



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE - ÁREA DE
BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA**

**TREINAMENTO FÍSICO E ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS NO TECIDO
CEREBRAL DE RATOS DIABÉTICOS EXPERIMENTAIS**

ALEXANDRE ROVERATTI SPAGNOL

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

Maio - 2014

ALEXANDRE ROVERATTI SPAGNOL

TREINAMENTO FÍSICO E ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS NO TECIDO CEREBRAL
DE RATOS DIABÉTICOS EXPERIMENTAIS

Orientadora: Profa. Dra. Eliete Luciano

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 da Motricidade - Área da Biodinâmica da Motricidade Humana.

RIO CLARO

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Treinamento físico e antioxidantes enzimáticos no tecido cerebral de ratos diabéticos experimentais

AUTOR: ALEXANDRE ROVERATTI SPAGNOL

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIETE LUCIANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE, Área: BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIETE LUCIANO

Departamento de Educação Física / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. JOSE RODRIGO PAULI

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas - Limeira/SP

Prof. Dr. MICHEL BARBOSA DE ARAUJO

Pós Doutorado da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP) - Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 22 de abril de 2014.

Agradecimentos

À família e amigos,

Agradeço aos meus pais, Alcides e Márcia pelos valores, ensinamentos, atenção, advertências, segurança, fraternidade, acolhimento e amor.

Agradeço aos meus irmãos, André e Isabela pelos conselhos, companhia, amizade, afeto, simpatia e ternura.

Agradeço à minha namorada, Lais pelo respeito, admiração, compreensão, aconchego, sensibilidade e carinho.

Agradeço aos amigos de infância e da faculdade, Cezinha, Fassis, Dú Lara, Léo, Romo, Victor, Aníbal, Dú Quieroti, Alemão, Rafa Araújo, Robgol, PC, Juninho, pela força e total apoio nas minhas decisões.

Aos colegas de trabalho,

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Eliete, pela brandura, paciência, sabedoria, flexibilidade, cortesia e atenção.

Agradeço ao Prof. Dr. Michel e ao Prof. Dr. Rodrigo Pauli, pela postura, comportamento, seriedade, talento, dedicação e afinco à pesquisa.

Agradeço a todos meus colegas de pós, principalmente ao Rodrigo, Leandro e Aron pela amizade, respeito, confiança, coerência, sugestões, risadas, almoços, conversas, brincadeiras, cafezinhos e estudos.

Aos técnicos de laboratório: Beto, Clarice e China, pela ajuda e por tornarem meus dias no laboratório agradáveis e inspiradores.

Aos funcionários do programa de pós-graduação.

À coordenação de aperfeiçoamento de nível superior - CAPES.

Ao instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

À Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, por ter me acolhido maternalmente em todos esses anos, desde minha entrada no mundo acadêmico.

"Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação."

Carl Sagan

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado os diferentes efeitos do treinamento físico (TF) sobre o sistema de defesa antioxidante. Porém quando associado ao Diabetes Mellitus (DM) esses efeitos carecem de esclarecimentos, sendo assim o presente estudo objetivou investigar as ações de um treinamento físico sobre o sistema antioxidante e outros parâmetros no tecido cerebral e sanguíneo de ratos diabéticos. Para isto foram utilizados ratos machos Wistar divididos em 4 grupos aleatórios: controle sedentário (CS), controle treinado (CT), diabético sedentário (DS) e diabético treinado (DT). O treinamento físico consistiu de uma sessão de natação de 1 hora por dia, durante 5 dias consecutivos por dois dias de descanso, durante 8 semanas, com uma carga equivalente ao limiar anaeróbio de 5,8 % e 4,2 % da massa corporal para o grupo CT e o grupo DT, respectivamente. Avaliou-se as concentrações de glicose no sangue, glicogênio hepático e de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) no cérebro e no sangue. Quantificou-se a expressão das isoformas SOD 1 e 2 no cerebelo através da técnica de *Western Blotting*. O treinamento físico atuou reduzindo a glicemia para o grupo DT e quando associado ao DM não foi capaz de combater a peroxidação lipídica em ambos os tecidos analisados. A atividade da CAT foi aumentada pelo DM e pelo TF no sangue e apenas pelo DM no cérebro. A atividade da SOD (Cu/Zn, Mn e Fe) não teve diferença significativa entre os grupos indicando que suas isoformas e seus respectivos mecanismos de ação atuaram de forma homogênea no tecido cerebral. Entretanto, no cerebelo, o TF elevou a expressão protéica das isoformas da SOD independentemente da ação do DM indicando aumento na ação antioxidante. Podemos concluir que o treinamento físico promoveu efeitos positivos no sistema de defesa antioxidante no tecido cerebelar, sendo de grande valia na prevenção contra possíveis danos oxidativos no sistema nervoso central.

Palavras-chave: Sistema nervoso central. Radicais livres. Enzimas antioxidantes. Diabetes mellitus. Exercício físico.

ABSTRACT

Several studies have demonstrated different effects of physical exercise (FE) upon the antioxidant defense system. However, when it is associated with Diabetes Mellitus (DM) these effects require clarification, thus, the present study aimed to investigate the actions of a protocol of exercise on antioxidant system and other parameters in blood and brain tissue of diabetic rats . For that we used male Wistar rats divided in sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary diabetic (SD) and trained diabetic (TD). The training session consisted of a swimming 1 hour per day for 5 consecutive days per two days of rest for 8 weeks, with a load equivalent to the anaerobic threshold of 5.8 % and of 4.2 % of the body mass for TC group and for DT group, respectively. We assessed the concentration of blood glucose, liver glycogen and of the thiobarbituric reactive substances (TBARS), the activity of the antioxidant enzymes: catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in brain and blood. Also it was quantified the expression of SOD isoforms 1 and 2 in the cerebellum. As expected, exercise acted reducing blood glucose in the TD group. Although the FE has remained oxidative standards of sedentary control group , when associated with DM, it was unable to combat lipid peroxidation in both tissues. CAT activity was increased by DM in the brain, but in blood tissue the same activity was increased due to the EF associated to the DM or not. The activity of SOD (Cu/Zn, Mn and Fe) was not significantly different between the groups, indicating that its isoforms and their mechanisms of action acted homogeneously in brain tissue. However, in the cerebellum, exercise increased the protein expression of both isoforms of SOD (1 and 2) independently of pathological action indicating an improvement in antioxidant activity by the exercise. We can conclude that physical training promotes positive effects on the antioxidant defense, being a very important factor in preventing possible oxidatives damages to the body.

Keywords: Central nervous system. Free radicals. Antioxidant enzymes. Diabetes mellitus. Physical exercise.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema do ensaio da Catalase.....	30
Figura 2 Esquema do ensaio da Superóxido Dismutase	31

Lista de Gráficos

Gráfico 1 Área sob a curva da massa corporal durante oito semanas de treinamento	34
Gráfico 2 Consumo alimentar ao longo de oito semanas de treinamento.....	35
Gráfico 3 Consumo hídrico durante oito semanas de treinamento.....	35
Gráfico 4 Concentração da glicose sanguínea	36
Gráfico 5 Concentração plasmática de proteína c-reativa	37
Gráfico 6 Concentração do glicogênio no fígado.....	37
Gráfico 7 Quantidade de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico no tecido cerebral.....	38
Gráfico 8 Quantidade de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico no tecido sanguíneo	38
Gráfico 9 Gráfico 8 Atividade da enzima catalase no tecido cerebral	39
Gráfico 10 Atividade da enzima catalase no tecido sanguíneo.....	39
Gráfico 11 Atividade da enzima superóxido dismutase no tecido cerebral...	40
Gráfico 12 Atividade da enzima superóxido dismutase no tecido sanguíneo	40
Gráfico 13 Detecção por <i>immunoblotting</i> da expressão da proteína Cu/Zn SOD no cerebelo dos animais	41
Gráfico 14 Detecção por <i>immunoblotting</i> da expressão da enzima Mn SOD no cerebelo dos animais	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP	<i>Agouti gene-related protein</i>
Akt	Serina/teorina quinase
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP/AMP	Adenosina trifosfato/Adenosina Monofosfato
CART	<i>Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript</i>
CAT	Catalase
CCL2	<i>Chemokine ligand 2</i>
Cm	Centímetros
CPT-1	Carnitina palmital transferase 1
Ddp	Diferença de potencial
dL	Decilitros
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigenio
g	Gramas
GLUT	Transportador de glicose
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
Hb	Hemoglobina
IKKα/β	<i>Kinase complex alfa/beta</i>
IL	Interleucina
IRS	Substrato do receptor de insulina
i.v.	Intravenosa
JAK-2	<i>Janus</i> quinase 2
JNK	<i>cJun N-terminal kinase</i>
Kg	Kilogramas
Mg	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar

MDA	Malondialdeído
mV	Milivolts
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa beta
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NPY	Neuropeptídeo Y
PCR	Proteína c-reativa/ <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGC	Co-ativador do receptor gama
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3-α	Fosfatidilinositol-3-quinase
POMC	Proopiomelanocortina
PTB1B	Proteína Tirosina fosfatase 1B
®	Marca registrada
RL	Radicais livres
RPM	Rotação por minuto
SOD	Superóxido dismutase
STAT-3	Sinal transdutor e ativador de transcrição
TBARS	Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
u	Unidade arbitrária
μL	Microlitro
μmol	Micromol
°C	Graus Celsius

LISTA DE ABREVIATURAS DE ELEMENTOS QUÍMICOS

Cu	Cobre
Fe	Ferro
HO[·]	Radical hidroxila
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
L[·]	Radical alquila
LO	Alcoxila
LOO[·]	Peroxila
Mn	Manganês
NO[·]	Óxido nítrico
N₂O₃	Óxido nitroso
O₂^{·-}	Ânion superóxido
¹O₂	Oxigênio singlet
O₃	Ozônio
ONOO[·]	Peróxinitrito
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Objetivos.....	15
1.1.1 Objetivos específicos.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Radicais Livres (RL) e Estresse Oxidativo.....	16
2.2 Sistema Nervoso Central (SNC).....	18
2.3 Diabetes Mellitus (DM).....	20
2.4 Exercício Físico (EF).....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Aspectos éticos.....	25
3.3 Indução e determinação do Diabetes Mellitus.....	25
3.4 Grupos experimentais.....	26
3.5 Adaptação ao meio líquido.....	26
3.6 Protocolo de treinamento físico.....	26
3.7 Pesagens.....	27
3.8 Obtenção do material biológico.....	27
3.9 Análises bioquímicas.....	28
3.9.1 Sangue.....	28
3.9.2 Proteína c-reativa (PCR).....	28
3.9.3 Glicogênio Hepático.....	28
3.9.4 Biomarcadores Pró-oxidantes.....	29
3.9.5 Biomarcadores antioxidantes.....	30
3.10 Análises de proteínas por <i>immunoblotting</i>	32
3.11 Análises Estatísticas.....	33
4 RESULTADOS.....	34
4.1 Resultados ao longo de oito semanas de treinamento.....	34
4.2 Resultados após oito semanas de treinamento.....	36
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus provoca múltiplas desordens metabólicas, podendo causar falência de vários órgãos, principalmente devido à alta concentração de glicose no sangue.

A prática regular de atividade física é uma excelente maneira não farmacológica de tratar e prevenir diversas doenças (ACSM, 2012). Sabidamente, isto porque, o exercício físico, mesmo de maneira aguda, promove maior gasto energético, reduz a massa adiposa atuando como regulador glicêmico e contribuindo com o aumento da sensibilidade da insulina (Karlsson, 1974, Froberg, 1971, Ropelle, 2005)

Com a prática regular de exercício físico e o aumento de sua intensidade, há naturalmente um maior consumo de oxigênio. Este consumo elevado de oxigênio durante o exercício físico gera dificuldades para o organismo em manter a homeostase redox devido ao aumento da atividade respiratória mitocondrial e, conseqüentemente, um aumento da atividade metabólica favorece a ocorrência de lesões através da oxidação de moléculas (Jenkin, 2000; Ji, 1999; Powers, 2011).

Por outro lado, a maior atividade respiratória perante o treinamento físico pode gerar também maior eficácia do sistema antioxidante, promovendo melhorias na atenuação do estresse oxidativo observados em diferentes protocolos experimentais e em diferentes condições patológicas (Chicco, 2006, Azzigi, 2013).

Muito se avançou nas descobertas das vias de sinalização na qual o exercício físico atua reduzindo a resistência à insulina, combatendo efeitos inflamatórios da obesidade em condições de hiperglicemia crônica, amenizando o quadro diabético. Estes avanços englobam mecanismos moleculares específicos, celulares e nucleares, no tecido muscular, hepático, pancreático, entre outros (Pauli, 2009, Gleeson, 2011, PAULI, 2008, Ropelle, 2005). Porém, ainda há pouca relação do Diabetes Mellitus com o estresse gerado pelos oxidantes no tecido neural, sendo necessária maior compreensão sobre os efeitos do exercício físico sobre uma condição diabética experimental. Assim sendo, este trabalho buscou investigar as

ações do exercício físico sobre o sistema antioxidante em ratos diabéticos experimentais.

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi investigar os efeitos do treinamento físico sobre o quadro antioxidante com ênfase no sistema nervoso central de animais diabéticos experimentais.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar as concentrações séricas de glicose, a concentração proteína c-reativa e a concentração de glicogênio hepático.
- Avaliar os biomarcadores da peroxidação lipídica e a atividade da enzima Catalase e da Superóxido Dismutase (Cu/Zn, Mn e Fe) no tecido sanguíneo e cerebral.
- Avaliar a expressão de proteínas Cu/Zn SOD (SOD1) e Mn SOD (SOD2) no cerebelo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radicais Livres (RL) e Estresse Oxidativo

Os seres vivos, ao longo de bilhões de anos, se adaptaram ao aumento da concentração de oxigênio na atmosfera utilizando essa abundante fonte para sobreviver. Simultaneamente a este processo, espécies danosas desses gases, eletronicamente instáveis, vieram como produtos do metabolismo do organismo dos seres vivos. Os agentes pró-oxidantes são gerados como um resultado indispensável do metabolismo intracelular nas mitocôndrias e peroxissomos e a apropriada produção destas espécies fazem parte do processo natural de envelhecimento e duração da vida (Finkel, 2000).

Os níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs) são controlados pelo sistema de defesa antioxidante, os quais mesmo em níveis subtóxicos atuam como sinais biológicos moleculares que acarretam mudanças no estado redox intra e extracelular, tais alterações podem mudar a sinalização das funções celulares, desequilibrar o ambiente celular causando um quadro classificado como estresse oxidativo (Azzi, 2003; Vertuani, 2004 Halliwell, 1989; Finkel, 2000).

Em níveis exacerbados dessas espécies há ocorrência de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e de carboidratos e danos ao ácido desoxirribonucléico (Schneider, 2004). O processo de peroxidação lipídica é determinado por uma cascata de mecanismos químicos oriunda das ações de radicais livres (RL), os quais levam a alterações na membrana da célula fazendo com que a mesma perca a permeabilidade seletiva, extravasando substâncias, perdendo o controle sobre o fluxo iônico e consequente morte celular (Lima, 2001).

Os radicais livres são moléculas ou únicos elementos químicos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, que podem ser: espécies reativas do oxigênio (ERO) ou do nitrogênio (ERN). Dentro do contexto do metabolismo aeróbio estão as principais e mais abundante espécies são as ERO, as quais podemos listar: o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (HO^{\cdot}), radical alquila (L^{\cdot}), alcóxila (LO^{\cdot}) e peróxila (LOO^{\cdot}). Entre as ERN

incluem-se o óxido nítrico (NO[•]), peróxinitrito (ONOO[•]), óxido nitroso (N₂O₃), entre outras substâncias derivadas do nitrogênio. Ainda há substâncias que não são classificadas como RL, mas ainda assim derivadas do oxigênio e que possuem efeitos semelhantes, entre os principais elementos estão: peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o oxigênio singlet (¹O₂), o ozônio (O₃), entre outros. Como a meia-vida desses radicais são muito curtas eles se tornam difíceis de serem capturados pelos agentes antioxidantes e conseqüentemente causam danos ao organismo, dentre uns dos instáveis radicais está o radical hidroxil (Barreiros, 2006; Lima, 2001; Ferreira, 2007).

Em combate à ação nociva destas espécies há a produção de enzimas que atuam adquirindo elétrons dos radicais livres, regulando eletronicamente o meio e prevenindo o estresse oxidativo, compostos estes são chamados de antioxidantes.

Os antioxidantes celulares neutralizam a proliferação ou protegem a membrana das células da ação lesiva das espécies reativas de oxigênio. Esses compostos são classificados em sistemas antioxidantes intracelulares enzimáticos (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) ou não-enzimáticos como algumas vitaminas (vitamina C, E e carotenóides) e elementos de alto peso molecular, como o zinco e o ferro (Powers & Hamilton, 1999; Vertuani, 2004).

As enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase representam a principal defesa endógena do organismo, sendo a superóxido dismutase uma enzima abundante do organismo e desempenha papel primário na defesa contra as espécies reativas de oxigênio. A superóxido dismutase corresponde a uma família de proteínas com diferentes grupos protéicos em sua composição, contendo três isoformas de ação enzimática nos organismos vivos: a isoforma citoplasmática dependente de cobre (Cu) e zinco (Zn), denominada SOD1, a mitocondrial dependente de manganês (Mn), denominada SOD2 e a extracelular dependente predominantemente de ferro (Fe), denominada SOD3.

A SOD, de forma geral, catalisa a reação do superóxido para peróxido de hidrogênio e água, exponencialmente mais rapidamente do que a dismutação espontânea. Ao contrário da expressão de SOD1 e SOD2 em

todos os tecidos e tipos de células, a SOD3 é somente produzida em um subconjunto de tipos de células, o que sugere uma dependência tecido-específica sobre esta enzima (Fridovich, 1995). Uma vez catalisada a dismutação do peróxido de hidrogênio em: $O_2 + H_2O_2$; este último pode ser posteriormente degradado, principalmente, pela ação da enzima catalase.

Também chamada de hidroperoxidase, a catalase é uma enzima encontrada na maioria dos organismos e tem como função decompor o peróxido de hidrogênio convertendo-o em $H_2O + O_2$. Esta enzima se encontra predominantemente nos peroxissomos dos animais e possui pouco ou nenhuma função mitocondrial, deixando a enzima superóxido dismutase quase que totalmente responsável em combater a formação inicial das espécies reativas derivadas do processo respiratório celular (Halliwell, 2006).

Estes processos químicos relacionados ao estresse oxidativos são presentes em todo o organismo, em especial no sistema nervoso central o qual participa intensa e constantemente da geração de energia através principalmente do metabolismo mitocondrial.

2.2 Sistema Nervoso Central (SNC)

O sistema nervoso central mantém todas funções vitais em sincronismo metabólico. Desordens nesse sistema pode comprometer todo o organismo. Muitas doenças neurodegenerativas estão associadas com a produção de ERO oriundas do metabolismo oxidativo, por conta do tecido neural apresentar grande densidade mitocondrial (Beattie, 1963).

O encéfalo e as estruturas neurais são altamente susceptível à danos oxidativos por possuírem uma baixa capacidade oxidante, um maior e constante fluxo de oxigênio e alto conteúdo de ácidos graxos que estão naturalmente mais expostos à peroxidação (Ohtsuki 1995, Calderon-cortes, 2008). Devido à sua maior atividade energética dependente do oxigênio o sistema nervoso central parece ser mais suscetível a danos oxidativos, visto que suas células apresentam grande numerosidade mitocondrial em relação a outras células do organismo (Frances, 1994).

Dentre essas estruturas destaca-se o cerebelo, o qual está intimamente ligado à mecanismos sensoriais e motores. Embora classicamente, o cerebelo está envolvido principalmente com a coordenação motora do organismo, mais recentemente, este órgão tem sido relacionado também no controle cognitivo. Estudos anatômicos demonstraram o cerebelo está ligado às áreas cerebrais pré-frontais, occipitotemporoparietais, parietais e áreas corticais temporais, bem como o sistema límbico. Além disso, estudos funcionais revelaram ativação do cerebelo durante o desempenho em tarefas cognitivas não relacionadas ao movimento. Assim, o cerebelo apresenta importantes aspectos morfológicos e funcionais que representam grande parte do sistema nervoso central (Ivry, 2007).

Como a formação de EROs está relacionada com o mau funcionamento mitocondrial, com maiores lesões oxidativas e com a perda da permeabilidade da membrana (Robertson, 2004), foi verificado, em diversos modelos experimentais, que o aumento na produção de radicais livres é um indicador de apoptose celular, assim como a abertura de poros na membrana mitocondrial e a liberação do citocromo c, um ativador apoptótico. Porém os agentes antioxidantes, como a superóxido dismutase, principalmente a dependente de Manganês (MnSOD), através de sua ação específica na mitocôndria, são capazes de suprimir o estresse oxidativo e aberturas de poros na membrana, evitando assim a morte neuronal (Keller, et al. 1998; Fatokun, 2007).

Em paralelo a estes processos oxidativo-redutivos, aumentos excessivos na concentração de glicose no plasma, situação encontrada no Diabetes Mellitus, podem aumentar a produção de radicais livres pelos seguintes mecanismos: formação de produtos avançados da glicosilação não enzimática, auto-oxidação de glicose, aumento da ativação intracelular das vias dos polióis, o que produz um desequilíbrio nas taxas de NADH/NAD e favorece a produção de radicais livres. Esses mecanismos citados também têm sido apontados como causadores de disfunções cerebrais, sob um quadro de hiperglicemia crônico, demonstrando grandes alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas no sistema nervoso central, acarretando complicações como, acidentes vasculares cerebrais, degeneração

do tecido, desmielinização, entre outras lesões (Silva, 2008; Brands, 2004; Tomlinson, 1992).

2.3 Diabetes Mellitus (DM)

O cenário mundial do Diabetes Mellitus (DM), principalmente associado à obesidade, mostra que a doença está cada vez mais se alastrando. Não afetando apenas países desenvolvidos ou indivíduos na fase adulta, a doença já atinge populações pobres e crianças pelo mundo todo (Frank, 2011).

O Diabetes Mellitus é caracterizado pela total ou parcial ausência do hormônio insulina secretado pela célula beta pancreática, sendo classificado primariamente como Diabetes Mellitus tipo 1 e tipo 2. O Diabetes Mellitus tipo 1 tem sua causa devida à destruição das células- β por um processo auto-imune resultando na absoluta deficiência de insulina, acometendo principalmente indivíduos jovens não obesos, embora a obesidade possa estar associada a esse diagnóstico. O DM tipo 2 é diretamente relacionado à má qualidade de vida, como maus hábitos alimentares e sedentarismo que levam à obesidade (*World Health Organization*, 2013).

A obesidade é caracterizada pelo aumento de gordura corporal, definida desde de análises da composição corporal através das medidas antropométricas até avaliações mais precisas como equipamentos de densitometria óssea ou também comumente avaliada pelo do índice de massa corporal (IMC, definido pela massa em quilogramas dividida pelo quadrado da estatura em metros).

O comprometimento da qualidade de vida de uma pessoa obesa deve-se, além do excesso de gordura, às comorbidades relacionadas, como hipertensão arterial, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, cardiopatias e Diabetes Mellitus (Dâmaso, 2003; Guedes, 2006).

Em casos extremos, o aumento excessivo de tecido adiposo pode prejudicar o receptor de leptina, hormônio responsável pela saciedade, causando deficiência na efetividade do transporte de leptina através da barreira hemato-encefálica, causando resistência à esse hormônio, levando a

alterações no eixo hipotálamo-hipófise que controlam a regulação da fome no organismo (Friedman, 2000; Carvalheira, 2005).

Na última década foi alertado que com o aumento da globalização, industrialização, mecanização, o desenvolvimento do transporte, computadores e *fast foods*, o número de pessoas com Diabetes iria aumentar cerca de 45%. A doença foi prevista como um forte impacto na saúde humana que se tornaria uma séria epidemia e um problema de saúde pública grave em todas as sociedades mesmo entre crianças e adolescentes (Zimmet, 2001).

Em 2013 a federação internacional de diabetes (IDF) confirmou esse crescente avanço da doença e seu tema do ano foi "*Prevent Diabetes: protect our future*" (International Diabetes Federation, 2013). A IDF avalia que pelo menos 371 milhões de pessoas no mundo todo possuem DM e metade delas não sabem que estão com a doença. Ainda estima-se que esses números também aumentem nas próximas décadas, elevando o Diabetes Mellitus da oitava para a sexta posição no *ranking* das principais causas de morte no mundo (World Health Organization, 2013).

Há enormes riscos cardiovasculares provocados pelo DM que estão sempre associados às principais causas de morte hoje no mundo (Gaal, 2006; Kahn, 2006). A doença provoca múltiplas desordens metabólicas, insuficiência de vários órgãos, que afetam especialmente os sistemas oftalmológico, renal, neurológico e cardiovascular, devido à alta concentração de glicose no sangue (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012; Groos, 2002).

Vários mecanismos têm sido apontados como causadores de disfunções cerebrais, sob um quadro de hiperglicemia crônico, demonstrando grandes alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas no sistema nervoso central, acarretando complicações como, acidentes vasculares cerebrais, degeneração do tecido, desmielinização, entre outras lesões (Silva, 2008; Brands, 2004; Tomlinson, 1992).

Dentre as graves e lesivas complicações causadas pelo DM, está o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um mecanismo reconhecido em complicações diabéticas. Vários estudos têm demonstrado que a

hiperglicemia aguda pode prejudicar a homeostase fisiológica dos tecidos. A hipótese de que os radicais livres podem mediar os efeitos da hiperglicemia aguda é apoiada pela evidência de que os antioxidantes podem neutralizar alguns dos efeitos induzidos pela hiperglicemia aguda, por exemplo, a vasoconstrição e capacidade de coagulação. Isto reforça a hipótese de que a hiperglicemia provoca estresse oxidativo, podendo destruir as defesas antioxidantes naturais encontradas nos tecidos (Ceriello,2004; Reis, 2008).

2.4 Exercício Físico (EF)

O exercício físico é extensamente indicado no combate a desordens metabólicas sistêmicas na prevenção e tratamento de inúmeras desordens metabólicas como: obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina, dislipidemias, hipertensão, hipoglicemia, diabetes mellitus tipo 1 e diabetes mellitus tipo 2 (*American College Sports Medicine*, 2012; Pedersen, 2006; Mcgregor, 2002; Marliss, 2002). Sua prática regular é capaz de melhorar a captação de glicose pelo músculo esquelético através do aumento da translocação dos transportadores de glicose (GLUT4), podendo reduzir a massa adiposa, aumentar a sensibilidade à insulina, contribuir para a homeostase glicêmica entre outros benefícios, o que o torna um excelente instrumento no auxílio ao combate ao DM entre outras doenças associadas ao metabolismo glicídico (Mondon 1980; Luciano, 2002; Hoten, 2004). Devido sua importância no organismo, a captação de glicose não depende exclusivamente do hormônio insulina, sendo isto, um mecanismo regulatório desenvolvido para manter a integridade do tecido. No SNC, essa captação de glicose é feita principalmente através da translocação dos transportadores de glicose GLUT-1, 3 e 5 (Frances, 1994).

O exercício físico utiliza o oxigênio como principal via do metabolismo do sistema aeróbio, ou seja, o sistema de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias para geração de energia (Floyd, 1999; Clarkson, 2003). Durante o exercício o consumo de oxigênio aumenta consideravelmente, dependendo da intensidade do exercício, proporcionando maior formação de ERO (Tiidus, 1998; Araújo, 2006). Em paralelo, o exercício físico também atua como pró-

oxidante em treinamentos prolongados, promovendo modificações metabólicas favoráveis à essas elevações na produção de ERO nas células de organismos aeróbios.

Como as principais vias de formação de ERO no organismo são estimuladas pelo exercício, especula-se, de forma geral, que o exercício físico *per si*, quando comparado com outros fatores ambientais, seja responsável por uma maior formação intracelular de ERO. Durante a atividade física a demanda energética tem seus níveis hiperestimados e simultaneamente uma elevação na taxa produção de ERO. Entretanto, outros fatores podem estar envolvidos, além de somente consumo de O₂ sistêmico. Observa-se queda nas defesas antioxidantes enzimáticas e químicas dos tecidos e órgãos de animais e humanos submetidos à treinamento e também nota-se uma resposta ineficaz em conceder proteção suficiente em combate os radicais livres (Souza Junior, 2009).

Para compensar esse quadro instável devido à alta produção de EROs, o exercício físico estimula mecanismos que induzem aumento na atividade de algumas enzimas antioxidantes, não sendo necessária uma nova síntese protéica. Esta parece ser uma característica individual de algumas enzimas em relação ao tecido envolvido (Aguiar, 2007).

Como há diferentes protocolos de exercícios adotados com distintas durações e intensidades, ainda existem muitas controvérsias sobre os resultados do exercício físico sobre o estado redox cerebral (Aguiar, 2007).

Prada et al. (2004), notou apenas benefícios sobre parâmetros de desempenho em um protocolo de treinamento durante quatro semanas, mas as atividades de enzimas catalase e glutathiona redutase não sofreram modificações positivas. Já, Powers, et al. (1999), em uma revisão, apresenta fortes evidências de que o treinamento físico crônico promove a elevação das atividades de enzimas antioxidantes, como a SOD e a GSH-Px. O músculo esquelético sofre adaptações (*up-regulation*) na capacidade antioxidante para proteger suas células e prevenir efeitos deletérios. O aumento da atividade dessas enzimas mostrou não só reduzir o risco de dano celular, como também melhorar a *performance* muscular e retarda a fadiga.

Assim sendo, a realização de estudos que abordem os aspectos mencionados na presente revisão são fundamentais para tentar esclarecer o papel do treinamento físico sobre a proteção enzimática antioxidante principalmente em condições de diabetes mellitus.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram usados no experimento ratos machos da linhagem Wistar com 60 dias de idade provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus de Botucatu e mantidos no Biotério do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências - UNESP - Campus de Rio Claro. Os ratos permaneceram em gaiolas de polietileno 37 x 31 x 16 cm (cinco ratos por gaiola) a uma temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12h claro/escuro e receberam ração Purina® para ratos e água filtrada *ad libitum*.

3.2 Aspectos éticos

O experimento foi realizado de acordo com a legislação brasileira sobre o uso científico de animais (lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008). O protocolo foi submetido à apreciação na Comissão de Ética no Uso do Animal (CEUA), do instituto de Biociências, da UNESP - Campus de Rio claro (Protocolo:012/2012).

3.3 Indução e determinação do Diabetes Mellitus

O DM foi induzido através de injeção intravenosa (via veia dorsal peniana) aloxana monoidratada (*Sigma-Aldrich Inc.*) 30mg.kg⁻¹ de massa corporal, dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5) (Luciano & Mello, 1998). Após esse procedimento os animais foram colocados em gaiolas, recebendo nas primeiras 24h uma solução de água e glicose (15%) para evitar complicações da hipoglicemia aloxânica (Lenzen, 2007). Após cinco dias, durante o período da manhã, amostras de sangue foram coletadas dos ratos em estado alimentado, através de um corte na extremidade da cauda do animal, para determinar a concentração de glicose plasmática. Os ratos que foram considerados não diabéticos (glicose<150mg/dL) ou severamente

diabéticos (glicose > 500mg/dL) foram desconsiderados do estudo. Ratos dentro da faixa glicêmica entre 150 a 500mg/dL foram considerados diabéticos.

3.4 Grupos experimentais

Para o experimento, os ratos foram separados aleatoriamente entre quatro grupos (n = 10 por grupo): Controle Sedentário (CS): animais não diabéticos e não treinados, Controle Treinado (CT): animais não diabéticos submetidos ao protocolo de treinamento, Diabético Sedentário (DS): animais diabéticos e não treinados e Diabético Treinado (DT): animais diabéticos submetidos ao protocolo de treinamento físico.

3.5 Adaptação ao meio líquido

A fim de amenizar o estresse dos animais frente ao exercício físico realizado no meio líquido (Voltarelli, et al. 2002), os ratos foram adaptados individualmente à água durante 6 dias antes do início do protocolo de exercícios. A profundidade da água foi gradualmente aumentada, sendo 10cm de profundidade nos 2 primeiros dias durante 10 minutos, 60cm de profundidade nos próximos 2 dias durante 20 minutos e nos últimos 2 dias manteve-se 60cm de profundidade e acrescentou-se um carga referente a 1% da massa corporal, durante 30 minutos.

3.6 Protocolo de treinamento físico

O treinamento físico consistiu de uma sessão de natação de 1 hora por dia, durante 5 dias consecutivos e dois dias de descanso, durante 8 semanas, com uma carga (% da massa corporal) correspondente a 5,79 para animais não diabéticos e 4,18 para animais diabéticos correspondente ao limiar anaeróbio previamente estabelecidas por Oliveira C, et al. 2007. As sessões de natação foram realizadas isoladamente, no período da manhã, em

tanques de 100 cm x 70 cm x 80 cm contendo água a uma temperatura de $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Gobatto, 2001).

3.7 Pesagens

Todos os animais tiveram o peso, ingestão hídrica e ingestão alimentar registrados semanalmente durante todo período do experimento.

3.8 Obtenção do material biológico

No final do experimento, 48 horas depois da última sessão de treinamento físico a fim de neutralizar os efeitos agudos decorrentes do treinamento físico, os animais foram eutanasiados tendo permanecidos em repouso e em jejum de 12 horas. Para iniciar a coleta de dados, os ratos foram anestesiados com uma solução i.v. de hidrato de cloral (Sigma®) e realizada uma secção torácica a fim de alcançar o arco aórtico para coleta sanguínea através do procedimento de punção cardíaca.

Este procedimento provoca a morte do animal por parada cardiorrespiratória devido ao choque hipovolêmico, após este processo a cabeça do animal foi rapidamente separada do tronco para a coleta de material.

O encéfalo foi inteiramente extirpado da caixa craniana, sendo o cérebro cuidadosamente separado do cerebelo e em seguida, alocados em tubos de ensaios mergulhados no gelo, contendo soluções estabilizadores a fim de se neutralizar as reações químicas e a possível degradação de proteínas. Posteriormente foram isoladamente macerados com *Polytron* a velocidade máxima durante 30 segundos e o homogenato foi centrifugado a 4°C , a 3000 rpm durante 10 min para as análises bioquímicas e para o *Western Blotting* neste tecido.

Parte inferior do lobo direito do fígado foi retirada no momento do eutanásia para pesagem e uma alíquota foi utilizada para determinar a concentração de glicogênio (Dubois et al., 1956).

3.9 Análises bioquímicas

3.9.1 Sangue

O sangue coletado foi depositado em tubos de ensaios contendo tampão fosfato (0,05N, KH_2PO_4), centrifugado a 5.000 rpm durante 10 min a 18°C para a separação do soro conservados em geladeira a 2-8°C. Ao papa de hemácias foi utilizada para verificar as concentrações de glicose, de pró oxidantes e as atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase.

3.9.2 Proteína c-reativa (PCR)

A proteína c-reativa é um dos principais indicadores de inflamação. Após a preparação do soro sanguíneo utilizou-se de partículas de látex poliestireno revestido com anticorpos anti-PCR. A aglutinação entre estas partículas é provocada pela interação da PCR presente na amostra com os anticorpos anti-PCR sensibilizados nas partículas de látex. O nível de aglutinação é diretamente proporcional à quantidade de Proteína C Reativa do soro analisado e foi medido por espectrofotometria (leitura de 540nm).

3.9.3 Glicogênio Hepático

A extração do tecido (500mg) foi realizada após a coleta sanguínea. As partes foram alocadas em tubos de vidro contendo solução de 30% de hidróxido de potássio (KOH) em banho fervente por 60 minutos. Após esse período foi adicionada, em cada tudo de ensaio, solução saturada de sulfato de sódio (Na_2SO_4) e etanol a 70%, sendo os tubos agitados no vórtex (AP 56, Phoenix®) e retornados ao banho-maria por 15 minutos. Na seqüência, os tubos eram centrifugados, o sobrenadante era descartado e ao precipitado era acrescentado etanol a 70%, sendo os tubos novamente agitados no vórtex. 10µL de cada amostra foram separados para a leitura com comprimento de onda de 650 nanômetros. Para o cálculo do glicogênio foi

utilizado a média da leitura das duplicatas e uma fórmula matemática gerou os resultados em miligramas de glicogênio por 100 miligramas de tecido.

3.9.4 Biomarcadores Pró-oxidantes

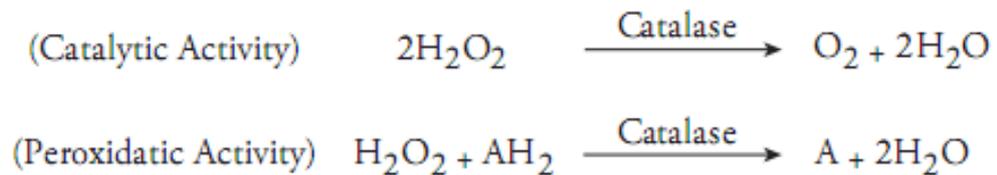
Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico. Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica, principalmente os malondialdeídos (MDA) entre outros peróxidos lipídicos e demais aldeídos de baixo peso molecular, que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico, formam bases de Schiff. Tais complexos emitem cores e suas concentrações podem ser determinadas espectrofotometricamente a 535nm, ou por fluorescência a 515 nm de excitação e 555 nm de emissão (Okawa, 1979).

3.9.5 Biomarcadores antioxidantes

3.9.5.1 Catalase (CAT)

A preparação da amostra iniciava-se com a adição de 900 μL de tampão fosfato, pH 7,4, a 100 μL do hemolisado (1:1), obtendo-se, assim, uma diluição 1:20 da amostra inicial. Deste hemolisado, 1 μL era adicionado ao meio básico de reação, que continha tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 mM. A atividade da CAT foi mesurada utilizando-se o *Cayman's Catalase Assay Kit Kit - Cayman Chemical Company*[®], através da velocidade com que o H_2O_2 é reduzido pela ação da enzima. Essa redução provoca uma diminuição no valor da absorbância verificado espectrofotometricamente em 240nm (Aebi, 1984).

Figura 1 Esquema do ensaio da Catalase

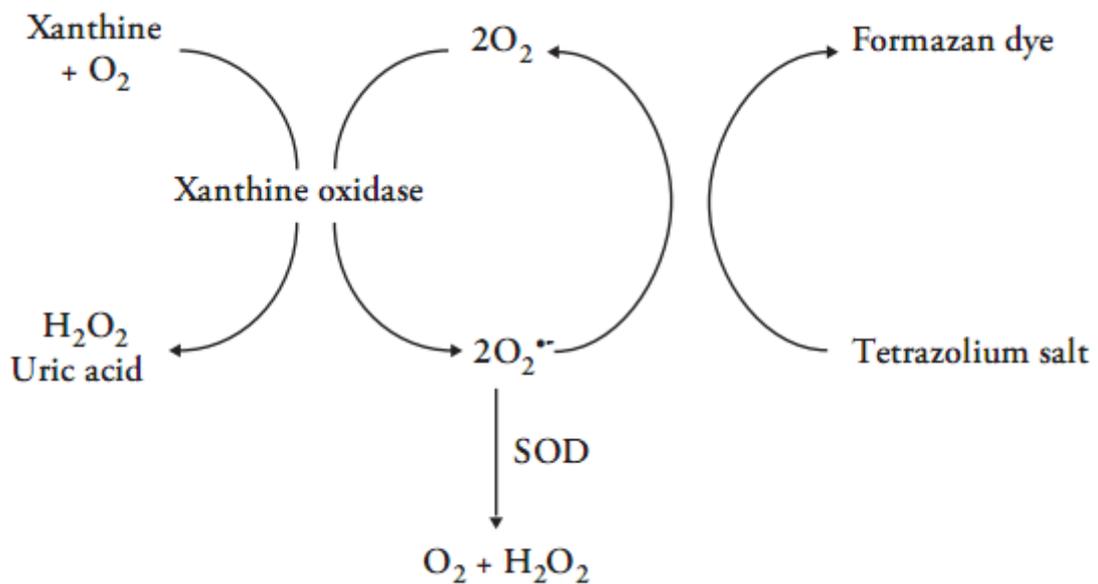


Fonte: *Cayman's Catalase Assay Kit*.

3.9.5.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada utilizando-se o *Cayman's Superoxide Dismutase Assay Kit - Cayman Chemical Company*[®], o qual utiliza o sal tetrazólio para detecção de radicais superóxidos gerados pela xantina oxidase e hipoxantina. O *kit* mediu a atividade de todos os três tipos de SOD (Cu/Zn, Mn e FeSOD). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzimas necessárias para apresentar 50% da dismutação do radical superóxido. A absorbância de leitura foi de 460 nm.

Figura 2 Esquema do ensaio da Superóxido Dismutase



Fonte: *Cayman's Superoxide Dismutase Assay Kit*.

3.10 Análises de proteínas por *immunoblotting*

Os tecidos foram agrupados e homogeneizados imediatamente em tampão de extração (1 % de Triton-X 100, 100 mM Tris , pH 7,4, contendo 100 mM de pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio a 100 mM, EDTA 10 mM, 10 mM de ortovanadato de sódio, PMSF 2 mM e 0,1 mg de aprotinina/ml) a 4°C com um Polytron a uma velocidade máxima durante 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 9000 x *g* e 4°C durante 40 minutos para remover o material insolúvel, e os sobrenadantes destes tecidos foram utilizados para a quantificação de proteínas.

Depois de realizada a separação dos polipeptídeos da amostra por eletroforese em gel de poliacrilamida (ddp de 60mV - 120mV), as proteínas entraram em contato com as membranas de nitrocelulose de acordo com seu peso molecular.

As proteínas de interesse marcadas na membrana, após terem sido lavadas três vezes com 50 mM Tris (pH 7,4), tiveram sua estrutura ligadas com 10 ml de cada um dos seus respectivos anticorpos primários (*SOD-1 (B-1): sc-271014 Antibody* e *SOD-2 (E-10): sc-137254 Antibody - Santa Cruz Biotechnology, inc.*) mantidas em agitação “*overnight*”, lavadas novamente e ligadas ao seus respectivos anticorpos secundários (*Santa Cruz Biotechnology, inc.*) e mantidas em agitação durante 2h à temperatura ambiente em ambos os processos. Por fim, foi aplicado luminol (*Bio-Rad’s Chemiluminescence Detection Kit*) sobre as membranas em sala escura e reveladas em papel filme Kodak®.

As intensidades de luminescência das bandas reveladas em papel filme foram quantificadas pelo *Software Image J*.

3.11 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas através do *software Statistica 4.0*. Após verificado a normalidade das amostras foi realizado o teste *ANOVA two way* e como pós-teste foi adotado o teste de *Tukey*. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Para a realização dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5*.

4 RESULTADOS

Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão.

4.1 Resultados ao longo de oito semanas de treinamento

Tabela 1 - Média da massa corporal (g) e do consumo alimentar (g/100g de peso corporal) e hídrico (ml/100g de peso corporal).

Parâmetros	Grupos			
	Controle sedentário	Controle treinado	Diabético Sedentário	Diabético treinado
Massa corporal	436,5 \pm 27,9	404,0 \pm 24,2	330,6 \pm 8,0 ^{a,b}	391,5 \pm 23 ^{a,b,c}
Consumo alimentar	25,2 \pm 1,5	33,1 \pm 2,2	55,4 \pm 11,5 ^{a,b}	41,1 \pm 4,8 ^{a,c}
Consumo hídrico	41,2 \pm 6,4	47,0 \pm 10,9	167,5 \pm 65,1 ^{a,b}	82,0 \pm 11,9 ^{a,b,c}

Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS, b - diferente de CT, c - diferente de DS.

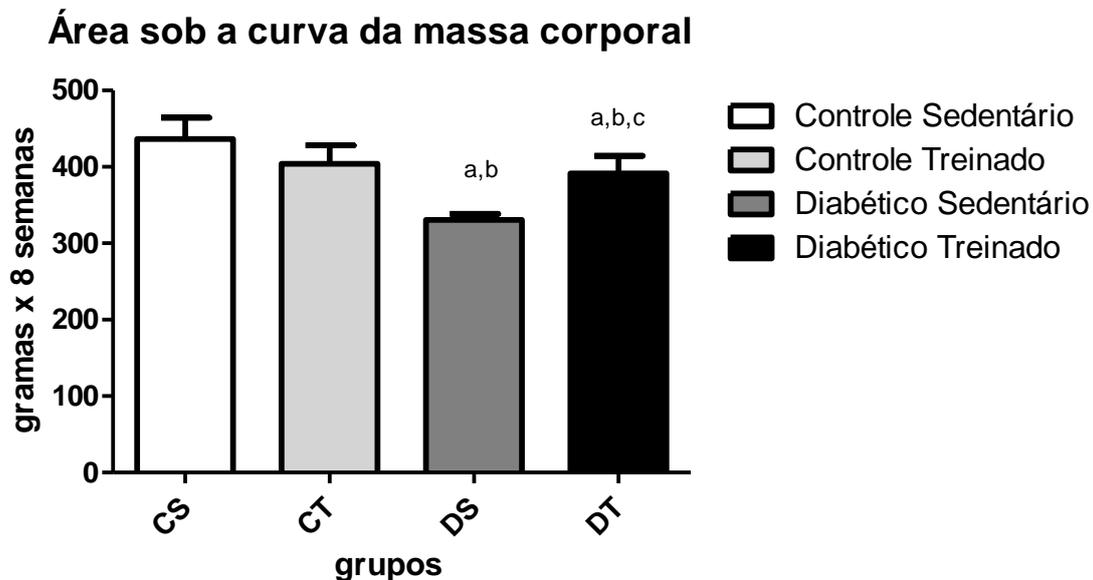


Gráfico 1 Área sob a curva da massa corporal durante oito semanas de treinamento. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS, b - diferente de CT, c - diferente de DS.

Área sob a curva do consumo alimentar

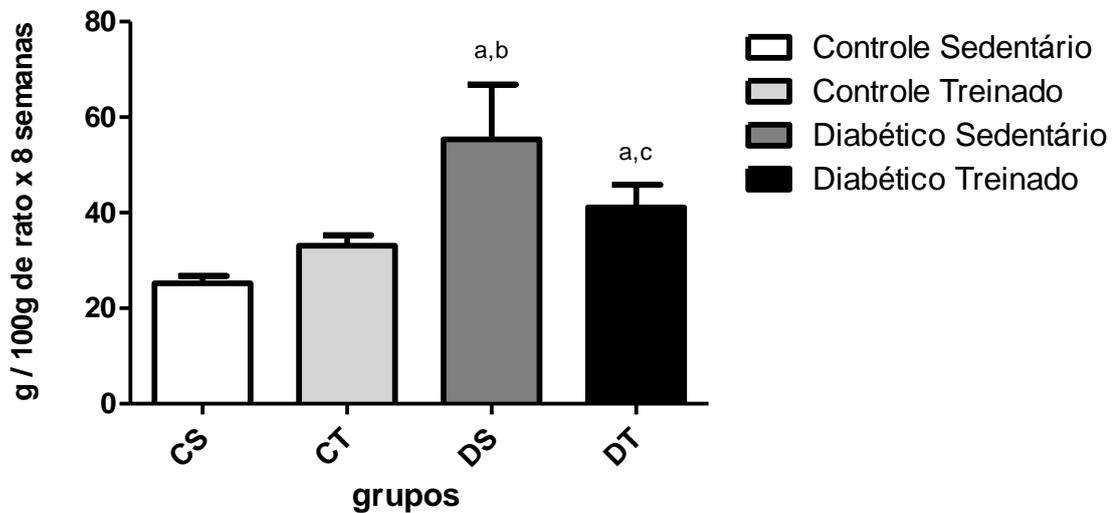


Gráfico 2 Consumo alimentar ao longo de oito semanas de treinamento. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS, b - diferente de CT, c - diferente de DS

Área sob a curva do consumo hídrico

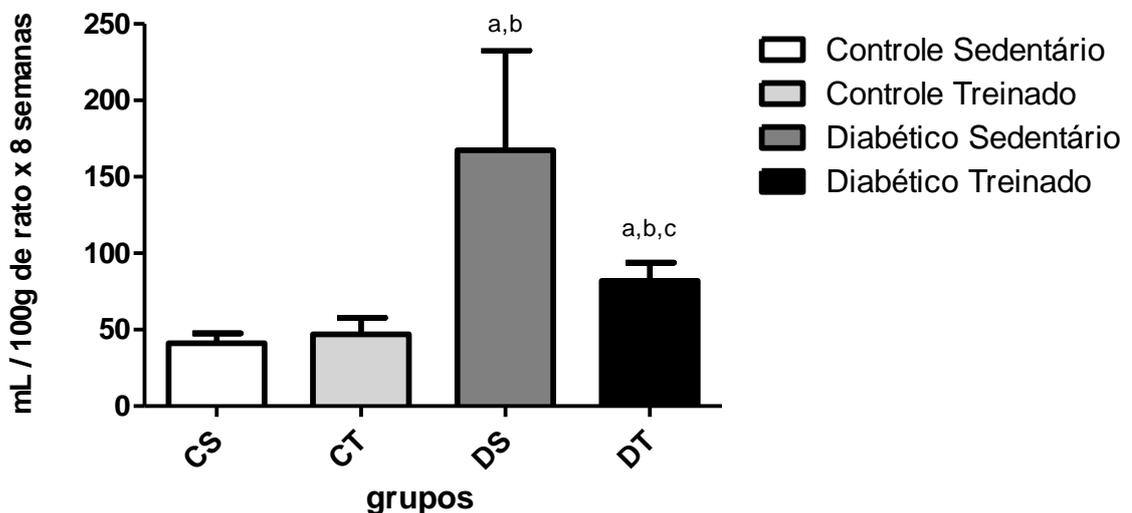


Gráfico 3 Consumo hídrico durante oito semanas de treinamento. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS, b - diferente de CT, c - diferente de DS.

4.2 Resultados após oito semanas de treinamento

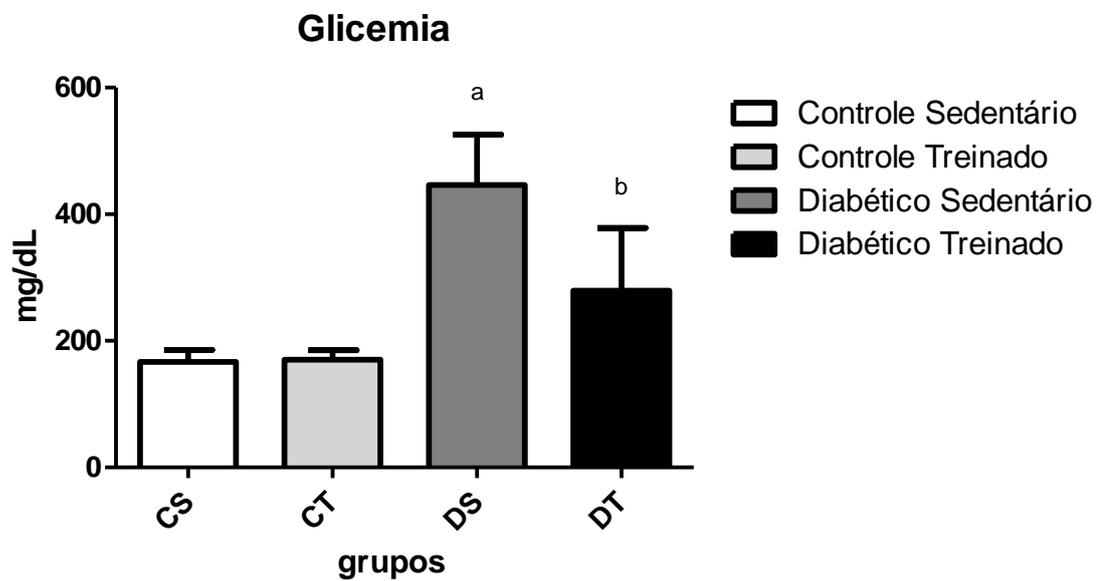


Gráfico 4 Concentração da glicose sanguínea. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS, CT e DT, b - diferente de CS, CT e DS.

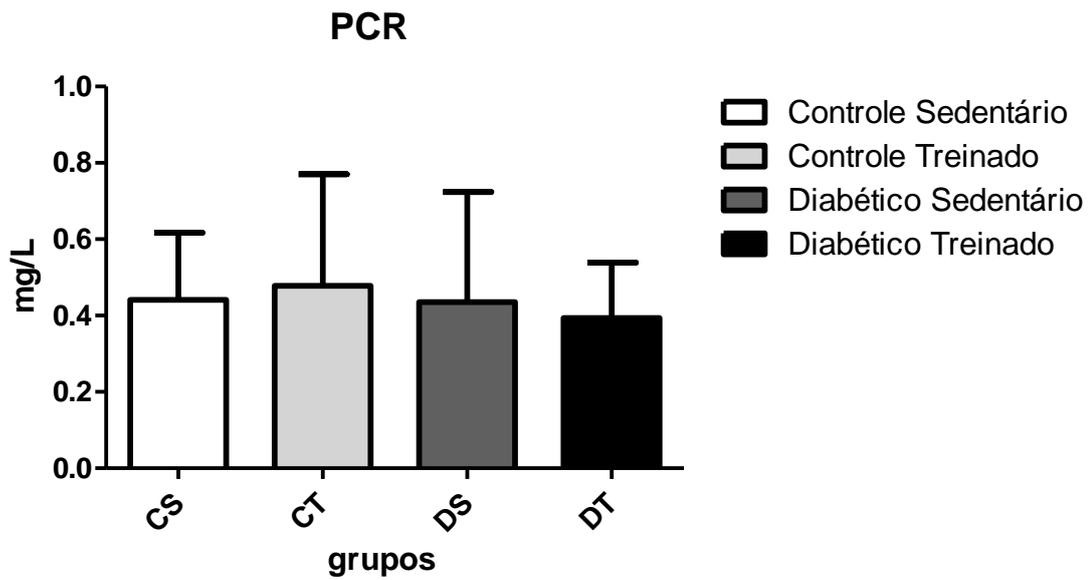


Gráfico 5 Concentração plasmática de proteína c-reativa. Não houve diferença estatística (ANOVA, $p > 0,05$).

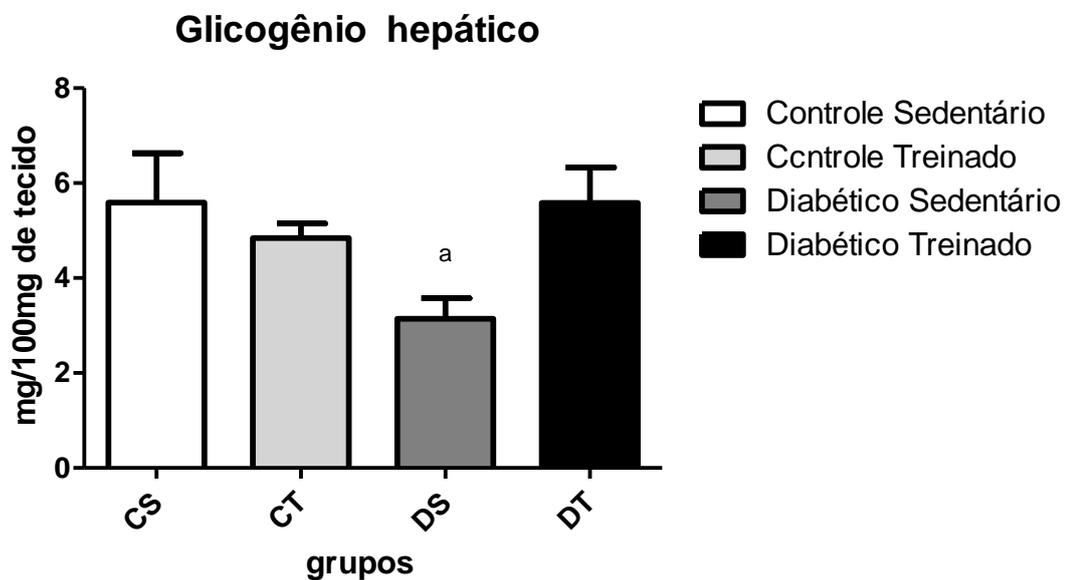


Gráfico 6 Concentração do glicogênio no fígado. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS, CT e DT.

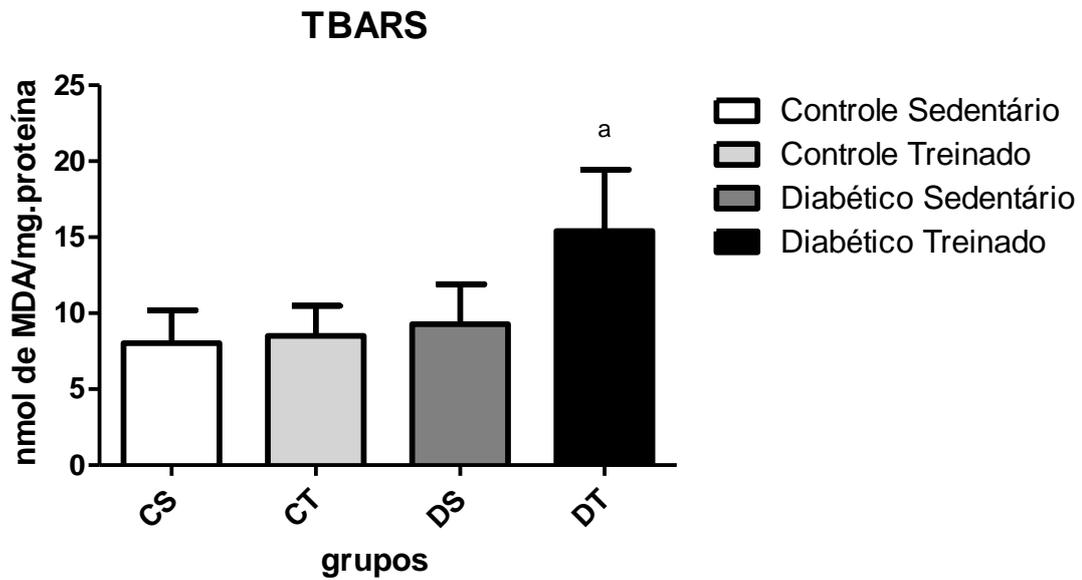


Gráfico 7 Quantidade de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico no tecido cerebral. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS, CT e DS.

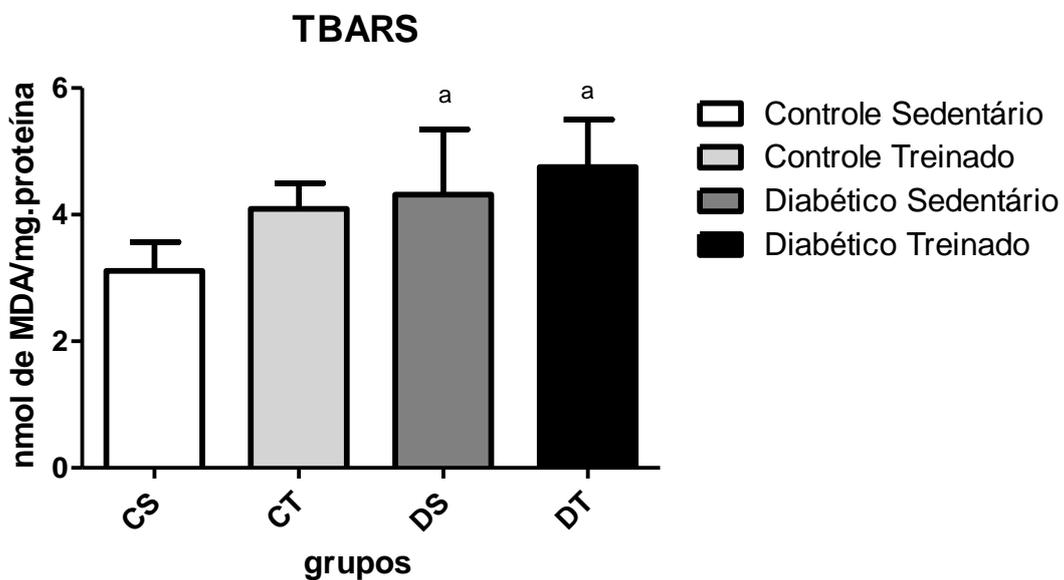


Gráfico 8 Quantidade de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico no tecido sanguíneo. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS.

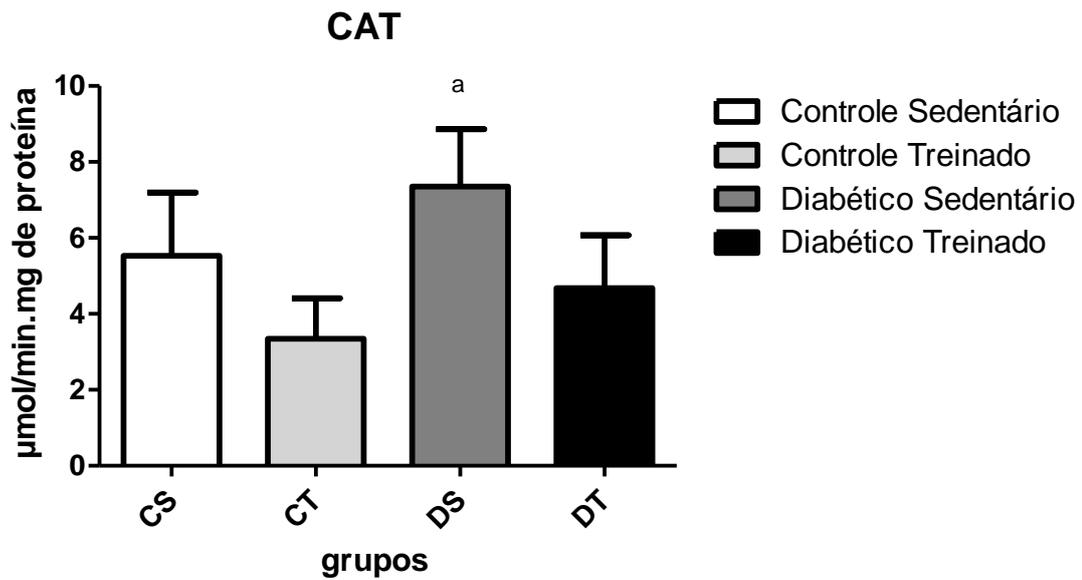


Gráfico 9 Gráfico 8 Atividade da enzima catalase no tecido cerebral. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS, CT e DT.

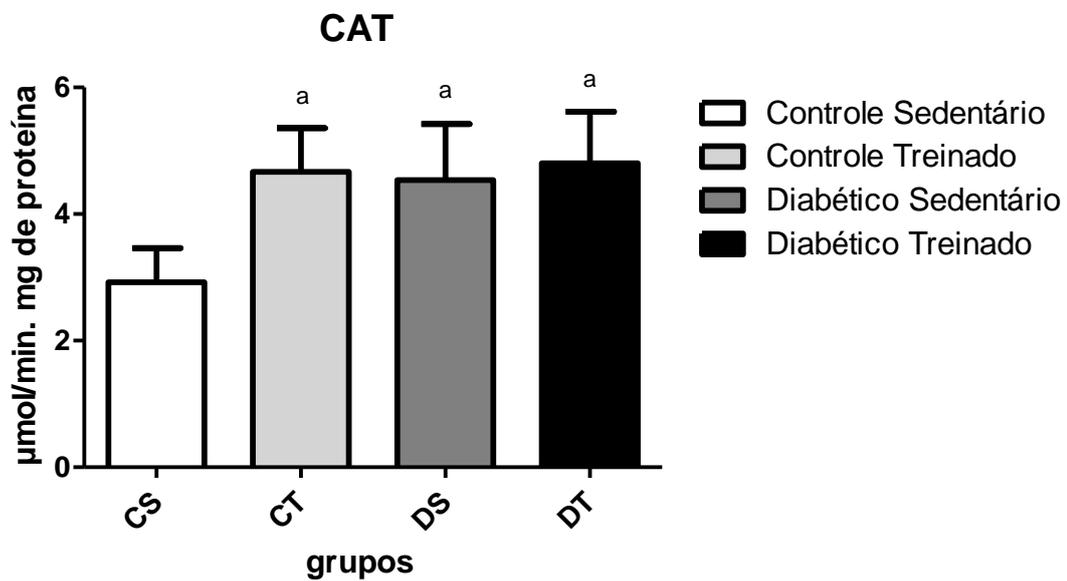


Gráfico 10 Atividade da enzima catalase no tecido sanguíneo. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS.

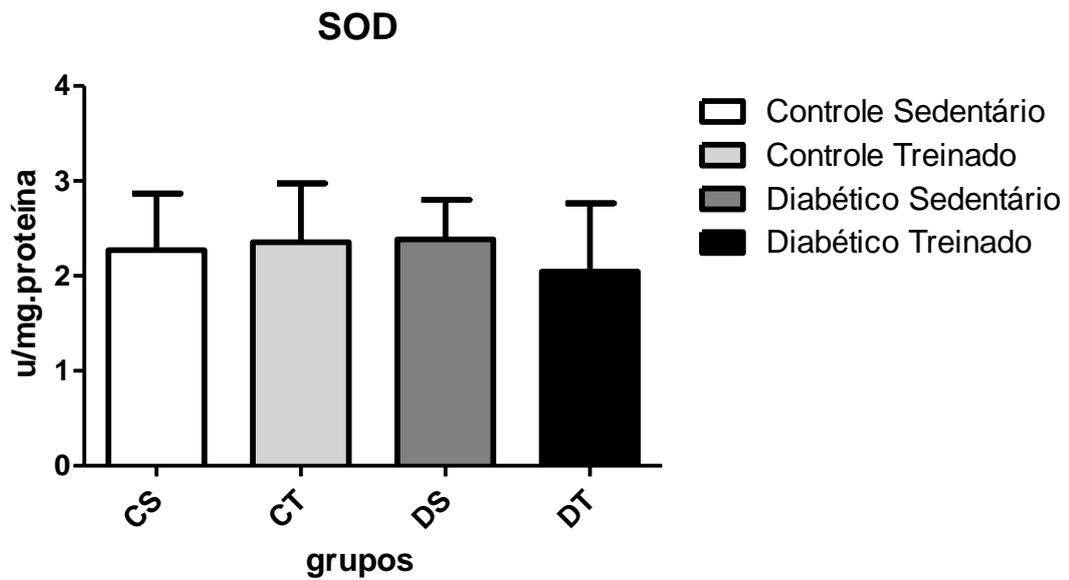


Gráfico 11 Atividade da enzima superóxido dismutase no tecido cerebral. Não houve diferença estatística significativa (ANOVA, $p > 0,05$).

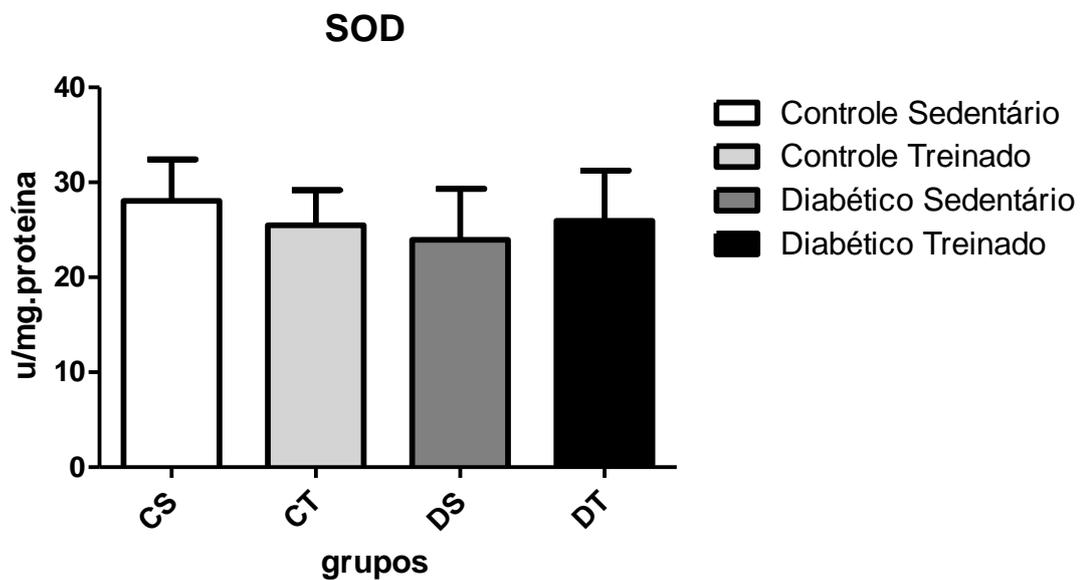


Gráfico 12 Atividade da enzima superóxido dismutase no tecido sanguíneo. Não houve diferença estatística significativa (ANOVA, $p > 0,05$).

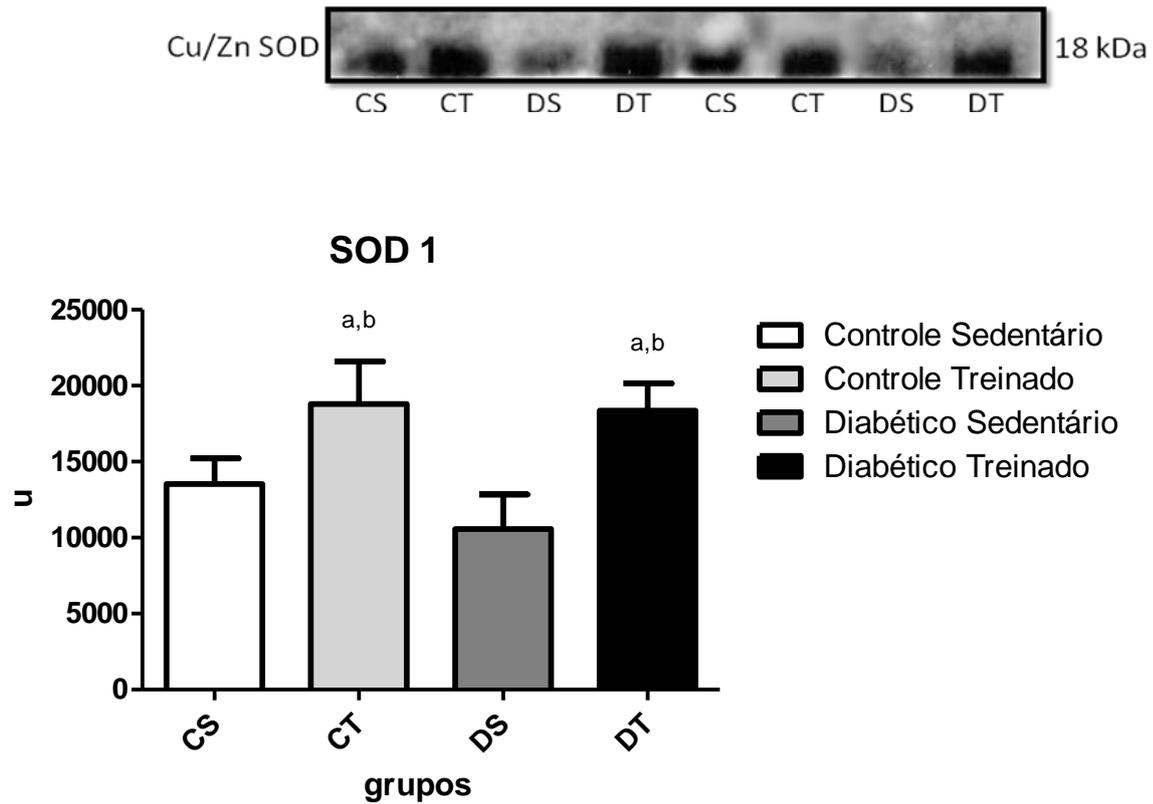


Gráfico 13 Detecção por *immunoblotting* da expressão da proteína Cu/Zn SOD no cerebelo dos animais. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS e b - diferente de DS.

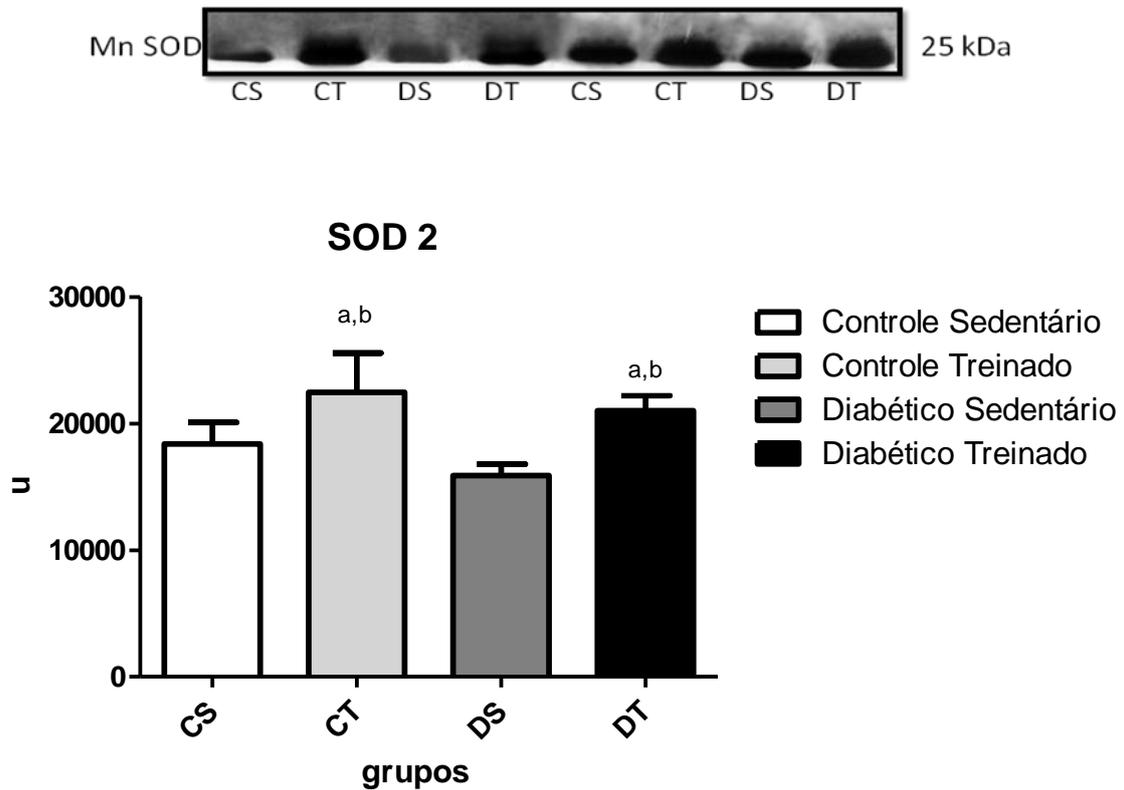


Gráfico 14 Detecção por *immunoblotting* da expressão da enzima Mn SOD no cerebelo dos animais. Diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$): a - diferente de CS e b - diferente de DS.

5 DISCUSSÃO

O quadro diabético induzido nesta pesquisa foi bastante severo, demonstrando a presença de hiperglicemia, redução da massa corporal total e ingestão hídricas e alimentares excessivas. Estas alterações estão relacionadas à drástica redução no número de células beta e se agravam ao longo da vida do animal (Lerco, 2003).

O Diabetes Mellitus induzido por meio de aloxana promoveu condições semelhantes aquelas encontradas em seres humanos, compartilhando sintomas parecidos como: hiperglicemia, poliúria, polidipsia, polifagia, entre outros (Lenzen, 2007). Importante ressaltar que, devido as suas propriedades químicas e seus efeitos biológicos, um dos mecanismos de ação da aloxana para a indução do DM, impactua na produção de espécies reativas de oxigênio, formando radicais superóxidos, peróxidos de hidrogênio e por fim radicais hidroxila, este último por sua vez é responsável pela necrose da célula beta-pancreática, a qual possui baixa capacidade antioxidante, causando sua apoptose (Lenzen, 2008).

No fígado há a produção de proteína c-reativa em resposta ao estímulo de citocinas inflamatórias (Visser, 1999). A reação inflamatória está intimamente ligada à DM tipo 2, majoritariamente ligada à obesidade. A inflamação gera grandes quantidades de citocinas inflamatórias, liberadas pelo tecido adiposo que estimulam a produção hepática de PCR (Das, 2001; Hak, 1999; Lumeng & Saltiel, 2011). Na presente pesquisa foi dosada a concentração plasmática da proteínas c-reativa ao final do experimento a fim de se observar alterações inflamatórias devido às condições da doença, porém não foi encontrado diferença significativa, uma vez que o comportamento dessa proteína pode ser extremamente discreto. Uma das possíveis explicações para tal fato é o curto período de exposição à doença. Sabe-se que os processos inflamatórios entre outras patologias do DM acentuam-se com maior período de tempo exposto à hiperglicemia, a qual leva à um processo inflamatório crônica de baixa intensidade agravando as condições do organismo (Ferroni, 2004; Lopes, 2007)

Vale ressaltar outro fator importante para a ausência da resposta inflamatória, a idade. Os animais do presente estudo (início: 60 dias de idade, término: 120 dias de idade), apresentavam um organismo novo, o que representa rápidas respostas fisiológicas no combate à adversidades. No envelhecimento, que está diretamente relacionado aos danos oxidativos às células, há diminuição

da eficiência do sistema imunológico, disfunções neurais, maiores riscos cardiovasculares, doenças degenerativas e maior risco de cancer. (Stadtman, 2002; Fries, 1980)

Por outro lado o exercício físico é capaz de atuar como um agente pró-inflamatório expressando maior quantidade de Interleucina-10 estimulada pelas células T, a qual tem ação anti-inflamatória, podendo mascarar os níveis de PCR. Há também a ação de uma importante citocina pró-inflamatória que, se liberada, compete com a fosforilação do receptor de insulina, o TNF- α , citocina a qual o exercício físico é capaz de inibe grande parte de sua produção, fornecendo melhores condições de captação de glicose pela insulina (Starkie, 2003).

Em constante condições de hiperglicemia há maior lipólise e cetoacidose. Isso faz com que os níveis de lipopolissacarídeos e de ácidos graxos livres, estejam aumentados. Essas substâncias se ligam ao *Toll Like Receptor* promovendo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-6, IL-1 β , CCL2 e JNK. O TNF- α , através de seu próprio receptor, fosforila a proteína IKK, a qual fosforila a proteína JNK que compete com a fosforilação do receptor de insulina (IR) desencadeando resistência ao hormônio. O IKK ainda é capaz de ativar um fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa\beta$) promovendo a maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e ativação da Proteína Tirosina fosfatase 1B (PTP1B), a qual pode desfosforilar o IR, causando maior resistência à insulina (Milanski, 2009; Shoelson, 2003; Kwon & Pessin, 2013).

O glicogênio hepático foi verificado a fim de se buscar repostas deste órgão frente ao metabolismo glicídico, uma vez que há altas concentrações de glicose circulante. O glicogênio é o principal estoque energético no tecido muscular (Roach, 2002) sendo regulado principalmente por ações hormonais, como a ação da insulina, do glucagon e de catecolaminas. Este substrato é utilizado quando há maior atividade metabólica, como por exemplo, durante o exercício físico. Quanto maior atividade exigida, maior será o recrutamento de glicogênio através da enzima glicogênio fosforilase e portanto, maior nível de glicose disponível (Romijn, 2003). O glicogênio hepático atua positivamente para a manutenção do exercício, ativando a via da glicogenólise e da neoglicogênese para a manutenção do aporte energético adequado. Na presente pesquisa, a grave hipoinsulinemia dos animais diabéticos pode ter contribuído para elevar os efeitos de hormônios contra-reguladores (cortisol, glucagon, catecolaminas e hormônio do crescimento) aumentando ainda mais a retirada de glicogênio (Wasserman, 2000).

No entanto, podemos destacar o controle da formação de glicose para a geração e manutenção de energia através das vias de sinalização independente de insulina através da via da proteína AMPK (Proteína quinase ativada por AMP) que possui relação direta ao gasto energético, entre outras. Há menor atividade da AMPK quando há maior gasto energético, ou seja, quando há maiores níveis de AMP do que ATP circulantes nas células, por exemplo, durante o exercício físico. A menor ativação da AMPK também ocasiona menor oxidação de ácidos graxos nos músculos, inibição da proteína CPT-1 no hipotálamo, inibindo a fome e como causa, redução da massa corporal (Rodgers, 2010; Ye, 2013)

Na presente pesquisa verificou-se que a massa dos animais diabéticos apresentou queda acentuada em relação à massa dos animais controles. Devido à morte das células beta e consequente redução acentuada de insulina no organismo, o metabolismo dos animais permaneceu em uma condição catabólica, fazendo com que a eficiência da absorção dos nutrientes, a manutenção estrutural dos tecidos, bem como suas funções fossem consideravelmente debilitadas.

O consumo alimentar e hídrico foram elevados dentre os animais diabéticos, sendo mais acentuado no grupo diabético sedentário, reforçando a premissa que este tipo de DM predispõe a maior fome e sede, mesmo diante de quadro catabólico (Leme, 2010). O grupo diabético treinado apresentou menor polifagia e polidipsia que o grupo diabético sedentário, o que em parte, é devido a atividade física permitir a entrada de glicose independente de insulina nas células musculares e consequentemente conseguir um melhor aproveitamento dos nutrientes. (Moura, 2011; Junior, 2013).

Ademais, nos animais diabéticos, a hipoinsulinemia parece levar a uma inibição da atividade neuronal do núcleo arqueado do hipotálamo, interferindo na estimulação e no controle da fome (Akasawa, 2007). Carvalheira et al. (2005), demonstrou que os mecanismos hipotalâmicos que regulam a fome são alterados diretamente pela ausência de leptina e/ou de insulina, através de uma troca de sinais entre suas vias de sinalização (*Cross-talk*). Ao se acoplar ao seu receptor, a leptina ativa a proteína JAK-2, a qual é capaz de fosforilar o fator de transcrição STAT-3 que atua no núcleo celular transcrevendo neuropeptídeos anorexigênicos (POMC/CART). Concomitantemente a este processo, a insulina, que está praticamente ausente nos animais diabéticos do presente estudo, potencializa a atividade transcricional do STAT-3 e/ou também através de sua própria via

específica de sinalização (IRS/PI3-q), onde o complexo PI3-q, capaz de fosforilar a proteína Akt, promove a saída do fator de transcrição FoxO1 do núcleo, inibindo a transcrição de agentes orexigênicos (NPY/AgRP), reduzindo a fome. Esses mecanismos podem ser sensibilizados pelo exercício físico, o que explica o menor consumo alimentar e hídrico nos animais treinados (Andres, 2008; Flores, 2006).

As espécies reativas de oxigênio interferem nos mecanismos hipotalâmicos. Foi recentemente melhor sustentado a idéia de que a formação destas espécies não é exclusiva do processo de oxidação, mas pode ser um importante resultado da modulação celular requisitada pela regulação do metabolismo energético (Diano, 2013). Tais achados indicam que o aumento de ERO é um fundamental sinal neuronal para redução da fome através da maior ativação de POMC, que parecem ser controlados diretamente pelos níveis de ERO (Benami, 2007; Horvath, 2009).

Com relação os marcadores de dano oxidativo, presente estudo teve-se ao dano a lipídeos. Os índices da peroxidação lipídica direcionam as investigações para microlesões nas membranas celulares e em lipídios de forma geral (Zwart, 1999). Durante a lipoperoxidação, moléculas intermediárias podem se fragmentar gerando hidrocarbonetos (etano, pentano), aldeídos (como o malonaldeído, 4-hidroxinonenal), e outros produtos altamente tóxicos. Como resultado da lipoperoxidação, as membranas sofrem modificações na permeabilidade e em sua fluidez, resultando em perda da homeostase celular e por fim, morte (Matsuo & Kaneko, 2001).

Neste contexto, vale destacar que a utilização do anestésico hidrato de cloral age em mecanismos de apoptose celular, como a ativação da via das caspases, maior formação de interleucinas inflamatórias e maior ativação dos co-ativadores de transcrição gênica (PGC1 e 2 alfa), o quais tem estreita relação com a produção de ERO por atuar na biogênese mitocondrial e por estes motivos pode contribuir para a lipoperoxidação (YS, 2002; Chen, 2011). Além disso, foi visto que a produção de ATP pela cadeia respiratória mitocondrial é o principal mensageiro para a produção de insulina pela célula beta pancreática. E ainda, que o DM pode provocar mutações ao DNA mitocondrial nesta mesma célula (Maechler & Wollheim, 2001). No presente estudo os produtos da peroxidação lipídica aumentaram significativamente para o grupo DT em relação aos outros grupos. Os processos inflamatórios gerados pela hiperglicemia crônica podem ter provocado

maior liberação de fatores que contribuem possivelmente para o aumento do número de ERO, os quais atacam as estruturas lipídicas das membranas celulares. Simultaneamente a estes processos, a maior atividade mitocondrial requisitada pelo exercício e pelas vias de sinalização descritas acima também desencadeiam maior produção de ERO causadores de danos à membrana lipídica (Ferreira, 2007), o que explicaria os achados deste estudo onde os níveis de TBARS foram elevados quando os animais diabéticos foram expostos ao treinamento.

Em estudo recente, Azizbeigi, et al. (2013), demonstraram que diferentes protocolos de exercício físico podem alcançar efeitos oxidativos semelhantes. No estudo em questão foi visto que um protocolo de treinamento de *endurance*, um protocolo de treinamento resistido e um protocolo de treinamento concorrente, mesclando os dois treinamentos anteriores foram capazes de aumentar a atividade enzimática da SOD e GSH-Px nos eritrócitos e também diminuir os níveis de malonaldeídos plasmáticos, principal substância indicadora da peroxidação lipídica. Embora em nosso estudo não tenha sido encontrado redução significativa dos valores de TBARS devido exclusivamente ao exercício, conforme descrita acima, a atividade enzimática da catalase e a expressão proteica da superóxido dismutase tiveram suas ações moduladas pelo treinamento.

Sabe-se que as enzimas antioxidantes são elevadas à medida que o consumo de oxigênio aumenta (Jekkins, 1993). No tecido cerebral, a enzima catalase teve sua atividade aumentada somente frente ao estado patológico. Este resultado mostra que o exercício foi eficaz em reduzir a ação oxidante do peróxido de hidrogênio nessas células, sendo dispensável uma maior ação enzimática mesmo com o alto consumo de oxigênio. Tal condição implica em uma estratégia molecular tecido-específica de atenuação do estresse oxidativo, haja vista que, no sangue, sua atividade fora aumentada significativamente tanto sob efeitos do exercício, sob efeitos da doença ou ambos.

Muito embora, estudos tenham evidenciado alterações na atividade da enzima superóxido dismutase, sendo verificado aumento na atividade dessa enzima em atletas e em indivíduos fisicamente ativos (Powers 1999; Ji, 1999), o presente estudo não constatou diferenças na atividade da SOD, indicando que a ação desta enzima foi, de certa maneira, equivalente para todos os grupos em ambos os tecidos sanguíneo e cerebral analisados, discordando também de estudos em que a atividade da mesma enzima foi elevada em eritrócitos através do exercício físico (Myazaki, 2001; Silva, 2010). Estes fatos podem estar

relacionados com o tipo de exercício a duração do treinamento e com a intensidade utilizada.

Tromm, et al. (2012), comparou os efeitos do treinamento físico no coração e no fígado de um grupo de camundongos que se exercitavam duas vezes (T2) na semana com um grupo de camundongos que se exercitavam três vezes na semana (T3), durante um período total de 8 semanas. Foi verificado que os marcadores de dano oxidativo (TBARS) foram reduzidos para o grupo T2 e a atividades enzimáticas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px foram aumentadas, principalmente para o tecido cardíaco, para o grupo T3, corroborando em partes com a presente pesquisa, onde a atividade da CAT sanguínea foi aumentada para os grupos CT, DS e DT.

É possível que longo períodos de intervalo não forneçam adaptação bioquímica necessária ao organismo para o combate à EROs ou ainda, dias consecutivos de treinamento físico intenso possam gerar uma condição estressante conhecida como *overtraining* caracterizada pela queda de rendimento, maior fadiga, inviabilizando o processo de recuperação celular (Silva & Macedo 2011)

Segundo Ji, (2002), a atividade e a expressão dessa enzima parecem ser moduladas pela concentração de espécies reativas de oxigênio produzidas durante o exercício, conforme descrito no estudo de Schneider, et al. (2005), onde o aumento da atividade da SOD está diretamente relacionada com a produção do radical superóxido. Neste sentido, foi realizado a expressão das isoformas SOD 1 e 2 no cerebelo. Apesar de terem sido mensuradas em outro tecido, acreditamos que as expressões das proteínas encontradas sejam muito semelhantes às proteínas encontradas no cérebro, devido suas similaridades estruturais.

As expressões das isoformas, quando expostas ao treinamento, mostraram aumento significativo em relação ao grupo controle sedentário e ao grupo diabético sedentário, corroborando com os achados de Ji (2002). Isso indica que talvez a ausência de atividade da SOD total no cérebro tenha sido camuflada pela ação extracelular da isoforma SOD 3.

Dada a especificidade e complexidade das reações químicas, ainda é precoce classificar o exercício físico no combate ao DM como um potente antioxidante. A esperança de que o exercício físico pode prevenir precisamente as instabilidades eletrônicas em quadros diabéticos ainda requer reconsiderações.

Alguns mecanismos bioquímicos são controversos, sendo necessários mais testes para o entendimento das bases moleculares dos agentes pró-oxidantes/antioxidantes e de seus efeitos, a fim de se encontrar respostas mais específicas que possam traduzir a nível molecular, o que acontece na célula e em suas organelas e, portanto, no organismo de forma geral.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados sobre a massa corporal total, a ingestão hídrica e alimentar dos animais, infere-se que as condições nocivas ao organismo geradas pelo diabetes mellitus foram amenizadas consideravelmente pelo treinamento físico estabelecido.

A utilização de glicogênio muscular e de glicose circulante em condições de exercício físico atenuou a ativação de vias glicogenolíticas no fígado.

O exercício físico pode regular ações enzimáticas no combate ao estresse oxidativo e pode ser considerado como um fator fisiogenômico positivo, aumentando a expressão de proteínas antioxidantes. Apesar dos mecanismos ainda necessitarem de uma melhor compreensão dos processos fisiológicos, a nível molecular, presentes no tecido neural como um todo, conclui-se que o exercício físico é uma ferramenta importante na modulação enzimática antioxidante.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. 105:121-126, 1984.
- AGUIAR, A.S.J. et al. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. 13(5), 2007.
- AKASAWA, A. et al. Ins2Akita mice exhibit hyperphagia and anxiety behavior via the melanocortin system. **Internacional Journal of Molecular Medicine**. 19:649-652, 2007.
- ANDRES, Z.B. et al. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals, **Nature**. 454:846-51, 2008.
- ARAÚJO, M.B. et al. Estresse oxidativo no exercício, modelos animais e intensidade de esforço. **Revista Motriz**. 12:307-312, 2006.
- AZIZBEIGI, K. et al. Antioxidant enzymes and oxidative stress adaptation to exercise training: Comparison of endurance, resistance, and concurrent training in untrained males. **Journal of exercise science & fitness**. 2013.
- AZZI, A. et al. Free radical biology - terminology and critical thinking. **Federation of European Biochemical Society**. 558:3-6, 2003.
- BARREIROS, A.L.B.S. et al. Estresse oxidativo: relação entre espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**. 29:113-123, 2006.
- BEATTIE, D.S. et al. Brain mitochondria. The relation of brain mitochondria to glycolysis. **J Cell Biol**. 19(2), Nov, 1963.
- BENAMI, A. et al. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. **Diabetes**, 56:152-60, 2007.

BRANDS, A.M. et al. Cerebral dysfunction in type 1 diabetes: effects of insulin, vascular risk factors and blood-glucose levels. **European Journal of Pharmacology**. 490(1-3):159-168, 2004.

CALDERON-CORTES, E. et al. Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age. **Mitochondrion**. 8(3):262-72, 2008

CARVALHEIRA J.B. et al. Cross-talk between the insulin and leptin signaling system in rat hypothalamus. **Obesity Research**. 13:48-57, 2005.

CERIELLO, A. Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. **Diabetes Medicine**. 14:45-49, 2004.

CHEN, S.D. et al. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α e mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. **International Journal of Molecular Sciences**. 12:7199-7215, 2011.

CHICCO, A.J. et al. Low intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. **Journal of Applied Physiology**. 100:519-527, 2006.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am. J. Clin. Nutr**. 72:637-647, 2000.

DÂMASO, A. Obesidade. Rio de Janeiro. ed. Medsi, 2003.

DAS, U.N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**. 17:953-66, 2001.

DIANO, S. Role of reactive species in hypothalamic regulation of energy metabolism **Endocrinology and Metabolism**. 28:3-5, 2013.

DUBOIS, M. et al. Calométic method for determination of sugar and related substances. **Anal Chem**. 28:350-356, 1956.

FATOKUN, A.A. et al. Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide in vitro: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands. **Brain Res.** 1132:193-202, 2007.

FERRONI P., et al. Inflammation, insulin resistance, and obesity. **Curr Atheroscler Rep.** 6:424-31, 2004.

FINKEL, T. et al. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, **Nature.** 408:239-247, 2000.

FLORES, M.B.S. et al. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of wistar rats. **Diabetes.** 55(9):2554-61, 2006.

FLOYD, R.A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Experimental Biology and Medicine.** 222:236-245, 1999.

FRANCES, M. et al. Glucose transporter proteins in brain. **The FASEB Journal.** 8:1003-11, 1994.

FRANK, B. Globalization of diabetes: role of diet, lifestyle and genes. **Diabetes Care.** 34:1249-57, 2011.

FREDOVICH, I. Superoxide radical and SODs. **Annual Review of Biochemistry.** 64:97-112, 1995.

FRIEDMAN, J.M. Obesity in the new millenium. **Nature.** New York. 404:632-34, April, 2000.

FRIES, J.F. Aging, natural death, and the compression of morbidity. **N Engl J Med.** 303:130-5, 1980.

FROBERG, S.O. Effects of training and of acute exercise in trained rats. **Metabolism.** 20(11):1044-51, Nov 1971.

GAAL, L.F.V. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**. 444:875-880, 2006.

GLEESON, M. et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature Reviews Immunology**. 11: 607-15, 2011.

GOBATTO, C.A. et al. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 130:21-27, 2001.

GROOS, J.L. et al. Diabetes mellito: diagnóstico, classificação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. 46:16-26, 2002.

GUEDES, D.P. et al. Fatores de risco cardiovasculares em adolescentes: indicadores biológicos e comportamentais. **Arq. Bras. Cardiol**. 86:439-50 2006.

HAK, A.E. et al. Associations of C-reactive protein with measures of obesity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis in healthy, middle-aged women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 19:1986-91, 1999.

HALLIWELL, B. et al. Free radical in biology and medicine. 2 ed. **New York: Oxford University Press**. 1989.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox Biology is a fundamental theme for aerobic life. **Plant physiology**. 141:312-322, 2006.

HASKELL, W.L. et al. Physical activity and public health. **ACSM/AHA recommendations**. [S.I.], 2007.

HOLTEN, M.K. et al. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**. 54:294-305 Feb, 2004.

HORVATH, T.L. et al. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. **Trens Endocrinol Metab.** 20:78-87, 2009.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Facts and Figures. Em: International Diabetes Federation. Disponível em <http://www.idf.org/>. Acesado em 10 de agosto, 2013.

IVRY, R.B.; KEELE, S.W. Timming functions of cerebellum. **Journal of cognitive neuroscience.** 1(2):136-52, 2007.

JENKINS, R.R. Exercise, oxidative stress and antioxidant: A review. **International Journal of Sports Nutrition.** 3: 356–375, 1993.

JENKINS, R.R. et al. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. **American Journal of Clinical Nutrition.** 72:670-674, 2000.

Jl, L.L. et al. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v. 222, p. 283-92, 1999.

Jl, L.L. Exercise induced modulation of antioxidant defense. **Annals of the New York Academy of Sciences,** New York, 959: 82-92, 2002.

JUNIOR, M.C. et al. Response of Creatine Kinase (CK) Levels in Diabetics Wistar Rats After Acute Physical Exercise. **JEPonline.** 16: 99-111, 2013.

LEME, J.A.C.A. et al. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos Wistar. **Bioscience Journal (Online).** 26: 451-456, 2010.

KANH, S.E. et al. Mechanisms linking insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature.** 444:840-846, 2006.

KARLSSON, J. et al Muscle glycogen utilization during exercise after physical training. **Acta Physio Scand.** 90:210-17, Jan 1974.

KELLER, J.N. et al. Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells express mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production. **J Neurosci**, 18(12):4439-50, 1998.

KWON, H.; PESSIN, J. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**. 4:2-13, Jun, 2013.

LENZEN, S. Alloxan and streptozotocin diabetes. **Endocrinology III lectures: time structures of endocrine systems project framework**. 119-138, 2007.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes. **Diabetologia**. 51:216-226, 2008.

LERCO, M.M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo Clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 18(2)132-142, 2003.

LIMA, E.S. et al. Peroxidação lipídica e mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revistas Brasileiras de ciências farmacêuticas**. 37(3), 2001.

LOPES H.F. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. **Revista Brasileira de Hipertensão**. 14(4): 239-244, 2007.

LUCIANO, E. et al. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Revista Paulistas de Educação Física**. 2:202-209, 1998.

LUCIANO, E. et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**. 147:149-157, 2002.

LUMENG, C.N.; SALTIEL, A.R. Inflammatory links between obesity and metabolic diseases. **J Clin Invest**. 121(6):2111-17, 2011.

MAECHLER, P.; WOLLHEIM, C.B. Mitochondrial function in normal and diabetics β -cells. **Nature**. New York, 414:807-812, 2001.

MARLISS, E.B. et al. Intense exercise has unique effect on both insulin and release and its roles in glucoregulation. **Diabetes**. 51:271-283 ,2002.

MATSUO, M.; KANEKO, T. The chemistry os reactive oxygen species and related free radicals. **Free radicals in exercise and aging**. 1-33, 2001.

MATSURABA, L.S. et al. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 42:61-8, 2007.

McGREGOR, V.P. Limited impact of vigorous exercise on defenses against hypoglycemia. **Diabetes**. 51:1485-92, 2002.

MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory effect response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J Neuroscience**. 29(2):359-70, 2009.

MIYAZAKI, H. et al. Strenous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. **European Journal of Applied Physiology**. 84:1-6, 2001.

MONDON, C.E. et al. Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest. **American Journal of Physiology**. 239:169-77, 1980.

MOURA, L. et al. Glucose homeostasis in type 1 diabetic rats after acute physical activity. **JEPonline**. 14:8-19, 2011.

NOGUEIRA, D.M. Métodos de bioquímica clínica: Técnicas e Interpretação. Pancast: São Paulo, 465, 1990.

OHTSUKI, T. et al. Mitochondrial lipid peroxidation and superoxide dismutase in rats hypertensive target organs. **Am J Physiol**. 268(4):1418-21 1995.

OKAWA, H. et al. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. 95:351-358, 1979.

OLIVEIRA, C. et al. Effects of swimming training at the intensity equivalent to aerobic/anaerobic metabolic transition in alloxan diabetic rats. **Journal of Diabetes and its Complications**. 21:258-264, 2007.

PAULI, J.R. et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinaseB/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **J Physiol**. 15(2):659-71, Jan 2008.

PAULI, J.R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. 53: 399-408, 2009.

PEDERSEN, B.K. et al. Evidences for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scand J Med Sci Sports**. 16:3-63, 2005.

POWERS, K.S.; HAMILTON, N.K. Antioxidants and exercise. **Clin Sports Med**. 18:(3):525-36, 1999.

POWERS, S.K. et al. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. **Journal of Physiology**. 589: 2129-38, 2011.

POWERS, S.K; JI, L.L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, Madison, v. 31, p. 987-97, 1999.

PRADA, F.J.A. et al. Condicionamento aeróbio e estresse oxidativo em ratos treinados por natação em intensidade equivalente ao limiar anaeróbio. **R. bras. Ci e Mov. Brasília**. 12(2):29-34, 2004

REIS, J.S. et al. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. 57:1096-1105, 2008.

ROACH, P.J. Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med*. 2:101-120, 2002.

ROBERTSON, C.L. et al. Mitochondrial dysfunction contributes to cell death following traumatic brain injury in adult and immature animals. **J Bioenerg Biomembr**. 36(4):363-8, 2004.

ROMIJIN, J.A. et al. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. **Am J Physiol (Endocrinol Metab)**. 265:E280-91,1993.

RODGERS J.T. et al. Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis. **Cell Metabolism**. 11(1):23-34, 2010.

ROPELLE, E.R. et al. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica. **Rev Motriz**. 11:49-55, 2005.

SCHNEIDER, C.D. et al. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. v. 10, 2004.

SHOELSON, S.E. et al. Inflammation and the IKK beta/I kappa N/NF-kappa B axis in obesity – and diet-induced insulin resistance. **Int J Obes Relat Metab Disord**. 27:40-52, 2003.

SILVA, N.R. et al. A hiperglicemia e os mecanismos envolvidos nas disfunções vasculares do Diabetes Mellitus. **Arquivos de Ciência e Saúde Unipar**. 12:265-270, 2008.

SILVA, A.L. et al. Comparação do treinamento de quatro semanas e oito semanas sobre atividade da cadeia transportadora de elétrons e marcadores de estresse

oxidativo em fígado de camundongos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 16(2), 2010.

SILVA, F.O.C; MACEDO, D.V. Exercício físico, processo inflamatório e inflamação: uma visão geral. **Revsita Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**. 13(4):320, 2011.

Sociedade Brasileira de Diabetes: Diagnóstico e Tratamento do Diabestes Tipo 1, novembro, 2012.

SOUZA, T.P.J. et al. Exercício físico intenso como pró-oxidante: mecanismos de indução de estresse oxidativo e conseqüências. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, 16, 2009.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**. 257:1220-24, 2002.

STARKIE, R. et al. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. **The FASEB Journal**. 10.1096/02-067, 2003.

TIIDUS, P.M. et al. Radical species in inflammation and overtraining. **Canadian Journal of physiology and pharmacology**. 76:533-538, 1998.

TOMLINSON, K.C. et al. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. **Pharmacology Reviews**, 44:103-150, 1992.

TROMM, C.B. et al. Effects of different frequencies weekly training on parameters of oxidative stress. **Revsita Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**. 14(1):52. 2012.

VERTUANI, S. et al. The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**. 10:1677-94, 2004.

VISSER, M. et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. **JAMA**. 282:2131-5, 1999.

VOLTARELLI, F.A. et al. Determination of anaerobic threshold in rat using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35:1389-94, 2002.

WASSERMAN, D.H.; VRANIC, M. Interaction between insulin and counterregulatory hormones in control of substrate utilization in health and diabetes during exercise. **Diabetes Metabolism Reviews**, New York, 1:359-384, 1986.

World Health Organization. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2013).

YE, J., et al. Mechanism of insulin resistance in obesity. **Front Med**. 7(1):14-24, 2013.

YS, H. et al. Lipid peroxidation and cell death mechanisms in rats and human cells induced by chloral hydrate. **Food and chemical toxicology**. 41:621-629, 2003.

ZWART, L.L. et al. Biomarkers of free radical damage - applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology & Medicine**. 26:202-226, 1999.