir necrose em ilhotas pancreáticas de coelhos (DUNN et al., 1943). JACOBS (1937) já havia observado que a aloxana exercia profundas alterações sobre a glicemia, mas observou somente a hipoglicemia precoce e não acompanhou os animais por tempo suficiente para notar o desenvolvimento da hiperglicemia diabética posteriormente. Logo em seguida estes achados foram confirmados por outros pesquisadores (BAILEY & BAILEY, 1943; DUNN & McLETCHIE, 1943; GOMORI & GOLDNER, 1943) e foi criada a expressão “diabetes aloxânico” (DUNN & McLETCHIE, 1943).

Foi esclarecido, em seguida, que os danos às ilhotas pancreáticas ficavam confinados às células β secretoras de insulina (DUNN et al., 1943) através de efeito direto (HELLMAN & DIDERHOLM, 1955). Segundo MALAISSE (1982) a ação diabetogênica da aloxana ocorre em função das lesões provocadas nas células β das ilhotas pancreáticas por gerar estresse oxidativo. Além disso, outros estudos indicam que a enzima glucoquinase, que funciona como uma enzima de “reconhecimento de sinais” na célula β acoplando alterações na concentração sanguínea de glicose com alterações na secreção de insulina é aparentemente a enzima mais sensível a inibição pela aloxana e pode ser o alvo primário da droga na determinação da inibição da secreção de insulina induzida por glicose (LENZEN & PANTEN, 1988).

Assim sendo, foi demonstrado que a aloxana é um composto adequado para indução de diabetes experimental em animais. No modelo experimental de diabetes aloxônico, os animais apresentam sintomas semelhantes aos encontrados no diabetes mellitus em humanos, tais como perda de peso corporal, polidipsia, polifagia, poliúria, glicosúria, cetonúria, hiperglicemia e cetonemia (LENZEN & PANTEN, 1988).

3.2. Treinamento Físico

3.2.1. Treinamento Físico e Insulina

Segundo LUCIANO (1991) e HARGREAVES (1997), o treinamento físico realizado regularmente providencia maior captação e metabolização da glicose pelo músculo, independente da ocorrência de aumento de insulina. Esta afirmação é suportada pelo estudo de TAN & BONEN (1987), que submeteram ratos ao exercício de corrida em esteira, durante seis semanas, e encontraram aumento da afinidade do músculo à insulina, da captação de glicose e da glicogênese nos ratos treinados. LEIGHTON et al. (1989) não encontraram mudanças adaptativas em função do treinamento, mas verificaram aumento na síntese de glicogênio estimulado pela insulina em músculos isolados, tanto em ratos treinados como em ratos sedentários. Já, KOKUBUN (1990), em estudo com músculos incubados de ratos submetidos ao exercício agudo encontrou aumento na captação de glicose e da síntese de glicogênio.

Com relação aos receptores de insulina, SANTOS et al. (1989) não encontraram diferença na estrutura dos receptores isolados entre músculo vermelho (bíceps femural) e branco (tensor da fascia alata) de ratos que realizaram exercício agudo em esteira e grupo controle. O número de receptores de insulina foi maior apenas no músculo vermelho, assim como a fosforilação do receptor, estimulado tanto pela insulina (autofosforilação) como por um peptídeo sintético (estimulação exógena) também apresentaram valores maiores apenas no músculo vermelho. A atividade da tirosina quinase não apresentou diferença entre os grupos.

TREADWAY et al. (1989), em experimento com ratos submetidos ao exercício crônico espontâneo, constataram que a atividade da tirosina quinase foi maior no músculo vermelho (sóleo) do que no músculo branco (gastrocnêmio), tanto no estado

basal como estimulado pela insulina. Por outro lado os autores não encontraram diferenças tanto na autofosforilação do receptor como na fosforilação exógena e também não observaram diferenças entre no “receptor binding” (número de receptores e diferença estrutural) . Tanto Santos et al. (1989) como TREADWAY et al. (1989) sugerem que o aumento da ação da insulina no músculo depende do tipo de fibras e envolvem etapas pos-receptor na via de transdução do sinal biológico da insulina.

O treinamento físico também tem sido associado ao aumento na síntese da isoforma GLUT-4, e tal aumento apresenta relação com o aumento da captação da glicose por ação da insulina (HARGREAVES, 1997). RODNICK et al. (1992), afirmam que o transportador de glicose no músculo, GLUT-4, é ativado em resposta à insulina ou à contração muscular e esse aumento da captação da glicose pelo músculo ocorre tanto em repouso sob a ação da insulina como durante a contração muscular.

O treinamento físico reduz a concentração de insulina plasmática, assim como a secreção de insulina estimulada pela glicose, tanto em ratos como no homem, causa um aumento da sensibilidade global à insulina, principalmente no músculo, não alterando a do tecido adiposo e diminuindo a do fígado (ZAWALICH et al., 1982).

FARRELL et al. (1992), em experimento com ratos confirmaram achados anteriores que tanto “in vivo” como “in vitro”, a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas era menor nos animais treinados do que nos sedentários, sugerindo alteração na resposta à insulina na própria célula β .

3.2.2. Treinamento Físico, Prevenção e Controle da Diabetes

Apesar da predisposição genética a DMNID pode ser encarada como uma doença bastante evitável e controlável, através da prática do exercício físico regular e reeducação alimentar, devido a relação direta existente entre obesidade, sedentarismo,

maus hábitos alimentares e pessoas que vêm a desenvolvem a doença (MANSON, 1999).

MANSON (1999) cita estudos realizados com diferentes populações que comprovam a importância do exercício físico, controle da dieta e manutenção do peso ideal no controle e prevenção da diabetes. Um destes estudos relata que um programa aeróbico de 26 dias de duração com dieta rica em fibras e carboidratos e reduzida porcentagem de gordura reduziram significativamente a glicemia de jejum e 39% dos pacientes que utilizavam insulina exógena e 71% que utilizavam hipoglicemiante oral passaram a não mais necessitar do medicamento.

No caso da prevenção da diabetes estudo realizado com ex-universitários por 14 anos constatou que homens obesos e inativos apresentaram risco 4 vezes maior em desenvolver diabetes do que homens magros e ativos. Mesmo exercitando apenas uma vez por semana mulheres americanas apresentaram redução de 30% no risco de contrair a DMNID, enquanto que estudo com homens ingleses demonstrou que homens fisicamente ativos reduziram em até 50% risco de contrair DMNID, quando comparados com homens inativos (MANSON, 1999).

No caso do DMID, tanto o controle do exercício físico como dieta e administração da insulina merece um controle mais exigente. O exercício físico regular pode reduzir em 30-50% a necessidade de insulina, contudo vários estudos demonstraram que o controle da glicemia não é melhorado. A intensidade do exercício deve ser muito bem controlada, pois problemas renais, oftalmológicos, cardíacos e hipertensão podem ser agravados e levar a hipoglicemia, dependendo do grau de severidade do diabetes (MANSON, 1999).

Variáveis como nível de aptidão física, duração, intensidade do exercício e o momento da realização do exercício com relação a administração de insulina e dos horários das refeições afetam diretamente as respostas metabólicas frente ao exercício.

O portador de DMID que deseja iniciar um programa de exercício físico deve obedecer algumas regras fundamentais, como controlar a glicemia constantemente; evitar o exercício ao final do dia, prevenindo uma possível hipoglicemia pós-exercício durante o sono; o exercício não deve ser realizado durante o pico de insulina (1h após a injeção); a dosagem de insulina deve ser reduzida e/ou aumentar a ingestão alimentar; evitar injeções no músculo que vai ser exercitado durante o exercício; ingestão de bebida isotônica a cada 30 minutos (60-120 calorias de carboidrato); realizar o exercício 2 a 3 horas após a refeição; evitar atividade física intensa de longa duração e exercícios resistivos com grande sobrecarga (MANSON, 1999).

Acredita-se que os benefícios de um programa de exercícios físicos para diabéticos superam os riscos, se forem tomadas todas as precauções citadas anteriormente podem trazer um efeito benéfico na qualidade de vida e longevidade do paciente. De modo geral, o exercício físico para o diabético deve ter duração de 20-45 minutos; frequência diária; intensidade média de 50% do VO_2 MAX; no início com pouca duração e número de sessões e aumento gradativo até conseguir a realização diária do exercício, uma vez que após dois dias os efeitos do exercício para o diabético começa a perder seus efeitos. Outro ponto a se destacar é que apenas 25% do pacientes diabéticos tem recebido orientação específica sobre a prática de exercício físico e seus benefícios por profissionais da área da saúde, existindo um grande espaço para atuação e conseqüente melhoria dos hábitos da prática regular do exercício físico (MANSON, 1999).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Animais

Foram utilizados ratos machos jovens (30 dias) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP - Botucatu. Os ratos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física – UNESP – Rio Claro, em gaiolas de polietileno medindo 37,0 x 31,0 x 16,0 cm (5 animais por gaiola), a temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo claro/escuro 12/12 horas, tendo livre acesso à água e ao alimento (ração balanceada para roedores, marca Purina) durante todo experimento.

4.2 - Procedimentos e Grupos Experimentais

Os animais foram separados, inicialmente, em dois grupos experimentais:

Sedentário (S, n=25): animais não submetidos ao treinamento físico durante 60 dias e, tendo apenas a movimentação espontânea nas gaiolas.

Treinado (T, n=15): animais submetidos ao protocolo de treinamento físico de natação por 60 dias.

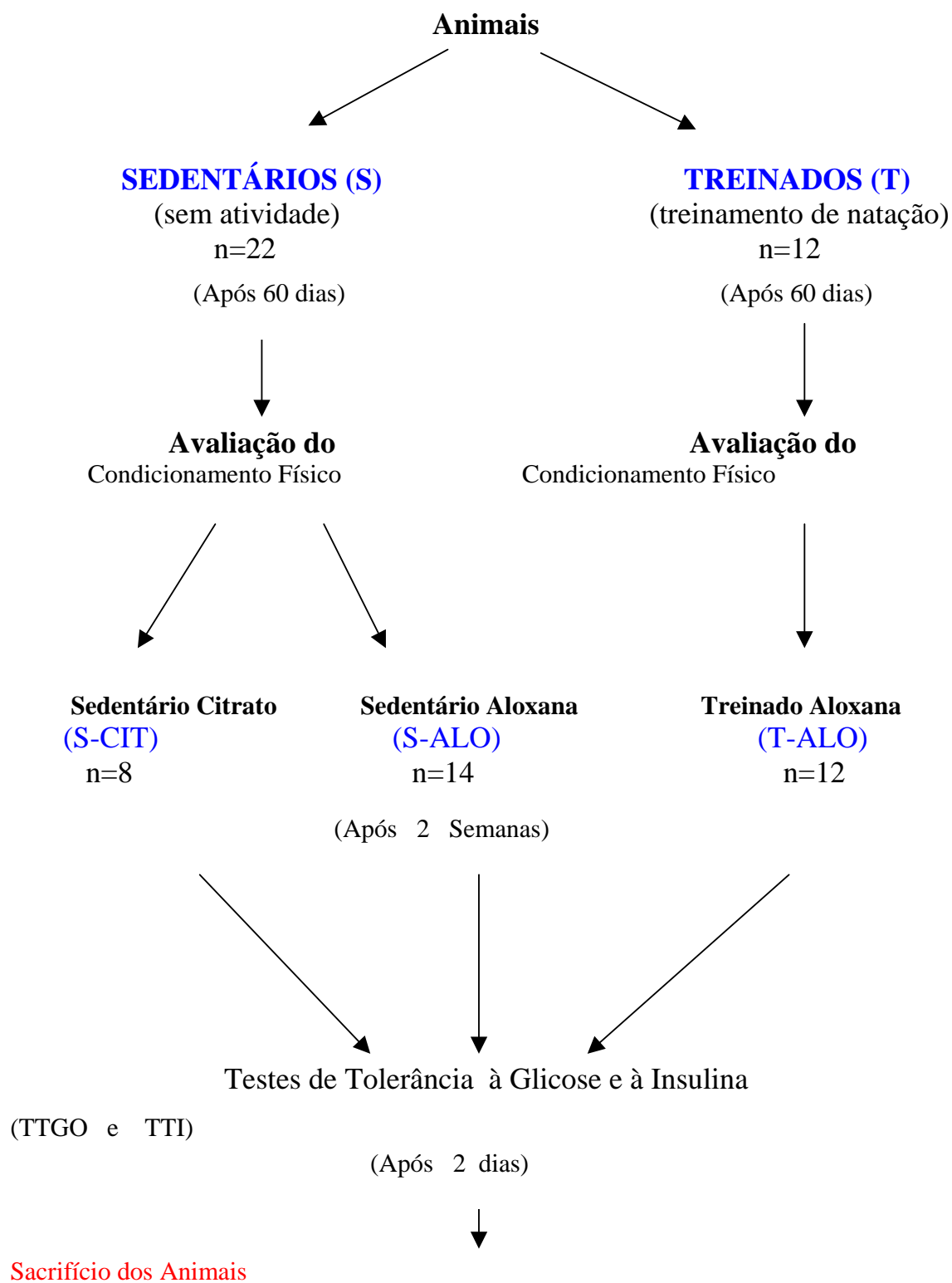
Durante o experimento os animais tiveram registrados uma vez por semana peso corporal, ingestão alimentar e ingestão hídrica. Ao final de sessenta dias, foram submetidos a uma avaliação do condicionamento físico. Três dias após avaliação do condicionamento físico foram compostos 3 grupos experimentais:

Treinado Aloxana (T-ALO, n=12): animais submetidos ao treinamento físico durante 60 dias, que receberam injeção de aloxana no 63º dia, quando o treinamento físico foi suspenso.

Sedentário Aloxana (S-ALO, n=14): animais não submetidos ao treinamento físico que no 63º dia de experimento, receberam injeção de aloxana.

Sedentário Citrato (S-CIT, n=8): animais não submetidos ao treinamento físico que no 63º dia de experimento receberam injeção de tampão citrato.

Decorrida uma semana, os animais foram submetidos às provas de função do pâncreas endócrino: teste de tolerância à glicose oral (GTT_o) e teste de tolerância à insulina subcutâneo (ITT_{sc}). Ao segundo dia após a realização dos últimos testes os animais foram sacrificados por decapitação para determinação de parâmetros bioquímicos visando avaliar a severidade do diabetes (Esquema 1).



Esquema 1- Procedimentos e Grupos Experimentais

4.3 - Treinamento Físico

O grupo dos animais treinados foi submetido ao exercício físico de natação, com duração de 1 hora por dia, cinco dias na semana, durante oito semanas, suportando uma sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal, fixado ao tronco do animal, em tanques coletivos contendo água a temperatura de 32 ± 1 °C (SANTOS et al., 1998).

Nos três primeiros dias os animais passaram por um período de adaptação: ao primeiro dia, 30 minutos de natação sem sobrecarga; ao segundo, 1 hora de natação sem sobrecarga e ao terceiro dia, trinta minutos com sobrecarga de 5% do peso corporal e trinta minutos sem sobrecarga. A partir do quarto dia, os animais passaram a realizar o protocolo de natação preestabelecido com duração de 1 hora e sobrecarga de 5% do peso corporal.

4.4 - Avaliação do Condicionamento Físico dos Animais

A avaliação do condicionamento físico dos animais foi feita através de teste de esforço com a análise do lactato sanguíneo, modificado de SANTOS et al. (1998) que consistiu de 1 hora de exercício de natação com sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal. Foram coletadas amostras de sangue da extremidade da cauda do rato para determinação de teores de lactato sanguíneo a cada 10 minutos (SANTOS et al., 1998). Este procedimento foi realizado ao final do período de 60 dias, antes da administração da aloxana.

4.5 - Indução do Diabetes: administração da aloxana ou tampão citrato

Para indução do diabetes experimental, os ratos do grupo T-ALO e S-ALO permaneceram aproximadamente 15 horas em jejum, sendo anestesiados moderadamente por inalação com éter etílico para receberem injeção de aloxana monoidratada (30 mg/Kg de peso corporal), dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 e injetada na veia dorsal do pênis. Após este procedimento os ratos foram recolocados nas gaiolas com alimento e solução glicosada 15% no primeiro dia. Os animais do grupo controle (S-CIT) sofreram manipulação semelhante à dos animais injetados com aloxana, sendo que ao invés de aloxana foi injetado tampão citrato no mesmo volume/Kg de peso corporal.

A comprovação do diabetes foi realizada 48 horas após a administração de aloxana, através de determinação dos níveis glicêmicos no estado alimentado (LUCIANO, 1991).

4.6 - Avaliação da Severidade do Diabetes

Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia basal maior que 13,75 mM (250 mg/dL), dois dias após a administração da aloxana, sendo registrada a proporção de animais que se tornaram diabéticos em cada grupo (LUCIANO, 1991). A severidade do diabetes foi avaliada através dos seguintes parâmetros: peso corporal (g); ingestão alimentar (g/100g p.c.); ingestão hídrica (mL/100g p.c.); peso da gordura epididimal (mg/100mg de p.c.); teores séricos de glicose basal (mM), insulina (nM) e ácidos graxos livres (μ Eq/L); teores de insulina do pâncreas (μ g/g), glicogênio muscular (mg/100mg), glicogênio hepático (mg/100mg), proteínas totais (mg/100mg),

proteínas do músculo (mg/100mg); glicemia e insulinemia durante os teste de tolerância à glicose oral; glicemia no teste de tolerância à insulina; área sob as curvas de glicose ($\Delta G = \text{mM} \cdot 120\text{min}^{-1}$) e insulina séricas ($\Delta I = \text{nM} \cdot 120\text{min}^{-1}$), durante o teste de tolerância à glicose (GTT_o) e taxa de remoção de glicose (Kitt = $\% \cdot \text{min}^{-1}$), durante o teste de tolerância a insulina (ITT_{sc}).

4.7 – Avaliação da secreção e da ação periférica da insulina

4.7.1. Teste de Tolerância à Glicose Oral (GTT_o)

Foi realizado após 15 horas de jejum, uma semana depois da administração da aloxana. Os ratos foram moderadamente anestesiados com éter etílico e a primeira coleta de sangue foi feita da cauda do animal ao tempo zero (0). Em seguida, uma sonda gástrica de polietileno foi introduzida até o estômago por via oral e uma solução de glicose a 20% (2 g/Kg de peso corporal) foi administrada. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos com capilares heparinizados e calibrados para 25 μL . Após a administração da glicose a determinação da glicemia foi realizada através da coleta de 25 μl de sangue e dissolvidos em 200 μL de TCA 4%; a insulinemia foi determinada com coleta de 75 μl de sangue e dissolvidos em 200 μL de solução fisiológica (NaCl 0,09%).

O cálculo das áreas sob as curvas de glicose sérica ($AG = \text{mM} \cdot 120\text{min}^{-1}$) e de insulina sérica ($AI = \text{nM} \cdot 120\text{min}^{-1}$), durante o GTT_o foram calculadas pelo método trapezoidal (MATHEWS et al., 1990) utilizando o *Software* ORIGIN 3.5 (1991).

4.7.2. *Teste de Tolerância à Insulina Subcutâneo (ITTsc)*

Utilizando-se o mesmo procedimento adotado no teste de tolerância à glicose oral quanto ao tempo de jejum, anestesia, e local da coleta de sangue, a insulina (mista regular purificada da marca BIOBRÁS) foi injetada na região dorsal via subcutânea, na concentração de 30 mU/100g de peso corporal. Amostras de sangue (25 µL) foram coletadas em capilares heparinizados nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos para determinação da glicemia.

A taxa de remoção de glicose ($K_{itt} = \% \cdot \text{min}^{-1}$), durante o teste de tolerância a insulina (ITTsc) foi calculada a partir das concentrações de glicose sérica obtidas nos tempos 0, 30 e 60 do ITTsc, utilizando-se a fórmula: $(0,0693 \div t_{1/2}) \times 100$. A glicose sérica ($t_{1/2}$) foi calculada através da curva de análise dos mínimos quadrados dos teores séricos de glicose de 0 a 60 após a administração da insulina, quando as concentrações séricas de glicose decaíram linearmente (LUNDBAEK, 1962).

4.8. Métodos Analíticos

4.8.1. *Glicogênio Hepático*

Porções de tecido hepático (500 mg) foram retiradas após o sacrifício, e, digeridas em 2 mL de KOH a 30%, e permaneceram em banho maria 1h, após agitar e adicionar Na₂SO₄, agitar novamente e adicionar álcool etílico, voltar ao banho maria para ebulição do álcool. A precipitação do glicogênio hepático foi feita em 0,2 mL de Na₂SO₄ e 7 mL de etanol. Após a extração realizada segundo SJÖRGREEN et al., (1938), o precipitado foi suspenso em 25 mL de água destilada. A 1 mL desse extrato foram

adicionados 0,01 mL de fenol, e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, levado à fervura durante 15 minutos, coloração segundo DUBOIS et al. (1956) e a absorvância medida em espectrofotômetro a 490 nm.

4.8.2. *Extração da Insulina Pancreática*

Inicialmente, 0,2 g de tecido foram colocados em frascos contendo 2 mL de HCl 1N. O material foi incubado em estufa a 40 °C durante 24 horas.

O material extraído do pâncreas pelo processo descrito anteriormente foi diluído 1:5000 em soro-albumina bovina a 0,25% em tampão borato pH 5,5, conforme preconiza CARPINELLI (1978). O teor das amostras foi dosado pelo método de radioimunoensaio.

4.8.3. *Insulina dos Extratos Pancreático e Sérico*

A concentração sérica e o conteúdo de insulina pancreática foram determinados por radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

4.8.4. *Proteínas Musculares Totais*

As concentrações de proteínas musculares foram determinadas pelo método de LOWRY (1951). Foram pesadas amostras de tecido (aproximadamente 200 mg) as quais foram depositadas em 2 mL de HCl 0,33N, após os tecidos foram homogeneizados e postas em banho-maria por 60 minutos para facilitar a digestão. Foi preparada Solução Mãe (10 µL de proteínas totais + 3,2 mL de H₂O) e desta elaborou-se 5 padrões: P1 - 1,63; P2- 4,88;

P3- 8,14; P4- 11,39; P-5 14,65 mg/dL. Foram pipetados nos tubos padrões amostra e branco 10 μ L de padrão, amostra hidrolisada e água destilada, respectivamente. Em seguida adicionou-se 1 mL de água e 0,9 mL de Solução A, que por sua vez foi levado ao banho-maria a 50°C por 10 minutos. Foi adicionado 0,1 mL de Solução B e deixado por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 0,3 mL de Solução C e levado ao banho-maria a 50°C por 10 minutos. Após resfriado foi realizada leitura em espectrofotômetro a 650 nm.

4.8.5. *Glicose Sérica*

Foram coletados 50 μ L de sangue adicionados a 200 μ L de TCA, sendo a concentração de glicose determinada imediatamente após a obtenção do soro pelo método enzimático da glicose oxidase-peroxidase. A 500 μ L de reatividade contendo fenol 2,5 mM, 4(p-benzoquinona monoimino) fenazona 1,14 mM, tampão Tris 0,04 mM, glicose-oxidase 2,7 U/mL e peroxidase 0,33 U/mL foram adicionados 50 μ L de soro diluído. Após 15 minutos de incubação em banho a 37 °C, a absorbância das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm (NOGUEIRA et al., 1990).

4.8.6. *Lactato Sangüíneo*

O lactato sangüíneo foi analisado através de coleta de 25 μ L de sangue da extremidade da cauda do rato previamente assepsiada, através de tubo capilar heparinizado e calibrado para 25 μ L, desprezando a primeira gota. Imediatamente o sangue foi diluído em 50 μ L de solução de fluoreto de sódio (1%), contida em tubos de plástico Eppendorf, e

mantidos em gelo até posterior análise, através do método eletroquímico pelo aparelho YSL 2300 STAT (Yellow Spring, Inc. E.U.A.).

4.8.7. *Ácidos Graxos Livres Séricos*

Os ácidos graxos foram determinados colorimetricamente segundo método de REGOW et al. (1971). Foram adicionados em 0,2 mL de soro, 7 mL da mistura de solução extratora (solvente clorofórmio, heptano metanol, na proporção 28:21:1), seguida de forte agitação e centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado, e a 5mL de subnadante adicionado uma solução de 2 mL contendo (Cu (NO₃)₂ 0,05 M, trietalamina 0,10 M, NaOH 0,0035 e NaCl 35% a pH 8,1), seguido de nova agitação e centrifugação. A 3 mL de sobrenadante foram adicionados 0,5 mL de solução de dietilditiocarbato de sódio (1 mg/mL de butanol secundário). A concentração de ácidos graxos livres foi determinada a 435 nm contra curva de calibração de ácido palmítico.

4.8.9. *Proteínas Séricas Totais*

A concentração de proteínas totais no soro dos animais foi determinada pelo método de Biureto. Foram preparados tubos de ensaio para Amostra Padrão e Branco e colocados nos respectivos tubos, 50 µL de soro, de padrão de proteína (g/dL de soro padronizado) e de água destilada, após adicionou-se 1 mL de reativo de biureto a cada tubo, mantendo em temperatura ambiente por 15 minutos e efetuou-se leitura em espectrofotômetro a 550nm (NOGUEIRA, 1990).

4.9. Procedimentos Estatísticos

A análise estatística dos dados foi realizada estabelecendo-se o nível de significância de 5% em todos os casos. Os testes utilizados segundo COSTA NETO (1977) foram os que se seguem:

Teste de comparação entre proporções: incidência de diabetes;

Teste-t: peso corporal (antes da administração da aloxana) e teste de esforço;

Análise de variância (ANOVA, one-way) seguido por teste de Bonferroni: peso corporal (após a administração da aloxana); glicose e insulina sérica no GTTo; glicose sérica no ITTsc; área sob a curva de glicose e área sob a curva de Insulina no GTTo; taxa de remoção de glicose no ITTsc e todos os parâmetros séricos e teciduais do sacrifício dos animais.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Avaliados Antes da Administração da Aloxana

5.1.1. Ingestão Alimentar e Peso Corporal no Início e Após 60 Dias de Experimento.

Os animais dos grupos treinado (T) e sedentário (S) não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso corporal no início do experimento (1ª semana) e antes da administração da aloxana ou citrato (8ª semana) (Tabela1), quando comparados através do teste-*t*, ($p < 0,05$). Embora não tenha sido efetuada análise estatística para os dados referentes à ingestão alimentar e hídrica, estas parecem semelhantes nos dois grupos.

5.1.2. Avaliação do Condicionamento Físico dos Animais

Através do teste de esforço, realizado 8 semanas após o início do experimento, previamente à administração de aloxana ou citrato, constatou-se que os animais que realizaram o treinamento de natação apresentaram menores concentrações de lactato sanguíneo, demonstrando a eficácia do treinamento (Figura 1).

Tabela 1 - Peso corporal (g); ingestão alimentar (g/100g de peso corporal/dia) dos animais na 1^a e 8^a semanas do experimento, previamente à administração da aloxana ou citrato.

Grupos Experimentais	Peso Corporal		Ingestão Alimentar	
	1 ^a semana	8 ^a semana	1 ^a semana	8 ^a semana
T (n=15)	104±13,3	328,6±44,2	18,5	8,6
S (n=25)	94,1±14,3	348,6±37,6	18	7,9

Resultados do peso corporal expresso em média ± desvio padrão; da ingestão alimentar e ingestão hídrica expressos em média aritmética, com o número de animais entre parênteses. T= treinado; S= sedentário

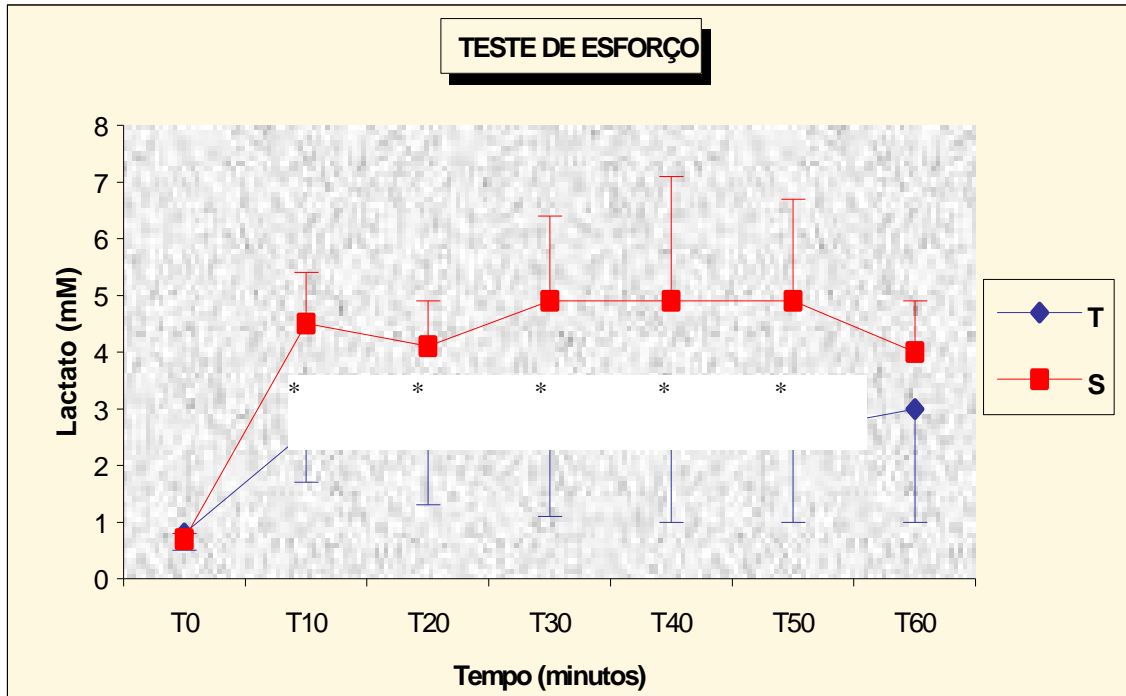


Figura 1 – Teores de lactato sanguíneo dos animais durante o teste de esforço, realizado previamente à administração de Aloxana ou Citrato. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

T(n=8)=treinado; S(n=8)= sedentário

* Diferença significativa com relação a (S) ($p < 0,05$, teste- t).

(Os dados utilizados na confecção do gráfico encontram-se na tabela 1 do apêndice).

5.2. Parâmetros Avaliados Após a Administração da Aloxana

5.2.1. Parâmetros Avaliados Antes do Sacrifício dos Animais

5.2.1.1 – Administração da Aloxana e Indução da Diabetes

Após 48 horas da administração de aloxana ou tampão citrato foi realizada a análise da glicemia dos animais no estado alimentado para comprovação da eficácia da aloxana. Em avaliação realizada 48 horas após a administração da aloxana os valores obtidos (mM) foram: T-ALO= $13,5 \pm 4,1$; S-ALO= $10,3 \pm 5,8$ e S-CIT= $4,9 \pm 0,4$. Os valores mostrados pelos animais injetados com aloxana foram significativamente superiores ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni) aos dos injetados com citrato, indicando a eficácia da aloxana utilizada. Quando avaliados 2 semanas após a administração da droga, a aloxana induziu o diabetes em 50% dos ratos treinados e 47% dos ratos sedentários, considerando como diabéticos aqueles que apresentaram glicemia igual ou superior a 13,75 mM (LUCIANO, 1991) (Tabela 2). A análise efetuada pelo teste de comparação entre proporções não acusou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Após a injeção de aloxana apenas 1 animal do grupo sedentário veio a óbito (Tabela 2).

5.2.1.2. Peso Corporal, Ingestão Alimentar e Hídrica

Os animais injetados com aloxana, treinados e sedentários, decorridas 2 semanas da administração da droga, apresentaram peso corporal menor do que os sedentários injetados com citrato. Quanto à ingestão alimentar (Tabela 3), os animais injetados com aloxana apresentaram aumento de 41% para os treinados e 70% para os

sedentários em relação aos injetados com citrato, enquanto que a ingestão hídrica dos animais treinados foi de 157% e dos sedentários 88% maior que a dos animais sedentários injetados com tampão citrato.

Tabela 2 - Incidência (%) de diabetes (glicose sérica $\geq 13,75$ mM) e de óbitos dos animais 2 semanas após a administração da aloxana.

Grupos Experimentais	Diabetes	Óbitos
T-ALO (n=12)	50	0,0
S-ALO (n=14)	47	6,6

Resultados expressos como percentual do número total de animais injetados com aloxana com o número entre parênteses.

T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana

Tabela 3 - Peso corporal dos animais (g); ingestão alimentar (g/100g de peso corporal/dia) e ingestão hídrica (ml/100g peso corporal/dia) dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Citrato.

Grupos Experimentais	Peso Corporal	Ingestão Alimentar	Ingestão Hídrica
T-ALO (n=12)	330,9 \pm 42,7*	9,3	22,9
S-ALO (n=14)	352,0 \pm 56,4*	11,2	16,7
S-CIT (n=08)	421,4 \pm 45,8	6,6	8,9

Resultados do peso corporal expresso em média \pm desvio padrão; da ingestão alimentar e ingestão hídrica expressos em média aritmética, com o número de animais entre parênteses.

T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana; S-CIT= sedentário citrato

*Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni) com relação ao grupo S-CIT.

5.2.1.3. Teste de Tolerância à Glicose Oral (GTT_o)

Durante o GTT_o os animais treinados e sedentários injetados com aloxana, avaliados 2 semanas depois da administração de aloxana, apresentaram aumento da glicemia, que retornou aos níveis iniciais, após 120 minutos da administração da carga de glicose. Os animais sedentários injetados com citrato foram mais tolerantes à glicose, havendo pequena variação na glicemia destes animais, durante o teste (Figura 2).

A área sob a curva de glicose, durante o GTT_o dos ratos injetados com aloxana, sedentários e treinados, foi significativamente superior àquela dos sedentários injetados com citrato (Figura 3).

A insulina sérica, durante o GTT_o, não se alterou nos grupos injetados com aloxana, ocorrendo apenas discretas oscilações, enquanto que o grupo sedentário citrato apresentou um pico aos 60 minutos (Figura 4). A área sob a curva de insulina durante o GTT_o dos ratos injetados com aloxana, sedentários e treinados, foi significativamente inferior àquela dos ratos sedentários injetados com citrato (Figura 5).

Não houve diferença significativa entre os animais treinados diabéticos e sedentários diabéticos.

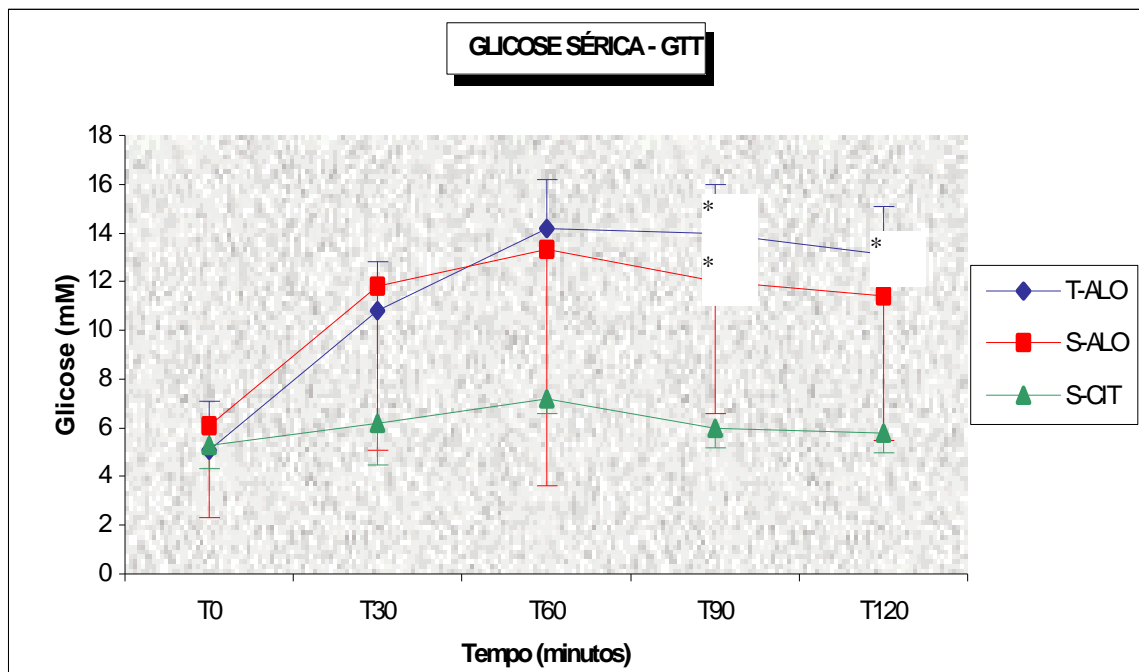


Figura 2 - Glicose no soro dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Citrato, durante o GTT. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. T-ALO= treinado aloxana (n=12); S-ALO= sedentário aloxana (n=14); S-CIT= sedentário citrato (n=8). * Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni) em relação a S-CIT. (Os dados utilizados na confecção do gráfico encontram-se na tabela 2 do apêndice).

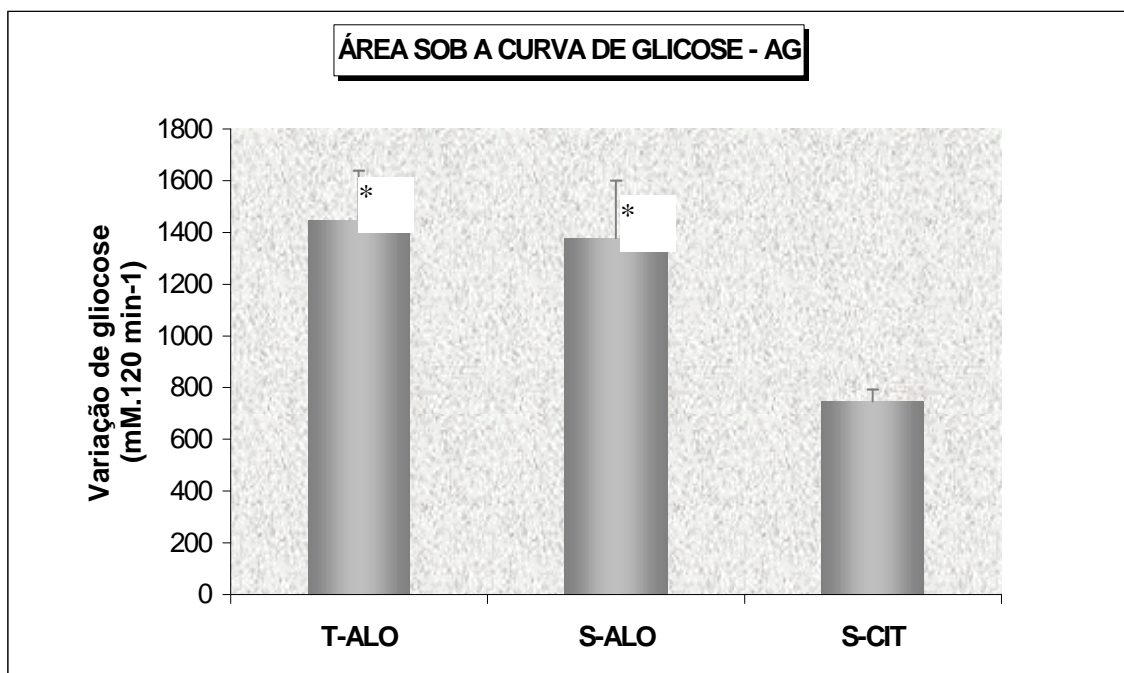


Figura 3 - Área sob a curva de glicose ($AG = \text{mM} \cdot 120\text{min}^{-1}$), durante o Teste de Tolerância à Glicose Oral dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Citrato. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. T-ALO (n=12)= treinado aloxana; S-ALO (n=14)= sedentário aloxana; S-CIT (n=8)= sedentário citrato. * Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni), em relação ao S-CIT. (Os dados utilizados para confecção do gráfico encontram-se na tabela 4 do apêndice).

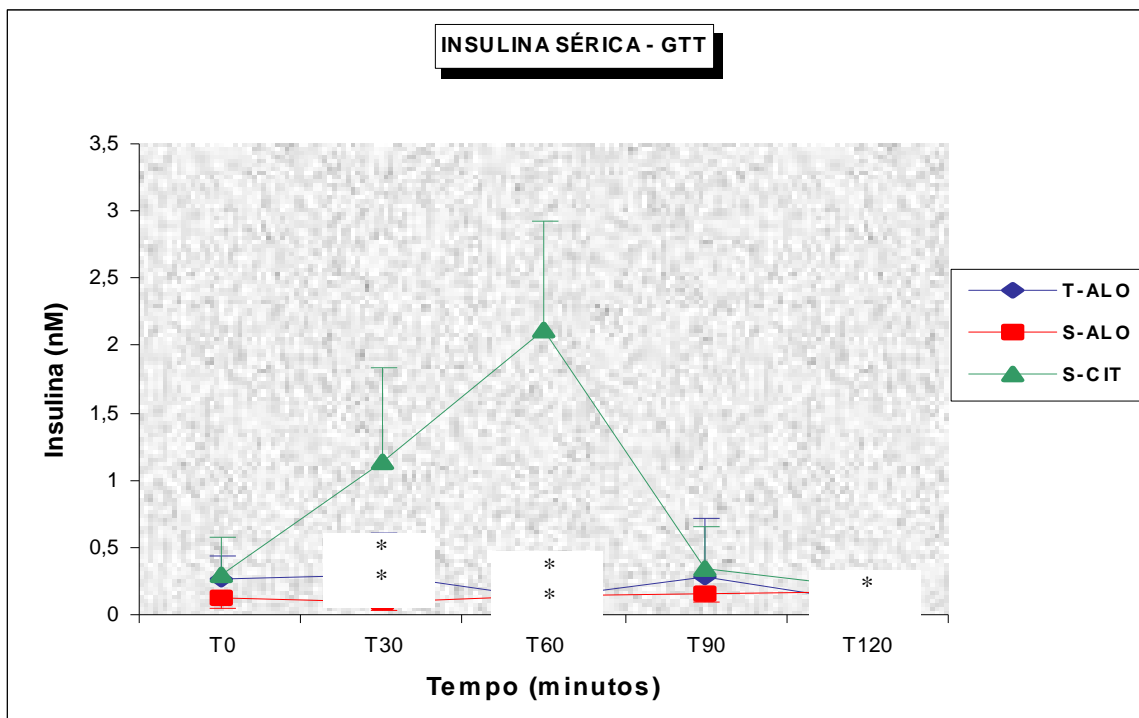


Figura 4 - Insulina no soro dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Citrato, durante o GTT. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

T-ALO (n=12)= treinado aloxana; S-ALO (n=14)= sedentário aloxana; S-CIT (n=8)= sedentário salina.

* Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni) em relação ao grupo S-CIT. (Os dados utilizados na confecção do gráfico encontram-se na tabela 3 do apêndice).

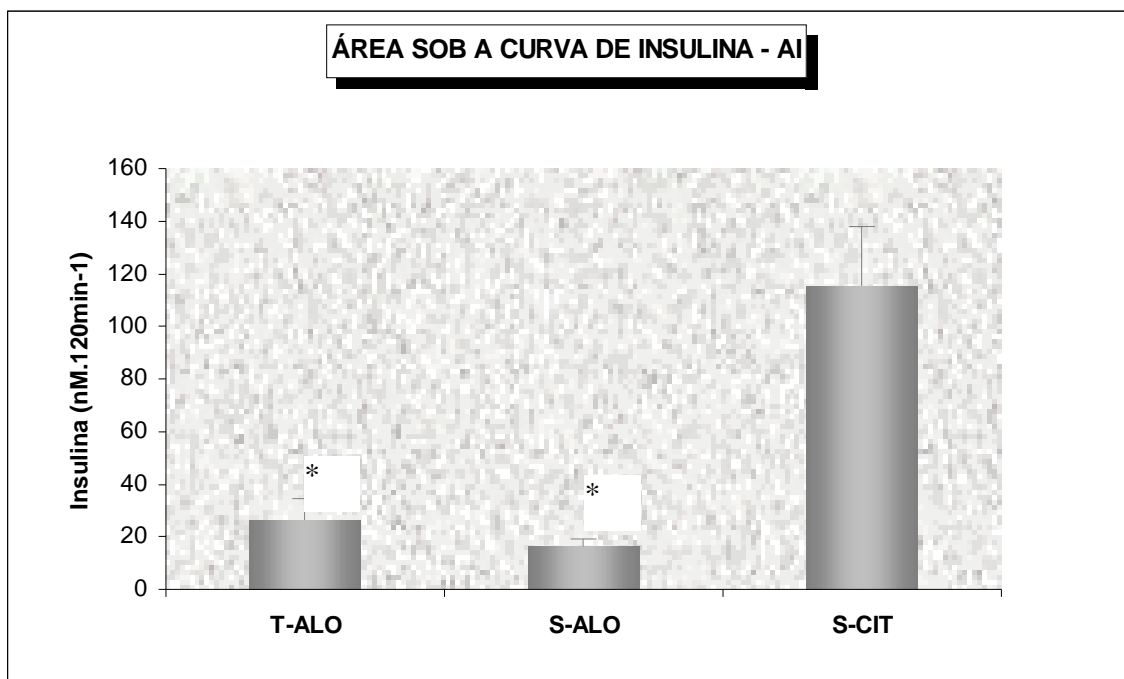


Figura 5 - Área sob a curva de insulina (AI = nM.120min⁻¹), durante o GTT dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Citrato. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. T-ALO (n=12)= treinado aloxana; S-ALO (n=14)= sedentário aloxana S-CIT (n=8)= sedentário citrato. * Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni), em relação ao grupo S-CIT. (Os dados utilizados na confecção do gráfico encontram-se na tabela 4 do apêndice).

5.2.1.4. Teste de Tolerância à Insulina Subcutâneo (ITT_{sc})

Todos os animais mostraram diminuição da glicose sérica 60 minutos após a administração da insulina exógena (Figura 6). A taxa de remoção de glicose (Kitt) durante o teste foi menor nos grupos tratados com aloxana do que com tampão citrato (Figura 7). Os animais T-ALO mostraram Kitt significativamente superior aos S-ALO.

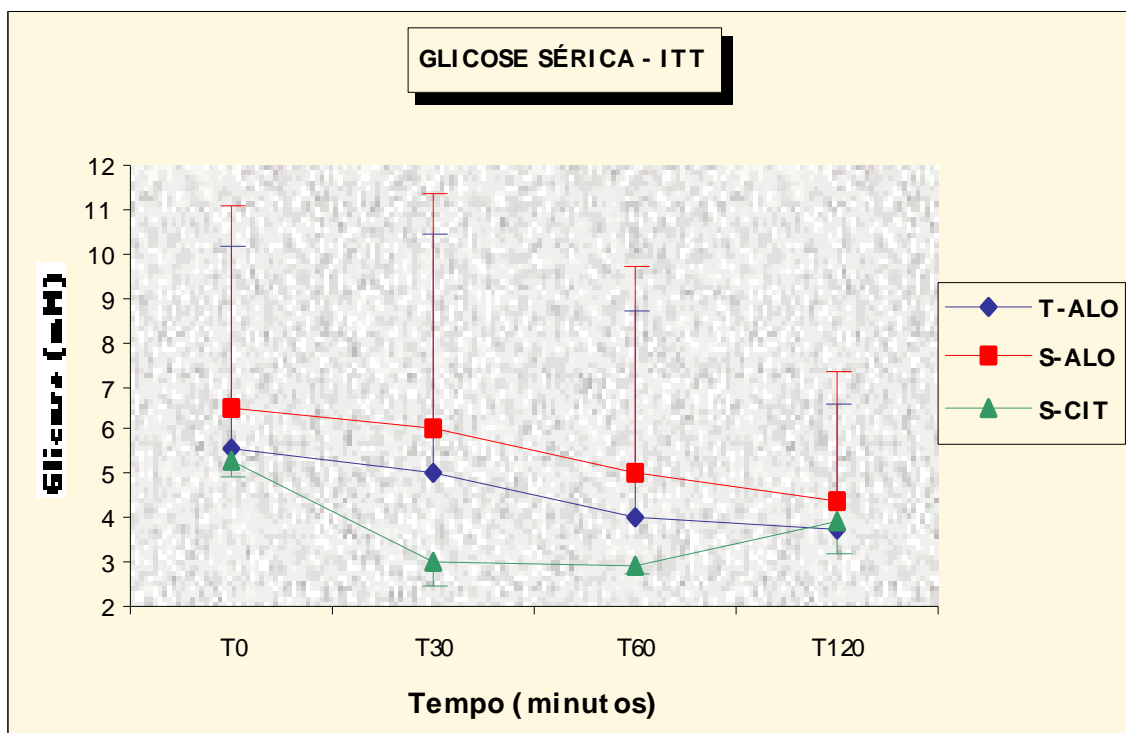


Figura 6 – Glicose no soro dos animais durante o Teste de tolerância à insulina após 2 semanas da administração da Aloxana ou Citrato. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. T-ALO (n=12)= treinado aloxana; S-ALO (n=14)= sedentário aloxana S-CIT (n=8)= sedentário citrato. (Os dados utilizados na confecção do gráfico encontram-se na tabela 5 do apêndice).

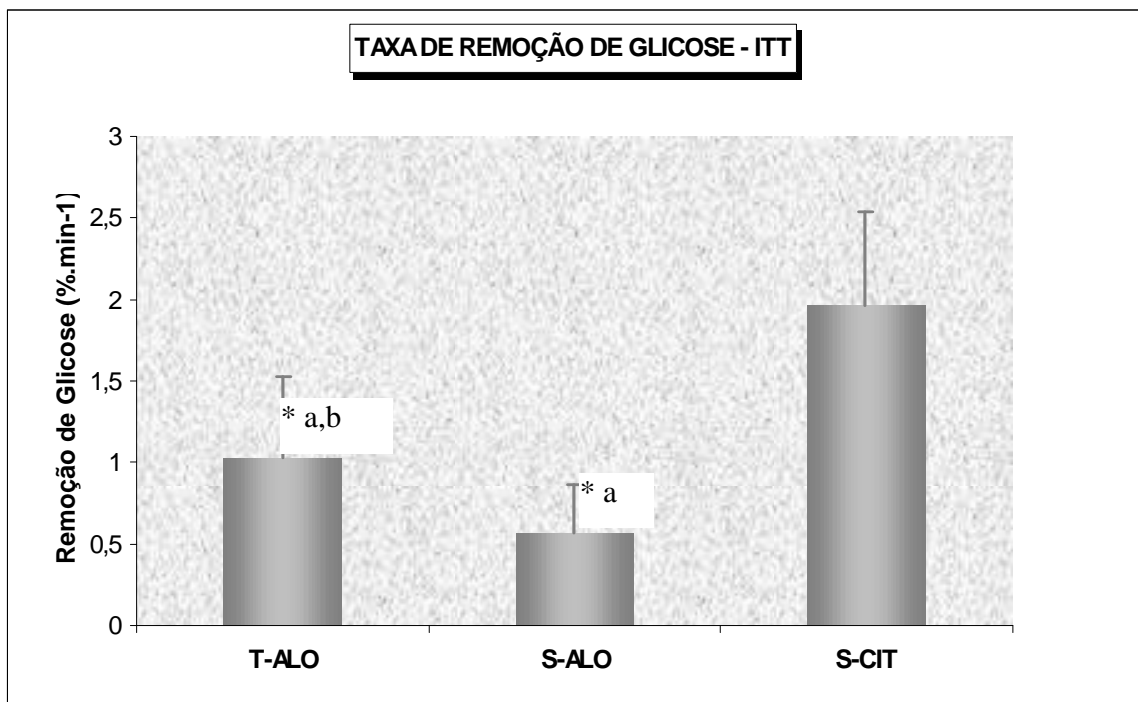


Figura 7 – Taxa de remoção de glicose (Kitt = $\%. \text{min}^{-1}$), calculada utilizando amostras do soro dos animais obtidas de 0 a 60 min., durante o TTIsC, após 2 semanas da administração de aloxana ou citrato. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

T-ALO (n=12)= treinado aloxana; S-ALO (n=14)= sedentário aloxana S-CIT (n=8)= sedentário citrato.

* Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni):

a= diferença em relação a S-CIT

b= diferença em relação a S-ALO

(Os dados utilizados na confecção do gráfico encontram-se na tabela 4 do apêndice).

5.2.2. Parâmetros Avaliados Após o Sacrifício dos Animais

5.2.2.1. Parâmetros Sangüíneos

Tanto os teores de insulina como os de AGL séricos no estado alimentado não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos (Tabela 4). Os níveis

circulantes de glicose no estado alimentado foram maiores nos grupos tratados com aloxana do que naquele tratado com citrato. Os teores séricos de proteínas totais foram superiores nos animais treinados injetados com aloxana do que nos demais.

5.2.2.2. Parâmetros Teciduais

Glicogênio hepático foi o único parâmetro que não apresentou diferença significativa entre os três grupos (Tabela 5). O glicogênio muscular foi maior no grupo T-ALO com relação ao grupo S-CIT. Insulina pancreática, proteína muscular (tabela 5) e peso da gordura epididimal (tabela 6) apresentaram valores menores nos grupos T-ALO e S-ALO do que no S-CIT.

Tabela 4 - Teores de proteína totais (g/dL), glicose (mM), ácidos graxos livres ($\mu\text{Eq/L}$) e insulina (nM) do soro no estado alimentado dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Tampão Citrato, obtidos depois do sacrifício.

Grupos Experimentais	Proteínas Totais	Glicose	AGL	Insulina
T-ALO (n=12)	5,8 \pm 0,3* ^b	14,8 \pm 8,0* ^a	75,3 \pm 27,0	0,15 \pm 0,13
S-ALO (n=14)	6,2 \pm 0,3	10,3 \pm 7,2	105,7 \pm 68,3	0,19 \pm 0,15
S-CIT (n=08)	6,1 \pm 0,4	6,2 \pm 0,7	61,6 \pm 22,0	0,20 \pm 0,11

Resultados expressos em média \pm desvio padrão com o número de animais entre parênteses.

T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana; S-CIT= sedentário citrato

* Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni):

a= Diferença significativa com relação ao grupo S-CIT

b= Diferença significativa com relação ao grupo S-ALO

Tabela 5 - Teores de proteína (mg/100mg) e glicogênio (mg/100mg) do músculo gastrocnêmio; glicogênio do fígado (mg/100mg) e insulina do pâncreas ($\mu\text{g/g}$) dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Tampão Citrato, obtidos depois do sacrifício.

Grupos Experimentais	PROTEÍNA (gastrocnêmio)	GLICOGÊNIO (gastrocnêmio)	GLICOGÊNIO (fígado)	INSULINA (pâncreas)
T-ALO (n=12)	5,2 \pm 0,4*	1,05 \pm 0,2*	9,3 \pm 4,8	16,8 \pm 15,2*
S-ALO (n=14)	6,3 \pm 1,3*	0,95 \pm 0,2	9,2 \pm 2,5	23,6 \pm 16,0*
S-CIT (n=08)	8,2 \pm 2,8	0,82 \pm 0,1	9,2 \pm 1,6	44,8 \pm 14,4

Resultados expressos em média \pm desvio padrão, com o número de animais entre parênteses.

T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana; S-CIT= sedentário citrato

* Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni) em relação a S-CIT.

Tabela 6 - Peso do tecido adiposo epididimal (mg/100g de peso corporal) dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana (ALO) ou Tampão Citrato (CIT), obtidos depois do sacrifício.

Grupos Experimentais	Tecido Adiposo Epididimal
T-ALO (n=12)	259,0 ±143,9*
S-ALO (n=14)	324,0 ±169,2*
S-CIT (n=08)	489,9 ±237,9

Resultados expressos em média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses
T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana; S-CIT= sedentário citrato.

* Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni), em relação a S-CIT.

6. DISCUSSÃO

O protocolo de treinamento utilizado com exercício de natação foi altamente eficaz em promover adaptações nos animais treinados. No início do teste de esforço os valores de lactato não diferiram entre os dois grupos treinados (T) e sedentários (S), uma vez que o treinamento físico não altera a concentração de lactato sanguíneo no repouso. O grupo (T) apresentou concentrações de lactato sanguíneo significativamente inferiores às do grupo (S) entre 10 e 50 minutos (T10 a T50) (Figura 1), demonstrando maior eficiência do metabolismo aeróbio na realização do teste.

De acordo com SANTOS et al. (1998) o exercício de natação com sobrecarga de 5% do peso corporal para ratos pode ser considerado como exercício predominantemente aeróbio, realizado abaixo do limiar anaeróbio, pois o “steady state” de lactato ocorre com essa carga. Os resultados referentes aos animais treinados confirmam relatos clássicos da literatura que indicam que o treinamento físico submáximo reduz as concentrações de lactato circulantes para uma mesma carga de trabalho (FOX & MATHEWS. 1983; COGGAN et al. 1993).

Em nosso estudo ambos os grupos treinados e sedentário apresentaram “steady state” de lactato sendo que o grupo dos animais treinados alcançou

valores significativamente inferiores. O grupo sedentário apresentou queda na concentração de lactato ao final do teste, provavelmente devido ao cansaço dos animais. Nos últimos dez minutos do teste estes diminuíram o ritmo do exercício, permaneceram por alguns segundos submersos no fundo do tanque sem realizar o exercício, retornando em seguida a superfície e continuando o exercício, o que não aconteceu com o grupo (T).

Existem vários relatos na literatura de que o exercício físico praticado de forma regular pode apresentar efeitos benéficos sobre as manifestações da diabetes mellitus, tanto em seres humanos (BERGER et al., 1975; KRISKA et al., 1994; HARGREEVES, 1997) quanto em modelos experimentais com animais (TAN & BONEN, 1987; LUCIANO, 1991; RODNICK, 1992; LUCIANO & LIMA, 1997; LUCIANO & MELLO, 1999). Contudo, a maioria desses estudos analisa os efeitos do treinamento físico com o quadro diabético já instalado.

O presente estudo teve por objetivo avaliar se o treinamento físico realizado previamente à instalação do quadro diabético alteraria a manifestação dos sintomas da doença em ratos, optando-se pelo modelo experimental de diabetes induzido por dose única de aloxana.

Utilizando o critério empregado por LUCIANO (1991) que aponta como diabéticos animais com glicemia basal no estado alimentado igual ou superior a 13,75 mM, a aloxana foi eficaz em induzir o diabetes em 50% dos animais T-ALO e 47% dos S-ALO. Outros estudos em nosso laboratório, no entanto, apresentaram incidência de diabetes maior. LUCIANO (1991) obteve valores glicêmicos superiores a 22 mM, no estado alimentado, enquanto que MELLO & LUCIANO (1995) encontraram incidência de diabetes de 81% em animais sedentários e 42% em animais tratados com dieta hipoprotéica

(6%). Em ambos os estudos a dosagem de aloxana foi de 40 mg/Kg de peso corporal. Tal discrepância pode ser atribuída a dosagem de aloxana administrada aos animais, uma vez que utilizou-se no presente estudo 30 mg de aloxana por Kg de peso corporal.

Os ratos tratados com aloxana, T-ALO e S-ALO, apresentaram maiores ingestão alimentar; ingestão hídrica e glicemia do que os ratos tratados com tampão citrato, S-CIT, indicando a eficiência da droga em causar sintomas típicos do diabetes nas condições de nosso experimento.

A efetividade em produzir diabetes, avaliada através da glicemia no estado alimentado dos animais, não diferiu entre os grupos treinado e sedentário que receberam aloxana. Estudo anterior efetuado em nosso laboratório também mostrou resultados semelhantes de glicemia sérica entre animais que receberam aloxana (ROCHA, 1995).

De acordo com EIZIRICK et al. (1986) e MELLO & LUCIANO (1995) ganho de peso corporal; teores séricos de glicose; ingestão alimentar; ingestão hídrica e peso do tecido adiposo são índices confiáveis da severidade do diabetes induzida por drogas em ratos.

A elevada ingestão alimentar mostrada pelos ratos tratados com aloxana T-ALO e S-ALO é um indicador das extensas alterações metabólicas desencadeadas pela ação da aloxana. De modo similar ao que ocorre no diabetes humano, o tratamento com aloxana foi responsável pela necessidade dos animais ingerirem mais alimento e água, como resultado da destruição das células β pancreáticas, levando a deficiência na secreção de insulina.

O peso corporal teve comportamento distinto entre os animais injetados com aloxana e aqueles injetados com tampão citrato, sendo que o grupo S-CIT apresentou peso

corporal maior do que os grupos T-ALO e S-ALO. A significativa redução de peso do tecido adiposo epididimal conjuntamente com os menores valores de proteínas musculares nos animais tratados com aloxana, T-ALO e S-ALO, podem explicar tal fato. Este resultado confirma dados anteriores da literatura indicando aumento característico de oxidação de ácidos graxos livres e degradação de proteínas no quadro de diabetes mellitus (WILSON & FORSTER, 1992).

Em conjunto, os resultados referentes ao peso corporal, ingestão alimentar, ingestão hídrica, peso fresco do tecido adiposo e de proteínas musculares refletem o estado catabólico dos animais tratados com aloxana. Enquanto ganho de peso corporal, peso da gordura epididimal e proteínas musculares foram semelhantes para os grupos treinados e sedentários injetados com aloxana; a ingestão alimentar foi inferior e a ingestão hídrica superior nos animais T-ALO com relação aos S-ALO. Geralmente ratos machos quando submetidos ao treinamento reduzem a ingestão alimentar OSACAI (1973), o que pode ter ocorrido de maneira acentuada com os animais diabéticos treinados. Em contra partida, o treinamento também pode ter exacerbado a polidipsia, resultando na diferença encontradas entre os grupos T-ALO e S-CIT. A maior concentração de glicose circulante e, conseqüentemente, um possível aumento da diurese, apesar de não avaliada neste estudo, também podem explicar a maior ingestão hídrica dos animais T-ALO, assim como nos S-ALO.

Através da análise desses parâmetros, bem como na análise dos teores séricos de insulina, proteínas totais e AGL não foi possível verificar qualquer efeito benéfico do exercício prévio sobre os efeitos diabetogênicos de dose única de aloxana, uma vez que, na maioria dos casos, não houve diferenças significativas entre os grupos T-ALO e

S-ALO.

Testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT) são comumente utilizados na clínica para o diagnóstico da diabetes (WILSON & FOSTER, 1992; KRISKA et al., 1994). Dessa forma, empregamos os referidos testes para avaliar os efeitos do treinamento físico sobre a severidade do quadro de diabetes nos animais do presente estudo.

Durante o GTT, os animais dos grupos injetados com aloxana, sedentário (S-ALO) e treinado (T-ALO) apresentaram níveis glicêmicos superiores aos do grupo sedentário injetado com tampão citrato (S-CIT), permanecendo elevados durante todo o teste, não retornando aos níveis iniciais. Assim os grupos T-ALO e S-ALO apresentaram intolerância à glicose, não diferindo entre si. A área sob a curva de glicose (ΔG) ilustra a diferença entre os grupos injetados com aloxana e tampão citrato e torna evidente que não houve diferença entre os grupos T-ALO e S-ALO.

A captação de glicose pelos diversos tecidos, exceção ao sistema nervoso central, depende da ação da insulina (IVY, 1999). O exercício físico aumenta a sensibilidade dos receptores de membrana e a quantidade dos transportadores de glicose HARGREEVES (1997); RODINICK (1982) influenciando a captação e a utilização periféricas da glicose. Estas adaptações periféricas não puderam ser evidenciadas no presente experimento quando analisados os valores glicêmicos durante o GTT e o ITTsc.

Por outro lado, quando analisada a taxa de remoção de glicose (Kitt), durante o ITTsc, a influência do exercício na melhora da sensibilidade à insulina pôde ser evidenciada, uma vez que o grupo T-ALO apresentou maior taxa de remoção de glicose do que o grupo S-ALO. As adaptações morfológicas e funcionais adquiridas com o

treinamento físico retornam aos níveis iniciais após a interrupção do treinamento BARBANTI (1988). No entanto, a velocidade de destreinamento completo é bastante variável, levando semanas ou meses (FOX & MATHEWS, 1983). Possivelmente as adaptações periféricas ocasionadas pelo exercício físico, que continuaram presente mesmo 15 dias após a última sessão de treinamento, contribuíram para maior taxa de remoção de glicose durante o ITTsc. Isso sugere que o treinamento físico prévio realizado pelos animais funcionou como um agente atenuador da ação deletéria da aloxana com relação aos parâmetros periféricos responsáveis pela remoção de glicose.

O treinamento físico induz a um aumento da captação de glicose pelo músculo e maior concentração de glicogênio muscular (TAN & BONEN, 1987). A captação de glicose durante o exercício físico ocorre independente da insulina, estimulada pela contração muscular (RODNICK et al., 1992; GUYTON & HALL, 1996). A membrana plasmática do músculo em repouso é quase impermeável à glicose, exceto quando estimulada pela insulina. Entre as refeições, a quantidade de insulina secretada é demasiadamente pequena para promover captação de glicose.

O estado de hipoinsulinimismo ocasionado pelo diabetes compromete a captação de glicose pelo músculo esquelético em repouso reduzindo a síntese de glicogênio (GUYTON & HALL, 1996). Contudo, LUCIANO & MELLO (1999) obtiveram resultados contrários com relação ao glicogênio muscular, observando maiores teores de glicogênio muscular em animais diabéticos submetidos ao treinamento físico, tanto com relação aos animais sedentários diabéticos como aos controles treinados. Os autores atribuíram esse resultado à maior utilização de AGL, que proporciona uma poupança de glicogênio muscular.

Os animais S-ALO do presente estudo mostraram valores de glicogênio muscular semelhante aos S-CIT, enquanto que os T-ALO mostraram valores significativamente superiores aos S-CIT. Provavelmente esse fenômeno deve-se à intensificação da utilização de AGL pelo treinamento aeróbio em concordância com o relato anterior de LUCIANO & MELLO (1999). Este achado reforça a hipótese de que algumas alterações induzidas pelo treinamento físico possam ter permanecido e oferecido vantagem aos animais treinados.

Nossos resultados referentes ao glicogênio hepático contrariam achados anteriores da literatura que indicam redução desse parâmetro no diabetes associado com o treinamento físico ou não (LUCIANO & MELLO, 1999) e aumento em função apenas do treinamento (SILVA, 1998; GALDINO et al., no prelo). Nossos grupos experimentais, T-ALO; S-ALO e S-CIT apresentaram concentrações de glicogênio hepático semelhantes.

A baixa insulinemia decorrente da Diabetes Mellitus, ativa a fosforilase, enzima responsável pela degradação do glicogênio (GUYTON & HALL, 1996); diminui a atividade da glucoquinase (GK) hepática, enzima responsável pela fosforilação de glicose no fígado, e a sensibilidade à insulina no fígado (ZAWALICH, 1982). Em conjunto, estes fatores ocasionam menor utilização de glicose pelo fígado assim como promovem menor síntese e acúmulo de glicogênio hepático, explicando os resultados de (LUCIANO & MELLO, 1999). Por outro lado o treinamento físico, apesar de acarretar diminuição dos níveis de GK (ZAWALICH, 1982) e do estudo de LUCIANO & MELLO (1999) não apresentar diferença nos teores de glicogênio hepático entre grupos treinados diabéticos ou não, o aumento de glicogênio hepático em função do treinamento tem sido evidenciado na literatura (SILVA, 1998; GALDINO, et al., no prelo). Se for correta a hipótese de que

algumas adaptações ao treinamento sejam mais duradouras, isso poderia explicar a preservação do glicogênio hepático nos animais T-ALO do presente estudo. Fica, contudo difícil, justificar a manutenção dos níveis normais de glicogênio nos animais S-ALO.

De modo geral, o treinamento físico não protegeu integralmente o organismo contra ação diabetogênica da aloxana, pois muitos dos parâmetros avaliados não apresentaram diferenças entre os grupos T-ALO e S-ALO. No entanto, ao fazermos uma análise das adaptações “centrais” (pâncreas) e “periféricas” (músculo) separadamente podemos observar algumas diferenças.

Com relação aos parâmetros “centrais” analisados, como teores circulantes basais de glicose e insulina no estado alimentado e teores pancreáticos de insulina, o treinamento desencadeou respostas desfavoráveis, uma vez que os ratos T-ALO apresentaram menores teores de insulina pancreática e circulante associados a maiores teores circulantes de glicose que os S-ALO. Além disso, os resultados referentes à glicose e à insulina durante o GTT são indicativos de que o treinamento físico não interferiu na liberação de insulina induzida pela glicose nos animais tratados com aloxana, uma vez que as áreas sob as curvas de glicose e insulina durante o teste foram semelhantes para os ratos dos grupos T-ALO E S-ALO.

Provavelmente, o pâncreas dos animais submetidos ao protocolo de natação, tornou-se mais sensível à ação deletéria da aloxana. O treinamento físico provoca alterações na secreção de insulina ocasionando diminuição da concentração de insulina plasmática em repouso, redução da secreção de insulina pela estimulação de glicose (ZAWALICH, 1982). Também ocorre queda dos teores séricos de insulina durante o exercício e aumento na secreção de glucagon, acompanhada pelo aumento da atividade do

sistema nervoso simpático. O aumento do tônus simpático esplâncnico é um dos principais responsáveis pela queda na secreção de insulina e aumento na de glucagon, suplantando até mesmo estímulos metabólicos como a glicemia (WAHREN et al., 1971; LUCIANO, 1991).

Estes efeitos provenientes de adaptações frente ao treinamento físico podem através da estimulação simpático-adrenérgica, ter provocado um aumento da sensibilidade das ilhotas pancreáticas, tornando-as mais susceptíveis a ação de drogas, como aloxana. Contudo, esta hipótese contraria dados prévios da literatura, sugerindo que ilhotas pancreáticas podem desencadear mecanismos de defesa a injúrias não (EIZIRICK et al., 1993).

Por outro lado quando analisamos os parâmetros periféricos, encontramos diferenças significativas favoráveis aos animais treinados, T-ALO, com relação aos S-ALO nos teores de glicogênio muscular e na taxa de remoção de glicose, durante o ITTsc. O resultado destes dois parâmetros deixa evidente que o treinamento físico prévio propiciou adaptações que persistiram mesmo 15 dias após o término do treinamento físico, e foram eficientes em melhorar a captação de glicose, demonstrada durante o ITTsc, e transformação desta glicose em glicogênio pelo músculo.

Em resumo, a metodologia empregada no presente estudo foi sensível para evidenciar a efetividade do treinamento físico prévio em proteger o organismo ou mesmo potencializar suas defesas contra a ação deletéria da aloxana, apenas em alguns parâmetros. Estudos futuros devem ser realizados para melhor elucidar tal questão.

7. CONCLUSÕES

1-) O treinamento físico prévio com sobrecarga de 5% do peso corporal não atenuou a ação diabetogênica da aloxana nos animais. Tanto os animais que realizaram o treinamento físico (T-ALO) assim como os que permaneceram sem atividade física e receberam aloxana (S-ALO) apresentaram incidência de diabetes semelhantes.

2-) Os animais que realizaram o treinamento físico prévio (T-ALO) apresentaram respostas periféricas à insulina, como teores de glicogênio muscular e taxa de remoção de glicose em resposta à insulina exógena (Kitt) superiores as dos animais do grupo S-ALO. Isto é indicativo de que o treinamento físico prévio exerceu efeitos benéficos em relação a ação periférica da insulina.

3-) Com relação às alterações pancreáticas, a ação deletéria da aloxana pareceu a ser maior nos animais que realizaram o treinamento físico prévio, uma vez que estes apresentaram teores pancreáticos de insulina ligeiramente inferiores e teores circulantes de glicose, no estado alimentado, significativamente maiores do que os sedentários.

8. REFERÊNCIAS

- ASTRAND, P. O. "Why exercise?". **Med. Sci. Sports Exerc.** v.24, n.2, p.153-162,1992.
- BAILEY, C. C. & BAILEY, O. T. The production of diabetes mellitus in rabbits with alloxan. **J. AM. Med. Assoc.** n.122, p.1165-66. 1943.
- BARBANTI, V. J. **Treinamento físico: Bases científicas.** São Paulo, CLR Balieiro, 1986.
- BERGER, M.; HAGG, S.; RUDERMAN, N. B. Glucose metabolism in perfused muscle skeletal muscle-interaction of insulin and exercise on glucose uptake. **Biochem. J.** 146: p.231-238, 1975
- BERNE, R.M. & LEVY, M.N. **Fisiologia.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 988p. 1996.
- BOSCHERO, A.C.; TOMBACCINI, D.; ATWATER, I. Effects of glucose on insulin release and ⁸⁶Rb permeability in cultured neonatal and adult rat islets. . In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE), 13, 1998, Caxambu. *FESBE 98, Anais....* v.38, p. 375-399, 1988.
- CARPINELLI, A. R. **Estudo da secreção de insulina e da homeostase glicêmica em ratos desnutridos.** São Paulo, 1978. p. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- COGGAN, A.R.; SPINA, R.J.; HOLLOSZY, J.O. Effect of prolonged exercise on muscle citrate concentration before and after endurance training in men. **Am. J. Physiol.** V.264, n.2, 1993.
- COSTA NETO, P. L. O. **Estatística.** São Paulo, Edgard Blücher, 1997.
- DUBOIS, B.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.**, 28, p.350-356, 1956.
- DUNN, J. S. & McLETCHE, N. G. B. Experimental alloxan diabetes in the rats. **Lancet II:** p.384-387, 1943.
- DUNN, J. S.; KIRKPATRICK, J.; McLETCHE, N. G. B. TELFER, S. V. Necrosis of the islets of Langerhans preceded experimentally. **J. Path Bact.** n.55, p.245-57, 1943.
- EIZIRICK, D. L.; LIMA-FILHO, E.C.; NAKAMURA, P.H.; MIGLIORINI, R. H. Indices of severity of drug-induced diabetes in the rat: na evaluation by a multiple correlation analysis. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.19, p.4-5, 1986.
- EIZIRICK, D.L.; SANDLER, S.; PALMER, J.P. Perspectives in Diabetes Repair of Pancreatic β -cells a relevant phenomenon in early IDDM?. **Diabetes.** v.42 p.1383-91, 1993.

- EIZIRICK, D. L. Insulin-dependent diabetes mellitus and ghotich catedrals. **Endocrinology and Metabolism**. 2:p.167-168, 1995.
- FARRELL, A.; CASTON, A. L.; RODD, D.; ENGDAHL, J. Effect of training on insulin secretion from single pancreatic beta cells. **Med Sci. Sports Exerc.** v.24, n.2, p.426-433, 1992.
- FOX, E.L.; BOWERS, R.W.; FOSS, M.L. **Bases Fisiológicas da Educação Física e dos Desportos**. 4^a. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.518. 1991.
- GALDINO, R. S.; ALMEIDA, C. C. S.; LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Protein malnutrition does not repair glucose metabolism adaptations to exercise training. **Nutr. Res.** 1999 (no prelo)
- GARCIA, M. A. T. & KANAAN, S. Bases moleculares da resistência a Insulina. **J. Bras. Patol.**, v.33, n.3, p.154-160, 1997.
- GOMORI, G. & GOLDNER, M. G. Production the diabetes mellitus in rats with alloxan. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** N.54, p.287-90, 1943.
- GRODSKY, G. M. A new phase of insulin secretion. How will it contributes to our understanding of B cell function. **Diabetes**. v.38, p.673-678, 1989.
- GUYTON A. C., HALL J. E. **Textbook of physiology**. Phyladelphia: W. B. Saunders, 1996. 1148p.
- HARGREAVES M. Interations between muscle glycogen and blood glucose during exercise. **Exercise and Sports Science Reviews**. Willians & Wilkins. v. 25 p.21-39, 1997.
- HELLMAN, B. & DIDERHOLM, H. The diabetogenic effect of alloxan after elimination of extra-pancreatic factors. **Acta Endroc.** n.20, p.81-87, 1955.
- HENQUIN, J. C. Opposit effects intracellular Ca^{+2} an glucose on K^{+} permeability of pancreatic isleat cell. **Nature** (London), p.66-68, 1979.
- HERBERT, V.; LAU, K. S.; GOTLIEB, C. W.; BLEICHER, S. T. Coated charcoal immunoassay of insulin. **J. Clin. Endocrinol.**, 25, p.1375-1384, 1965.
- IVY, J. L.; ZDERIC, T. D.; FOGT, D. L. Prevention and Treatment of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, Ed. Lippicontt. v..27, p.1-35. 1999.
- JACOBS, H. R. Hypoglicemic action of alloxan. **Proc. Soc. Exper. Biol, Med.** n.37, p.407-409, 1937.
- KAHN, C. R.; WHITE, M. F. The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. **J. Clin. Invest.**, v.82, p.1151-1156, 1988.
- KANATSUKA, A.; MAKINO, H.; SAKURADA, M.; HASHIMOTO, N. YAMAGUSHI, T.; YOSHIDA, J. Biphasic insulin response to high glucose and role of protons and calcium. **Endocrinology**. v.120, p.77-82, 1987.

KIKUCHI, M.; WOLLHIEM, C. B.; SIEGEL, E. G.; RENOLD, A. E.; SHARP, G. W. G. Biphasic insulin release in rat islets of Langerhans and the role of intracellular Ca^{+2} stores. **Endocrinology**, v.105, p.1013-1019, 1979.

KOKUBUN, E. **Interações entre o metabolismo da glicose e ácidos graxos livres em músculos esqueléticos: efeito do exercício e do estado alimentar**. São Paulo, 1990. 105p. Dissertação (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

KRISKA, A. M.; BLAIR, S. N.; PEREIRA, M. A. The potential role of physical activity in the prevention of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: epidemiological evidence. **Exercise and Sports Science Reviews**. Williams & Wilkins. 2, p.121-143, 1994.

LEIGHTON, B. ;BLOMSTRAND, E.; CHALLISS, R. A.; LOZEMAN, F. J.; PARRY-BILLING, M.; DIMITRIADIS, G. D.; NELSHOLME, D. A. Acute and chronic effects of strenuous exercise on glucose metabolism in isolated, incubated soleus muscle of exercise-trained rats. **Acta Physiol. Scand.**, 136, p.177-184,1989.

LENZEN, S. & PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**. V.31, p.337-342, 1988.

LOWRY, O.H. et. al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chim.** v. 193, p.265-75. 1951.

LUCIANO, E. **Influências do treinamento físico sobre o metabolismo de carboidratos em ratos diabéticos experimentais**. São Paulo, 1991. 108p. Dissertação (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1991.

LUCIANO, E. & LIMA, F. B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos a jejum e ao exercício agudo. **Rev. Cienc. Biomed.** v.18, p. 47-60, 1997.

LUCIANO, E. & MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. Paul. Ed. Fis.** v.12, n.2, p. 202-209. 1999.

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes Mellitus. **British Medical Journal**1.962

MALAISSÉ, W. J. Role of calcium in insulin secretion. **Isr. J. Med. Sci.**, v.8, p.244-251, 1972.

MALAISSÉ, W. J.; LEVY, J.; SENER, A. HERCHUELZ, A. The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release, XII. Qualitative and quantitative aspects of glycolysis in isolated islets. **Acta Diabet. Lat.**, 13, p.202-214, 1976.

MALAISSÉ, W. J. ;BOSCHERO, A. C.; KAWASU, S. HUTTON, J. C.. The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release XXXII. Effect of glucose on K^{+} fluxes in isolated islets. **Pflug. Arch.**, v.373, p.237-242, 1978.

MALAISSÉ, W. J.; HUTTON, J. C.; HERCHUELZ, A.; VALVERDE, I.; SENER, A. The stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release. XXXV the links between metabolic and cationic events. **Diabetologia**, v.16, p.331-341, 1979a.

- MALAISSSE, W. J.; SENER, A.; HERCHUELZ, A.; HUTTON, J. C.; Insulin release fuel hypothesis. **Metabolism**, 28, p.373-386, 1979b.
- MALAISSSE, W. J.; CARPINELLI, A. R.; SENER A.; Stimulus secretion coupling of glucose induced insulin release. Timing of early metabolic, ionic and secretory events. **Metabolism**, 30, p.527, 1981.
- MALAISSSE, W. J. Alloxan toxicity to pancreate B cells: a new hypothesis. **Biochemics Pharmacol.** V.31, n.22, p.3527-34. 1982.
- MANSON, J.E. Diabetes. In: NIEMAN, D.C. **Exercício e Saúde**, 1^a ed., Rio de Janeiro, Manole, p. 85-103, 1999.
- MATHEWS, J. N. S.; ALTMAN, D. G. CAMPBELL, M. J. ROYSTRON, P. Analysis of serial measurements in medical research. **Br. Med. J.** v. 27, p.230-235, 1990.
- MELLO, M. A. R. **Gestação e desnutrição protéico-calórica: aspectos funcionais do pâncreas endócrino em ratos jovens**. Rio Claro, 1997. 78p. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP.
- MELLO, M. A. R. & LUCIANO, E. Effects on protein malnutrition on glucose tolerance in rats with alloxan-induced diabetes. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 28, p.467-470, 1995.
- MORGAN, H. E. Sistemas de controle endocrino. In BROBECK, J. R. Best y Taylor. **Bases Fisiológicas de la practiva medica**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1981. p.1053-1066.
- NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H.; ABDALLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C.; Sangue-parte I: Glicídios. In: NOGUEIRA, D. M.; STRUFALDI, B.; HIRATA, M. H.; ABDLLA, D. S. P.; HIRATA, R. D. C. **Métodos de bioquímica clínica**, 1990. p.153-168.
- ORIGIN 3.5. **Microcal Software Inc.**: Scentific and Thechical Graphics. 1991-1994.
- OSACAI, L.B. The role of exercise in weight control. **Exerc.Sport Sci. Rev.** V.1, p.103-123, 1973.
- REGOW, B. J. M.; CORNELISSEN, P. J. H. C.; HELDER, A. P.; SPIJKERS, J. B. F.; WEEBER, Y. M. M. Specific detemination of free faty acid in plasma. **Clin. Chem. Acta.**, 31, p.187-195, 1971.
- ROCHA, R. **Efeitos da atividade física e da desnutrição sobre a severidade do diabetes induzido por aloxana**. Rio Claro: UNESP, 1995. 29p. Monografia - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 1995.
- RODNICK, K. J.; HENRIKSEN, E. J.; JAMES, D. E.; HOLLOSZY, J. O. Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles. **Am J. Physiol.**, 262, p.C9-14, 1992.
- SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; STEVANATO, E.; LUCIANO, E.; AZEVEDO, J. R. M.; GOBATTO, C. A. Determinação do "stade state" máximo de lactato em ratos submetidos à natação. In: REUNIÃO ANUAL DA

FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE), 13, 1998, Caxambu. *FESBE 98, Anais...*, Caxambu, 1998. p.259-260.

SANTOS, R. F.; MONDON, C. E.; REAVEN, G. M.; AZHAR, S. Effects of exercise training on the relationship between insulin binding and insulin-stimulated tyrosine kinase activity in rat skeletal muscle. *Metabolism*, 38, p.376-386, 1989.

SILVA, C.M. **Efeito da atividade física associada à administração de hormônio do crescimento sobre a nível de lactato sanguíneo e o conteúdo de glicogênio hepático, muscular e cardíaco em ratos.** Rio Claro, 1988, 44p. Monografia. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP - 1988.

SJÖRGREEN, B.; NORDENSKJOLD, T.; HOLMGREN, H.; WOLLERSTRON, J. Beitrag zur Kenntnis des Lebernrhythms. *Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere*, 240: p.47. 1938.

TAN, M. H.; BONEN, A. Effect of exercise training on insulin binding and glucose metabolism in mouse soleus muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65, p.2231-2234, 1987.

TREADWAY, J. L.; JAMES, D. E.; BURCEL, E.; RUDERMAN, N. B. Effect of exercise on insulin receptor binding and kinase activity in skeletal muscle. *Am J. Physiol.*, 256 (Endocrinol. Metab. 19): p.E138-144, 1989

WAHREN, J.; FELIG, P.; AHLBORG, G.; JORFELDT, L. Glucose Metabolism during Leg Exercise in Man. *J. Clin. Invest.* v.50, p.2715-25, 1971.

WALLBERG-HENRIKSSON, H. Exercise and Diabetes Mellitus. **Exercise and Sports Science Reviews.** Williams & Wilkins. v. 20 p.337-368, 1992.

WILSON, J. D. & FOSTER, D. W. **Williams textbook of endocrinology.** 8 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. 1712p.

ZAWALICH, W.; MATURO, S.; FELIG, P. Influence of physical training on insulin release and glucose utilization by islet cells and liver glucokinase activity in the rat. *Am J. Physiol.* 243 (Endocrinol. Metab. 6): p.E464-469, 1982.

APÊNDICE

Tabela 1 – Lactato sanguíneo (mM), durante o teste de esforço, nos ratos Treinados (T) e Sedentários (S) previamente à administração da Aloxana ou Tampão Citrato.

Tempo (min)	0	10	20	30	40	50	60
Grupos							
Treinados (n= 8)	0,8±0,3	2,6±0,9*	2,8±1,5*	2,7±1,6*	2,6±1,6*	2,6±1,6*	3,0±2,0
Sedentários (n=8)	0,7±0,1	4,5±0,9	4,1±0,8	4,9±1,5	4,9±2,2	4,9±1,8	4,0±0,9

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. (referente a figura 1, p. 26).

T= treinados, S= sedentários

* Diferença significativa ($p < 0,05$, teste t).

Tabela 2 – Glicose sérica (mM) no soro dos animais, durante o Teste de Tolerância à Glicose oral (GTT_o), após 2 semanas da administração da Aloxana ou Tampão Citrato.

Tempo (min)	0	30	60	90	120
Grupos					
T-ALO (n=12)	5,1±3,12	10,8±4,3	14,2±6,2	14±6,0*	13,1±6,4*
S-ALO (n=14)	6,1±3,8	11,8±6,7	13,3±9,7	12±5,4*	11,4±5,9
S-CIT (n=8)	5,3±1,0	6,2±1,70	7,2±0,6	6,0±0,8	5,8±0,8

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. (referente a figura 2, p. 30).

T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana; S-CIT= sedentário citrato

*Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni) em relação a S-CIT

Tabela 3 – Insulina sérica (nM) no soro dos animais, durante o Teste de Tolerância à Glicose oral (GTT_o), após 2 semanas da administração da Aloxana ou Tampão Citrato..

Tempo (min) Grupos	0	30	60	90	120
T-ALO (n=12)	0,26±0,17	0,29±0,31*	0,12±0,05*	0,28±0,43	0,10±0,01*
S-ALO (n=14)	0,12±0,08	0,10±0,07*	0,14±0,08*	0,16±0,07	0,17±0,08
S-CIT (n=8)	0,29±0,28	1,13±0,7	2,12±0,8	0,35±0,30	0,20±0,10

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. (referente a figura 4, p. 32).

T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana; S-CIT= sedentário citrato

*Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni) em relação a S-CIT

Tabela 4 - Taxa de remoção de glicose sérica (Kitt = $\% \cdot \text{min}^{-1}$) calculada utilizando amostras do soro obtidas de 0 a 60 min, durante o Teste de Tolerância à Insulina subcutâneo (ITT_{sc}), após a administração subcutânea de insulina, e as áreas sob as curvas de glicose (AG = $\text{mM} \cdot 120\text{min}^{-1}$) e insulina (AI = $\text{nM} \cdot 120\text{min}^{-1}$) durante o Teste de Tolerância à Glicose Oral, dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Tampão Citrato.

Grupos Experimentais	Kitt	AG	AI
T-ALO (n=12)	1,03±0,50* ^{a, b}	1446±193* ^a	26,4±8,1* ^a
S-ALO (n=14)	0,57±0,29* ^a	1377±222* ^a	16,4±2,6* ^a
S-CIT (n=08)	1,96±0,58	748±44	115,4±22,5

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. (referente as figuras 3, 5 e 7, pags. 31, 33 e 35, respectivamente).

T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana; S-CIT= sedentário citrato

* Diferença significativa ($p < 0,05$, ANOVA e Bonferroni):

a= com relação a S-CIT

b= com relação a S-ALO

Tabela 5 – Glicose sérica no soro dos animais (mM), durante o Teste de Tolerância à Insulina subcutâneo (ITTsc), dos animais após 2 semanas da administração da Aloxana ou Tampão Citrato.

Tempo (min) Grupos	0	30	60	120
T-ALO (n=12)	5,6±3,4	5,0±3,4	4,0±3,0	3,7±1,8
S-ALO (n=14)	6,5±4,6	6,0±5,4	5,0±4,7	4,4±2,9
S-CIT (n=8)	5,3±0,5	3,0±0,5	2,9±0,2	3,9±0,7

Resultados expressos como média ± desvio padrão, com o número de animais entre parênteses. (referente a figura 6, p. 34).

T-ALO= treinado aloxana; S-ALO= sedentário aloxana; S-CIT= sedentário citrato