

**EDENIR SERAFINI**

**EFEITOS PREVENTIVOS DO EXERCÍCIO FÍSICO  
VOLUNTÁRIO EM RATOS INDUZIDOS AO DIABETES TIPO I  
POR ESTREPTOZOTOCINA**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade do  
Extremo Sul Catarinense para  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre  
Pastoris Muller.

CRICIÚMA  
2016

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S481e Serafini, Edenir.

Efeitos preventivos do exercício físico voluntário em ratos induzidos ao diabetes tipo 1 por estreptozotocina / Edenir Serafini ; orientador : Alexandre Pastoris Muller. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

62 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Diabetes mellitus – Tratamento. 2. Diabetes mellitus – Exercícios terapêuticos. 3. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos. 4. Hiperglicemia. I. Título.

CDD 22. ed. 616.462062

# FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.  
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)**  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

## ATA DE Mestrado em Ciências da Saúde – Nº 252

Com início às 09h00 (nove horas) do dia primeiro do mês de julho de 2016 (dois mil e dezesseis), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Edenir Serafini**, sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Pastoris Müller, intitulada **“Efeitos do exercício físico voluntário prévio em ratos induzidos ao diabetes tipo I por estreptozotocina”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof. Dr. Luis Valmor Portela (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 10h00 (dez horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 01 (primeiro) de julho de 2016 (dois mil e dezesseis).

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza  
Coordenador do PPGCS

Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza  
Coordenador do PPGCS

Diana Ghisi Daniel  
Auxiliar Administrativo PPGCS

Diana Ghisi  
Diana Ghisi Daniel  
Secretária



## **FOLHA INFORMATIVA**

Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



*“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”*

*Ayrton Senna*

*Dedico este trabalho a Ernesto e Doralice. Princípio, exemplo e  
fortaleza!*





## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a Deus por ter me acompanhado nesta difícil caminhada, por ser meu elo, meu porto seguro e minha companhia durante as madrugadas percorridas dirigindo.*

*Agradeço aos meus Pais Ernesto e Doralice, pelo incentivo, apoio, compreensão, ensinamentos e amor durante todo o trabalho.*

*A minha irmã Luciane e meu cunhado Aguilar, pelo incentivo, exemplo de ser humano e caráter*

*A minha sobrinha e afiliada Alana.*

*Ao meu orientador, Professor Dr. Alexandre Pastoris Muller, pelos ensinamentos, orientações e contribuições na minha formação acadêmica e profissional, e pela atenção dada, muitas vezes se privando do seu descanso.*

*A professora Mari Lucia Sbardeloto, por ter me incentivado a realizar o Mestrado, e por todo auxílio desde minha formação acadêmica.*

*Aos meus supervisores em especial a Alessandra Sonda pelo exemplo de liderança, pessoa, incentivo e compreensão das ausências no trabalho dedicadas as viagens de estudo.*

*Aos meus amigos e parceiros pelo incentivo, companheirismo e compreensão.*

*A todo corpo docente do PPGCS-UNESC pela colaboração na formação.*

*“Deem-me dúvidas, pois eu não sei”.*



## RESUMO

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença de epidemia mundial, e sua prevalência está aumentando exponencialmente em todo o mundo bem como no Brasil, onde a ocorrência do DM é de 5,2% da população em indivíduos com mais de 18 anos. A DM desequilibra o metabolismo da glicose ocasionando hiperglicemia e apresentando diversas comorbidades, dentre elas, alterações na função pancreática, renal e complicações cardiovasculares. O exercício físico (EF) é prescrito como um dos pilares do tratamento desta doença, auxiliando na regulação da glicemia, manutenção do peso corporal, e do metabolismo dos tecidos. No entanto, os efeitos do EF como fator protetor ao DM não são completamente conhecidos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do EF voluntário prévio a indução de DM I sobre a glicemia, concentração de glicogênio e a função mitocondrial no fígado e no quadríceps de camundongos. Esta pesquisa utilizou camundongos Swiss machos, 8 semanas de idade, divididos em exercitados (gaiola com roda de exercício físico, Ex), sedentários (gaiola com roda de exercício físico fixa, Sed) com ou sem indução de DM, (Sed STZ ou Ex STZ). Após 30 dias de exercício voluntário o grupo DM foi induzido por STZ, seguido por análise da glicose de jejum, conteúdo de glicogênio, consumo de O<sub>2</sub>, produção peróxido hidrogênio e potencial de membrana mitocondrial no músculo e fígado. Nossos resultados mostraram que o EF prévio diminuiu a glicemia em jejum quando comparados com grupo Sed STZ; concomitantemente houve manutenção do glicogênio hepático o qual teve sua concentração diminuída no grupo Sed STZ; houve aumento na função mitocondrial no músculo quadríceps dos animais EX STZ quando comparados ao grupo Sed STZ; o consumo de O<sub>2</sub> hepático foi diminuído nos animais que receberam STZ. Conclui-se que os trinta dias de exercício voluntário prévio em camundongos, previne a hiperglicemia de jejum induzida pela administração de STZ pela manutenção do glicogênio hepático e pelo aumento do metabolismo mitocondrial no músculo esquelético. Deste modo, melhora a capacidade do corpo responder ao DM I.

**Palavras chave:** Diabetes mellitus; Estreptozotocina; Exercício Físico Prévio; Hiperglicemia.



## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a worldwide epidemic disease, and its prevalence is exponentially increasing over the world, and also in Brazil, where it reaches 5,2% of the population among individuals of over 18 years old, characterized by alteration in glucose metabolism, causing hyperglycemia and several comorbidities, such as alterations in pancreatic and renal function and cardiovascular complications. Physical exercise (PE) is prescribed as one of the mainstays of treatment of this pathology, helping regulate glycaemia, maintenance of body weight, and tissue metabolism. However, the effects of PE as a protection factor of DM are limited. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effects of PE previous to the induction of DM I, through the model of streptozotocin (STZ) on glycaemia, glycogen concentration and both liver and skeletal muscle mitochondrial function. This research used male Swiss mice, divided between exercised (cage with voluntary exercise wheel), sedentary (cage with fixed exercise wheel) and with or without DM (STZ induced 180mg/kg). After 30 days of voluntary exercise, the DM was induced by STZ, we analyzed fasting glucose, liver and muscle glycogen, O<sub>2</sub> consumption, hydrogen peroxide production and liver and muscle mitochondrial membrane potential. Our results showed that previous PE lowers fasting glucose when compared to Sedentary STZ group; concomitant there was maintenance in liver glycogen, which had its concentration lowered in Sedentary STZ group; there was increasing of quadriceps muscle mitochondrial function in Exercise STZ when compared to Sedentary STZ group; liver O<sub>2</sub> consumption was lowered in animals that received STZ. It can be concluded that 30 days of previous voluntary exercise in mouse prevent fasting hyperglycemia STZ induced, by maintaining of liver glycogen and increasing of skeletal muscle mitochondrial metabolism. Hence, improves the body's capacity to respond to DM I.

**Key-words:** Diabetes mellitus; Hyperglycemia; Previous Physical Exercise; Streptozotocin.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 HIPERGLICEMIA .....	18
1.2 METABOLISMO DA GLICOSE NO DM.....	19
1.3 METABOLISMO DO GLICOGÊNIO .....	20
1.4 CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS .....	22
1.5 EXERCÍCIO FÍSICO E REGULAÇÃO DA GLICEMIA.....	23
1.6 MODELO DE DM TIPO I.....	25
2 OBJETIVOS .....	27
2.1 GERAL .....	27
2.2 ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 ANIMAIS .....	29
3.2 EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO .....	29
3.3 INDUÇÃO DO DIABETES.....	29
3.4 DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR..	30
3.5 PRODUÇÃO DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	30
3.6 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ ).....	31
3.7 CONSUMO DE OXIGÊNIO (O <sub>2</sub> ) .....	31
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
4 RESULTADOS.....	33
4.1 EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO PREVINE A HIPERGLICEMIA EM JEJUM .....	33
4.2 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO E DO DIABETES SOBRE PARÂMETROS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS .....	35
4.3 STZ MODULADA EM FUNÇÃO MITOCONDRIAL DO MÚSCULO .....	38
5 DISCUSSÃO .....	41
6 CONCLUSÃO .....	53
REFERÊNCIAS.....	55





## 1 INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é considerado atualmente um grupo de distúrbios metabólicos caracterizado por alterações principalmente envolvendo o metabolismo da glicose, levando ao quadro de hiperglicemia por defeitos na ação da insulina, secreção da insulina ou ambas. O DM apresenta diversas comorbidades, dentre elas alterações na função pancreática, renal e complicações cardiovasculares, sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade no mundo (Silva et al., 2012; Hall et al., 2013). Atualmente a DM é uma doença de epidemia mundial, e sua prevalência esta aumentando exponencialmente em todo o mundo e também no Brasil, onde a ocorrência do diabetes é de 5,2% da população em indivíduos com mais 18 anos (Silva et al., 2014).

São propostas 4 classificações etiológicas para o DM atualmente: diabetes mellitus tipo I (DM I); diabetes mellitus tipo II (DM II); outros tipos específicos de diabetes mellitus; e o diabetes gestacional (SBD, 2015). Os tipos mais prevalentes são DM I e DM II. No DM I, presente em 5-10% dos casos, ocorre destruição das células beta do pâncreas, usualmente por processo autoimune ou menos comumente de causa desconhecida (forma idiopática) (SBD, 2015). No DM I a cetoacidose é um sintoma comum e os pacientes necessitam receber insulina exógena para que possam controlar a glicemia. O DM II é mais comum do que o DM I, perfazendo cerca de 90% dos casos de DM. É caracterizada por distúrbios da ação e secreção da insulina, na qual as células alvo têm uma resposta ineficiente aos níveis normais de insulina circulante (Correia et al., 2002). A destruição autoimune do pâncreas não está envolvida (Gross et al., 2002). O DM II está associado intimamente à ocorrência de sobrepeso e obesidade e, normalmente é diagnosticado após os 40 anos. A cetoacidose é rara e os pacientes não dependem de insulina para sobreviver, porém esta pode ser necessária para auxiliar no controle da glicemia.

Para classificação dos níveis de glicose sanguínea, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) baseia-se nos níveis de glicemia de jejum de no mínimo 8 horas, de acordo com a seguinte classificação: normal,  $<100$ ; tolerância à glicose diminuída  $>100$  a  $<126$ ; e DM,  $\geq 126$ . Para o diagnóstico de DM outros sinais clínicos e bioquímicos também devem ser levados em consideração (SBD, 2015).

Independente do tipo de DM, o exercício físico é prescrito como um dos pilares do tratamento desta doença, auxiliando na regulação da glicemia, manutenção do peso corporal, e do metabolismo dos tecidos (Ferreira e Vivolo, 2014). Entretanto, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, 31% dos adultos no mundo não praticam qualquer tipo de exercício físico. O sedentarismo está associado como o quarto fator de risco para a mortalidade global (6% das mortes no mundo), o que equivale a aproximadamente 3,2 milhões de mortes por ano (OMS, 2014).

## 1.1 HIPERGLICEMIA

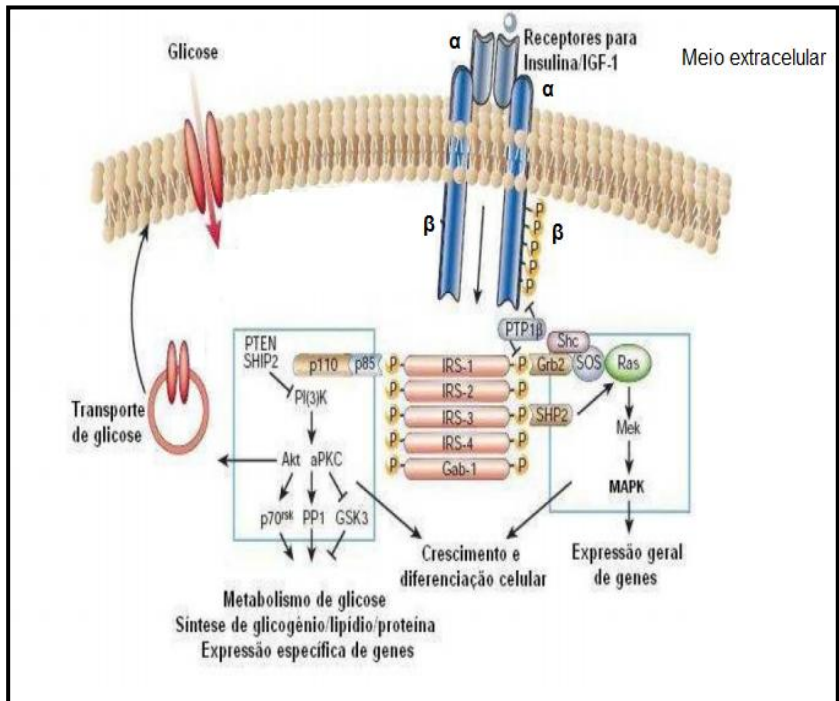
A hiperglicemia é o aumento dos níveis de glicose no sangue, acontece quando há pouca ou nenhuma produção de insulina no organismo, no caso do DM I ou quando ocorre problemas na sua sinalização nos tecidos alvos, no caso DM II (Raduan, 2014). A hiperglicemia pode ser causada pelo excesso de alimentação e sedentarismo (Ferreira et al., 2011). As manifestações clínicas da hiperglicemia em humanos se apresentam na forma de poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva, podendo levar à complicações agudas com risco de morte: a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica (Gross et al., 2002). A hiperglicemia crônica em indivíduos com DM que não seguem um tratamento adequado pode causar danos em diversos órgãos e tecidos, como no sistema vascular, coração, retina, rins, fígado (Sigal et al., 2008). A disfunção endotelial nos indivíduos hiperglicêmicos é uma das principais causas das complicações vasculares associadas (Beckman et al., 2001).

Estudos têm mostrado que a mudança no estilo de vida (adoção de uma vida mais ativa e dieta adequada) é uma medida muito importante para o controle da hiperglicemia, auxiliando na manutenção de um melhor controle glicêmico e retardando complicações crônicas da doença. Efeitos benéficos na hemoglobina glicada de 11 pacientes com DM I após 12 semanas de exercício aeróbico associado ao exercício resistido foram demonstrados (Mosher et al., 1998). Melhoras no controle metabólico foram identificadas (Valerio et al., 2007) ao avaliar crianças e adolescentes que praticavam atividade física regular em modalidades esportivas. De maneira similar (Ropelle et al., 2006),

evidenciaram que o exercício agudo aumentou a sensibilidade à insulina durante a alimentação rica em gorduras em ratos obesos.

## 1.2 METABOLISMO DA GLICOSE NO DM

O desequilíbrio glicêmico é característica marcante do DM. A glicose da corrente sanguínea é transportada por difusão facilitada para o interior das células via seus transportadores de alta capacidade do tipo GLUT (Brown, 2000). O GLUT4, presente no músculo e tecido adiposo (Figura 1); e o GLUT2, presente no fígado.



**Figura 1- Via Molecular da Insulina.** A ativação da Akt aumenta a captação periférica de glicose principalmente no tecido muscular e adiposo por aumentar o direcionamento dos transportadores de glicose (GLUTs), do citoplasma para a membrana plasmática, o que resulta no aumento da captação celular de glicose por difusão facilitada após a ingestão alimentar. Fonte: (Saltiel e Kahn, 2001).

Uma vez dentro da célula, a glicose pode ser metabolizada à piruvato e/ou lactato e  $\text{CO}_2$  formando adenosina trifosfato (ATP) nas rotas conhecidas como glicólise aeróbia e anaeróbia, respectivamente. A regulação destas vias, tanto no citosol, glicólise anaeróbia, como na mitocôndria, glicólise aeróbia, é essencial para a manutenção dos níveis energéticos além de compostos intracelulares (McArdle et al., 2013). A homeostase da glicose é resultado da interação entre a secreção de insulina por parte das células  $\beta$ -pancreáticas e da captação de glicose por parte dos tecidos periféricos sensíveis à insulina (Pauli et al., 2009). O aumento da glicemia estimula a secreção de insulina, que, por sua vez, diminui a concentração de glicose dose-tempo dependente (SBD, 2015). Além disso, a formação de glicogênio no hepatócito serve para manter o status energético e regular os níveis de glicose sanguínea. A insulina estimula o acúmulo de glicogênio através do aumento do transporte de glicose no músculo e síntese de glicogênio em fígado e músculo (Abel et al., 2001). Este último efeito é obtido via desfosforilação da glicogênio sintetase (Campbell, 2000). Após estímulo com insulina, a enzima serina/treonina quinase (Akt) fosforila e inativa a Glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3  $\beta$ ), o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio-sintetase, aumentando sua atividade (Shulman et al., 1995).

Indivíduos diabéticos, sem um tratamento adequado, com hiperglicemia crônica, os mecanismo de regulação do metabolismo da glicose ficam prejudicados e tendem a ter um aumento das espécies reativas de oxigênio que por sua vez poderão levar a um estado de estresse oxidativo, atentando a funcionalidade mitocondrial (Reis et al., 2008). Em humanos, o excesso de radicais livres contribui com a perda da integridade da membrana da célula muscular em função da reação de oxi-redução dos radicais livres com a camada bilipídica que forma as membranas celulares (Godois et al., 2014).

### 1.3 METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

A glicose é armazenada nos tecidos corporais (principalmente no músculo e no fígado) na forma de glicogênio, que é um polímero de glicose. Nestes tecidos, o glicogênio é armazenado na forma de grânulos, onde estão presentes também as enzimas responsáveis pela sua metabolização. A fisiologia do músculo esquelético é diferente daquela do fígado, pois somente estoca glicogênio para satisfazer suas necessidades próprias, enquanto que o glicogênio hepático é utilizado

principalmente para manutenção dos níveis de glicose sanguíneos (Shephard e Johnson, 2015).

O fígado, através de seu estoque de glicogênio, é o único órgão capaz de manter constante as concentrações de glicose sanguínea por um certo período de tempo (Jackson et al., 2002). A concentração de glicose circulante é determinada pelo balanço entre a taxa de liberação de glicose pelo fígado e a taxa de consumo desta pelos outros tecidos. (Silveira et al., 2008). A síntese e a degradação do glicogênio estão diretamente relacionadas à ação de duas enzimas, a glicogênio sintetase (síntese) e a glicogênio fosforilase (degradação), as quais estão sob a regulação dos hormônios insulina e glucagon (Costa et al., 2008, Qu et al., 2014). A síntese do glicogênio ocorre quando a glicose circulante entra nas células hepáticas e musculares através dos GLUTs, sendo que a concentração elevada de glicose intracelular provoca a dissociação da hexoquinase da sua proteína nuclear reguladora. Uma vez ativa, a glicoquinase (fígado) ou hexoquinase (músculo), fosforila a glicose formando glicose 6-fosfato, o que estimula a glicólise (nas células musculares) ou fornece o material para a síntese do glicogênio. O glicogênio hepático serve como reservatório de glicose para os tecidos, quando a glicose da alimentação não está disponível, particularmente para o sistema nervoso central (Prats et al., 2005; Prats et al., 2009).

Quando os níveis de glicose sanguínea diminuem, ocorre um aumento na secreção do hormônio glucagon, que tem a função principal de sinalizar a liberação de glicose para a circulação, proveniente da degradação do glicogênio hepático. O glucagon liga-se ao seu receptor de membrana nos hepatócitos e acarreta na ativação de uma enzima denominada PKA (Proteína cinase A). A quebra do glicogênio requer uma reação de desramificação para fosforilar as ligações glicosídicas dos resíduos de glicose, nos pontos ramificados da estrutura de glicogênio (Devlin, 2011). A primeira reação é catalisada pela enzima glicogênio-fosforilase, a qual cliva as ligações (alfa 1-4) do glicogênio. Neste instante, moléculas de glicose 1-fosfato são liberadas. A enzima fosfoglicomutase pode converter a glicose 1-fosfato em glicose 6-fosfato (reação reversível). O fígado possui a enzima glicose 6fosfatase que defosforila a glicose 6-fosfato para ser liberada para a corrente sanguínea, a qual será captada por outros tecidos e utilizada na glicólise no músculo (Campbell, 2000; Ha et al., 2014).

## 1.4 CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS

A geração de energia é fundamental para manutenção da homeostase e a oxidação dos macronutrientes é a principal forma de gerar ATP. Os elétrons removidos do substrato (glicose, por exemplo) são passados a um carregador de elétrons, uma coenzima chamada de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ), funcionando como um agente oxidante durante as etapas anteriores da respiração, que é reduzido à NADH. O fluxo de elétrons na cadeia respiratória é realizado por intermédio de um espectro redox do  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  para  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ , passando por três grandes complexos proteicos. São eles o NADH-Quinona oxidoreductase (Complexo I), nele os elétrons são transferidos do NADH para a coenzima Q (Q), conhecida como ubiquinona, o Q-citocromo e c-oxidoreductase (Complexo III), que transfere os elétrons adiante para o citocromo c e o citocromo c-oxidase (Complexo IV), completando a cadeia, onde os elétrons são transferidos para o  $\text{O}_2$ , formando  $\text{H}_2\text{O}$  (Gonçalves et al., 2015).

A fosforilação oxidativa acontece por meio da ATP sintase. Esta enzima utiliza a energia próton-motriz, gerada pelo bombeamento de prótons pelos complexos da cadeia de transporte de elétrons, para fosforilar ADP, gerando ATP. Em contraposto da grande variedade de mecanismos utilizado por diferentes organismos para gerar a força próton-motriz, a ATP sintase é altamente conservada e esta presente em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias aeróbias ou fotossintetizantes (Nicholls e Ferguson, 2002).

A cadeia transportadora de elétrons pode ser regulada pelo estado energético celular, pela regulação das proteínas transportadoras e também pela sinalização hormonal, qualquer distúrbio nestes fatores pode induzir ao aumento na produção da de espécies reativas de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007). De acordo com essas proposições, vários estudos têm demonstrado que a deficiência da via de insulina / IGF1 pode causar disfunção mitocondrial e aumentar os danos do estresse oxidativo (Muller et al., 2008). A disfunção mitocondrial pode causar redução de atividades complexas da cadeia respiratória e aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (Harman, 1956). No entanto, num cenário de diminuição da capacidade antioxidante mitocondrial, ou aumento exacerbado da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ocorrer o estresse oxidativo que provoca danos oxidativos prejudicando o metabolismo (Silva e Ferrari, 2011). Em condições normais, a maioria

de  $H_2O_2$  celular é produzida pela mitocôndria e é prontamente metabolizado por enzimas antioxidantes. (Muller et al., 2012).

## 1.5 EXERCÍCIO FÍSICO E REGULAÇÃO DA GLICEMIA

O exercício físico é um dos pilares no tratamento do DM para controlar a glicemia (Ferreira e Vivolo, 2014). No entanto, os mecanismos pelos quais a atividade física melhora o perfil glicêmico nesses pacientes são intensamente pesquisados, e parcialmente conhecidos. Alguns autores acreditam que a redução da glicemia em pacientes com diabetes seja decorrente da perda de peso induzida pelo aumento do gasto energético promovido pelo exercício (Ciolac e Guimarães, 2004; Despres e Lemieux, 2006; Riddell e Perkins, 2009).

O gasto energético esta associado a qualquer tipo de atividade física, uma vez que o tecido muscular utiliza energia para sua contração. No repouso, a principal fonte de energia é proveniente da oxidação dos ácidos graxos livres (McArdle et al., 2013). No início do exercício, os carboidratos assumem maior importância como fontes eficazes de produção energética (Ferreira e Vivolo, 2014). A contribuição percentual dos carboidratos como fonte primária de energia para contração muscular se eleva à medida que aumenta a intensidade do exercício (Pithon-Curi, 2013). No entanto, em exercícios de longa duração os ácidos graxos livres passam a ser o substrato energético preferencial (Zinman et al., 1979).

O principal mecanismo responsável pela captação de glicose pelas células depende da ligação da insulina ao seu receptor, desencadeando uma cascata de reações intracelulares que culminam com a translocação de GLUT para a superfície celular. Os GLUT-4 são os principais responsáveis pela captação da glicose circulante na maioria dos tecidos em humanos (Saltiel e Kahn, 2001). É sabido que atividade física induz aumento da captação de glicose, mas que os mecanismos responsáveis por este benefício não dependem principalmente da via da PI3-kinase da sinalização insulínica, um fator muito importante para indivíduos com DM (Silva et al., 2014). Além disso, a prática regular de atividade física traz efeitos benéficos não apenas ao metabolismo da glicose, mas também lipídico, favorecendo a redução da glicemia e aumento das concentrações de HDL-c (Ferreira e Vivolo, 2014).

O controle da glicemia por exercício físico e dietas auxilia no tratamento do DM, além disso, o exercício é conhecido por promover

um controle a longo prazo da glicemia por induzir alterações na regulação do metabolismo da glicose, como a síntese de glicogênio (Silva et al., 2014). Durante o exercício, o consumo de oxigênio pelo organismo pode aumentar cerca de 20 vezes e aumentos ainda maiores podem ocorrer nos músculos em atividade (McArdle et al., 2013). Para satisfazer essas demandas energéticas, o músculo esquelético utiliza de uma forma muito intensa as suas próprias reservas de glicogênio e triglicerídeos, além dos ácidos graxos livres derivados da quebra dos triglicerídeos do tecido adiposo e da glicose liberada pelo fígado (*American College of Sports Medicine e American Diabetes Association*, 2000).

O exercício provoca mudanças profundas na homeostase da glicose. Para as pessoas com DM I, o exercício aeróbico geralmente faz com que a concentração de glicose no sangue caia rapidamente, sendo esse declínio atribuído principalmente à incapacidade dos níveis de insulina em circulação serem reduzidos no início do exercício contínuo, causando assim um aumento na absorção da glicose disponível (Iscoc e Riddell, 2011). Em contraste, os exercícios de moderada e alta intensidade (por exemplo, correndo em > 80% da capacidade aeróbica máxima por um curto período) muitas vezes provocam um aumento das concentrações de glicose no sangue nos indivíduos com DM I (Marliss e Vranic, 2002), pois sem o aumento concomitante da secreção insulina para neutralizar os efeitos hiperglicêmicos de exercício breve e intenso, o período de recuperação aumenta os níveis glicêmicos pela menor disponibilidade de insulina, tornando o controle glicêmico desafiador (Riddell e Perkins, 2009).

Neste sentido, modular a via de sinalização celular da insulina é um desafio e representa chances significativas de buscar novas formas de prevenção e tratamento do DM e doenças associadas (Ropelle et al., 2006; Davidson et al., 2007). Exercícios físicos, nutrientes e fármacos têm sido alvo de estudos e demonstraram grandes benefícios em aumentar a atividade da via molecular da insulina, diminuindo sua resistência. O exercício físico regular melhora a sensibilidade à insulina, aumenta a capacidade cardiorrespiratória, melhora o controle glicêmico, reduz o risco de mortalidade cardiovascular, e aumenta o bem estar psicossocial (Sigal et al., 2006).

Diversos são os benefícios atribuídos à atividade física regularmente praticada (Figura 2), é importante ressaltar que o condicionamento físico contribui para redução da pressão arterial,



melhora da função endotelial e do perfil lipídico (Landt et al., 1985; Fuchsjäger-Mayrl et al., 2002). Em crianças e adolescentes, é fundamental para o crescimento e desenvolvimento normais, o que torna importantíssimo o conhecimento das implicações do exercício no controle do DM I nesta faixa etária (Vivolo et al., 1996).

### PRINCIPAIS EFEITOS BENÉFICOS DA PRÁTICA REGULAR DE ATIVIDADE FÍSICA

- Auxilia na manutenção do peso corporal
- Aumenta a sensibilidade à insulina
- Reduz os níveis da pressão arterial e eleva os de HDL – Colesterol, atenuando o risco de DM e doença cardiovascular
- Contribui para o desenvolvimento e manutenção dos ossos, músculos e articulações, reduzindo a perda de massa óssea
- Favorece a resposta imune inflamatória
- Reduz a depressão e ansiedade e determina bem estar

**Figura 2** – Principais efeitos benéficos da prática regular da atividade física Adaptado de (Ferreira e Vivolo, 2014).

## 1.6 MODELO DE DM TIPO I

O estudo dos efeitos metabólicos do DM em roedores envolve uma série de modelos para mimetizar o que acontece com os pacientes de ambos os tipos da doença. A estreptozotocina (STZ) causa a destruição das células beta pancreáticas e é considerado um modelo de DM I quando se utiliza esta droga em altas doses intraperitonealmente. A STZ causa DM por alterar o DNA, aumentar o estresse oxidativo e diminuir os níveis de NAD causando toxicidade e morte celular. A STZ tem similaridade com glicose, tendo um 1-metil-1-nitrosourea (MNU)' ligado a glicose, que é transportado muito facilmente pelos

transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2) nas células beta pancreáticas. Este composto, uma vez dentro das células beta, metila o DNA, ativando a enzima reparadora Poli-ADP ribose que utiliza NAD para reparar o dano causado pela STZ no DNA e depleta os níveis intracelulares deste nucleotídeo, o que altera o metabolismo intracelular, e acarreta morte das células beta pancreáticas com consequente diminuição da produção de insulina. Além disso, causa um grande aumento de espécies reativas de oxigênio, uma vez que as células beta possuem pequena capacidade antioxidante (Anderson et al., 1974; Chen et al., 2001).

Apesar das evidências demonstrando os benefícios do exercício físico moderado sobre os resultados morfológicos e funcionais de diversas doenças, a evidência para os efeitos do exercício físico como fator protetor ao DM é limitado.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

- Avaliar os efeitos do exercício físico voluntário prévio à indução de DM I por meio do modelo da estreptozotocina sobre a glicemia, concentração de glicogênio e a função mitocondrial no fígado e quadríceps de camundongos.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Avaliar os níveis de glicose em jejum no sangue de camundongos controles e diabéticos que foram previamente exercitados;
- Avaliar os níveis de glicose no sangue e tolerância à glicose de camundongos controles e diabéticos que foram previamente exercitados;
- Avaliar os níveis de glicogênio hepático e muscular de camundongos controles e diabéticos que foram previamente exercitados;
- Avaliar o consumo de oxigênio no músculo e fígado de camundongos controles e diabéticos que foram previamente exercitados;
- Avaliar a produção de peróxido de hidrogênio no músculo e fígado de camundongos controles e diabéticos que foram previamente exercitados;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial no homogeneizado de músculo e fígado de camundongos controles e diabéticos que foram previamente exercitados.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado seguindo-se as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, bem como as recomendações para o uso de animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Brasil, sob Protocolo nº 094-2014-01.

Foram utilizados 32 (trinta e dois) camundongos machos jovens com 8 (oito) semanas de idade, pesando entre 30 e 35 g, da linhagem Swiss. Os animais, fornecidos pelo biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense, foram acondicionados em gaiolas (1 animal/caixa). Foram mantidos com iluminação e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00 às 19:00, ciclo claro) temperatura de  $20 \pm 2$  °C, sem privação de água e alimento. Para menor desconforto ambiental, a higiene da caixa moradia foi realizada diariamente.

#### 3.2 EXERCÍCIO VOLUNTÁRIO

Os animais foram divididos em sedentários e exercitados. Os animais do grupo exercitado foram alocados individualmente em uma gaiola contendo uma roda de exercício físico voluntário, durante todo o período do trabalho (exercício) enquanto que o controle permaneceu em uma gaiola em que a roda de correr permaneceu fixa impedindo a realização do exercício (sedentários) durante 30 dias. Após 30 dias de exercício voluntário, os animais correram em média 3500 metros/dia.

#### 3.3 INDUÇÃO DO DIABETES

Após 30 dias de treinamento voluntário, os animais do grupo diabetes receberam STZ intraperitoneal (i.p) na dose 180mg/kg para indução do diabetes. Após 3 dias de indução do diabetes por STZ, os animais ficaram 12 horas de jejum para verificar a glicemia de jejum e a tolerância a glicose (TTG) através da injeção de glicose na concentração de 2mg/g por via intraperitoneal, e posterior análise da glicemia nos tempos 30, 60, 120min após a injeção de glicose através um pequeno

corte na cauda dos animais feito por uma caneta/lanceta fornecida pela empresa que fornecera o glicosímetro para análise dos níveis de glicose. Após 2 dias do teste os animais foram sacrificados e o músculo quadríceps e fígado coletados, processados e armazenados para posterior análises.

Os animais foram distribuídos randomicamente em quatro grupos experimentais:

**Grupo 1** – Sedentário Veículo (Sed Veh) (n=8);

**Grupo 2** – Sedentário STZ (Sed STZ) (n=8);

**Grupo 3** – Exercício Veículo (Ex Veh) (n=8);

**Grupo 4** – Exercício STZ (Ex STZ) (n=8).

#### 3.4 DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

O quadríceps e o fígado dos camundongos foram dissecados e a determinação da concentração de glicogênio hepático e muscular foi feita pelo método de (Krisman, 1962). O músculo e o fígado, em torno de 100mg, foram colocados em KOH 30% e incubado 100 °C por 15 min. Após foi adicionado etanol 100% e incubados por 15min a 70 °C. Os tubos de ensaio foram colocados no gelo por 20min e depois centrifugados por 10min. O pellete foi resuspenso em água e o glicogênio avaliado por método colorimétrico (Krisman, 1962).

#### 3.5 PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O músculo quadríceps e o fígado foram dissecados e homogeneizados em tampão de isolamento (0,32 M sacarose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado 4.000 rpm (3min). O sobrenadante foi incubado em tampão de respiração (10 mM Tris HCl, pH 7,4, 0,32 M mannitol, 8 mM fosfato de sódio, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,08 mM EDTA e 0,2 mg/mL de albumina bovina livre de ácidos graxos) com adição 10 mM AmplexRed para determinação específica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por fluorescência e HRP 2U/ml analisados em leitor demicroplaca Spectra Max M5) (Molecular Devices) em comprimento de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão. Foram adicionados Succinato 1mM Me ADP 2 mM para

avaliar a produção de  $H_2O_2$  em respostas a substratos energéticos (Muller et al., 2013).

### 3.6 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ( $\Delta\Psi_m$ )

O músculo quadríceps e o fígado foram dissecados e homogeneizados em tampão de isolamento (0,32 M sacarose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado 4.000 rpm (3min). O Sobrenadante foi incubado em tampão de respiração (10 mM Tris HCl, pH 7,4, 0,32 M manitol, 8 mM fosfato de sódio, 4 mM  $MgCl_2$ , 0.08 mM EDTA e 0.2 mg/mL de albumina bovina livre de ácidos graxos) com adição 3 mM as sonda catiônica Safranina O para determinação do potencial de membrana mitocondrial por fluorescência (comprimento de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão, leitor de microplaca Spectra Max M5) (Molecular Devices). Foram adicionados Succinato 1mM e ADP 2 mM para avaliar a produção de  $H_2O_2$  em respostas a substratos energéticos (Muller et al., 2013).

### 3.7 CONSUMO DE OXIGÊNIO ( $O_2$ )

Os tecidos foram homogeneizados em tampão de isolamento. Para medição do consumo de  $O_2$  foram realizadas em 2 ml de tampão de respiração mitocondrial (KCl 100 mM, manitol a 75 mM, sacarose 25 mM, 5 mM de fosfato, EDTA a 0,05 mM e 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4) . As taxas de consumo de  $O_2$  foram medidas usando polarograficamente de alta resolução respirometria (Oroboros Oxygraph-O2K). As frações de fígado e músculo (0,1 mg / ml) foram incubadas tampão de respiração e o fluxo de consumo de oxigênio foi monitorado sem substrato e com o succinato 1 mM e 2 mM de ADP adicionado como substrato à respiração mitocondrial (Sims e Blass, 1986).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey post hoc. Para analisar a resposta de mitocôndrias de

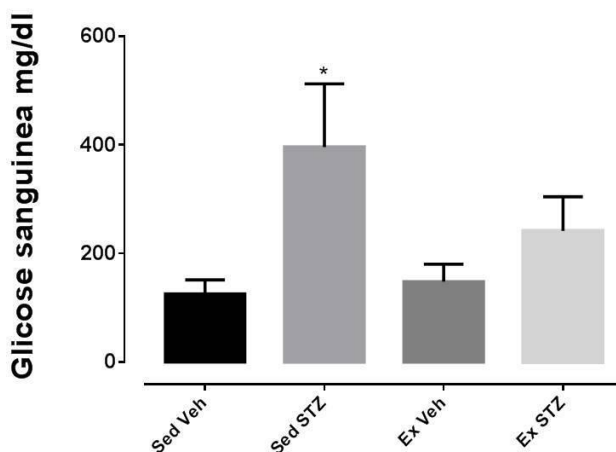
diferentes substratos os dados foram analisados pelo teste t de Student. As diferenças entre os grupos foram considerados estatisticamente significativos se  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

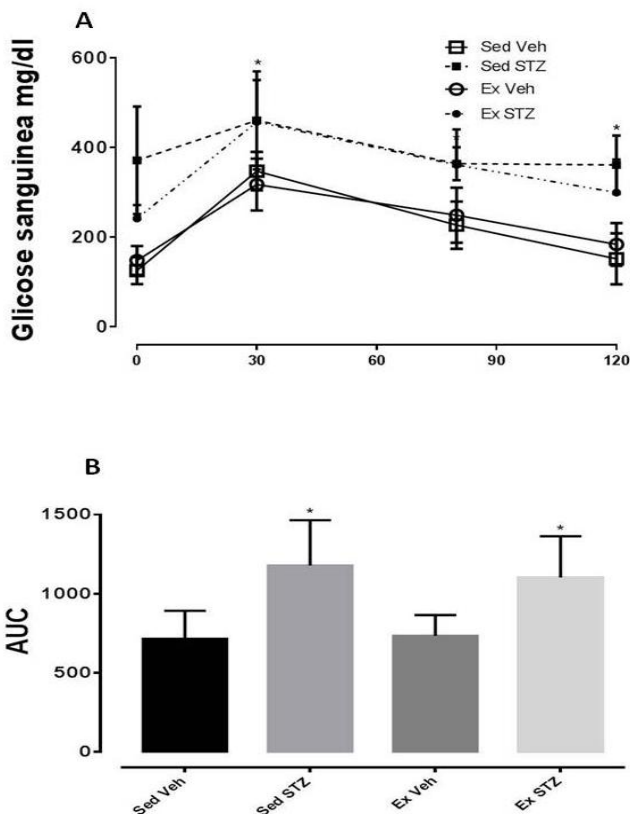
### 4.1 EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO PREVINE A HIPERGLICEMIA EM JEJUM

Foi investigado o efeito do exercício voluntário prévio sobre o perfil glicêmico em ratos submetidos ao modelo de DM I. O grupo Sed STZ apresentou hiperglicemia de jejum, mostrando que o modelo utilizando STZ comprometeu a produção de insulina nestes animais. Porém, no grupo de animais submetidos à STZ e que fizeram exercício voluntário, houve uma prevenção do aumento da glicemia de jejum (Figura 3 \* Sed STZ>Sed Veh, ExVeh e Ex STZ,  $p < 0,05$ ).



**Figura 3** - Efeito da glicemia de jejum nos grupos: Sedentário Veículo (Sed Veh); Sedentário Estreptozotocina (Sed STZ); Exercício Veículo (Ex Veh); Exercício Estreptozotocina (Ex STZ). Dados expressos com média  $\pm$  e desvio padrão para 8 animais por grupo.

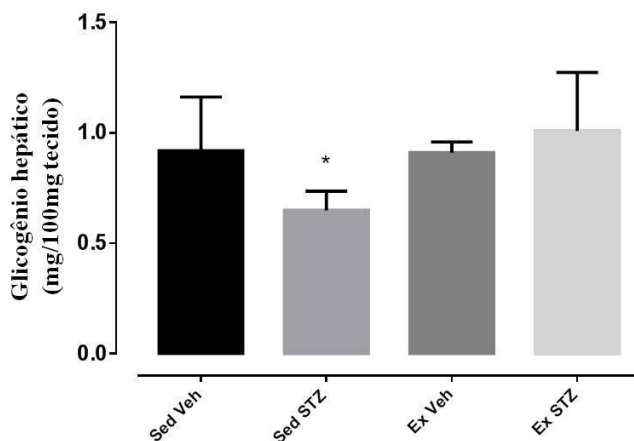
Na sequência, no teste de tolerância à glicose, observou-se que os níveis de glicose no sangue foram aumentados em 30, 60 e 120 min após a injeção glicose ip em todos os grupos, sendo os valores maiores nos grupos STZ, tanto sedentários quanto exercitados, quando comparado com os grupos de veículo (Figura 4 A \* Sed STZ e Ex STZ >ExVeh e SedVeh,  $p < 0,05$ ). A área sob a curva (AUC) foi maior em animais diabéticos de ambos os grupos, (Figura 4 B \* Sed STZ e Ex STZ >ExVeh e SedVeh,  $p < 0,05$ ).



**Figura 4- Efeitos sobre o perfil glicêmico nos testes de (A) Tolerância à Glicose (TTG); (B) Área sob a curva do TTG. Nos grupos: Sedentário Veículo (Sed Veh); Sedentário Estreptozotocina (Sed STZ); Exercício Veículo (Ex Veh); Exercício Estreptozotocina (Ex STZ). Dados expressos com média  $\pm$  e desvio padrão para 8 animais por grupo.**

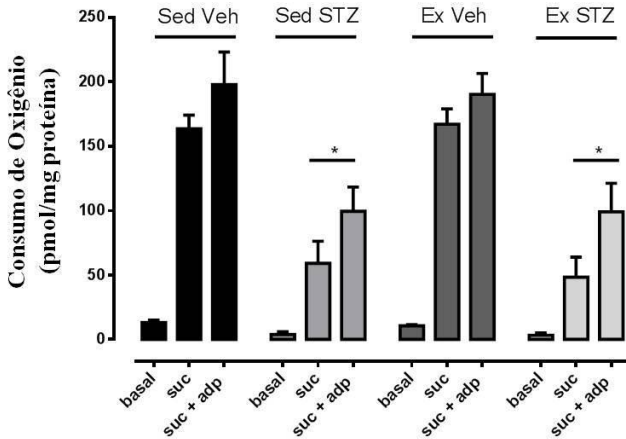
## 4.2 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO E DO DIABETES SOBRE PARÂMETROS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS

Quando se investigou a concentração de glicogênio hepático, houve diminuição deste em animais diabéticos sedentários, e o exercício voluntário prévio preveniu este efeito (Figura 5 \* Sed STZ <Ex STZ, ExVeh e SedVeh,  $p < 0,05$ ).



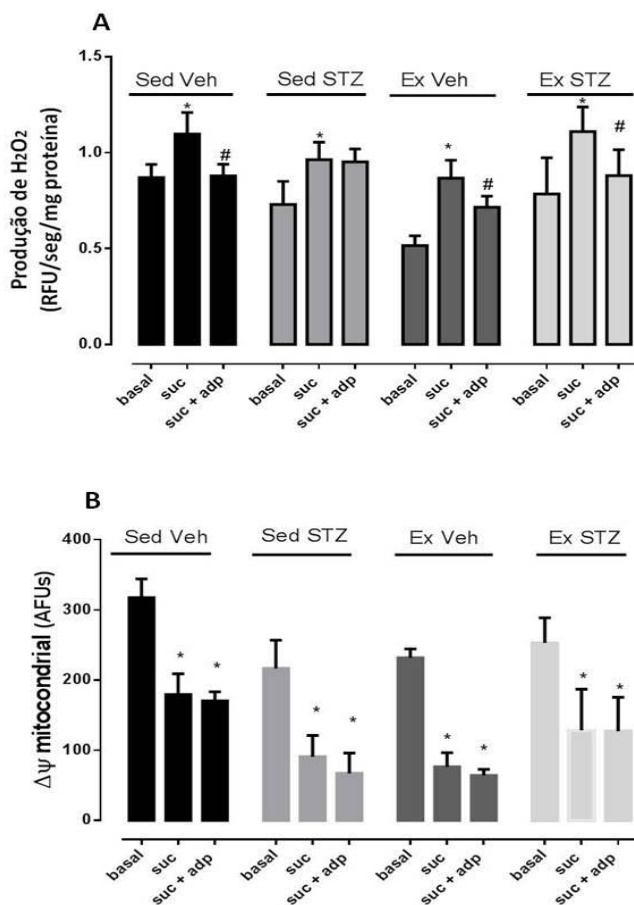
**Figura 5** – Concentração de glicogênio hepático nos grupos: Sedentário Veículo (Sed Veh); Sedentário Estreptozotocina (Sed STZ); Exercício Veículo (Ex Veh); Exercício Estreptozotocina (Ex STZ). Dados expressos com média  $\pm$  e desvio padrão para 8 animais por grupo.

Analisou-se também o consumo de  $O_2$ , este foi diminuído no fígado em ambos os grupos STZ quando comparado com os grupos veículo; no entanto, houve um aumento no consumo de  $O_2$  pela adição de succinato e succinato + ADP (Figura 6 \* Ex STZ e Sed STZ <ExVeh e SedVeh,  $p < 0,05$ ).



**Figura 6** – Consumo de  $O_2$  no tecido hepático na condição basal (basal), adição de succinato (suc) e adição succinato + ADP (suc + adp). Nos grupos: Sedentário Veículo (Sed Veh); Sedentário Estreptozotocina (Sed STZ); Exercício Veículo (Ex Veh); Exercício Estreptozotocina (Ex STZ). Dados expressos com média  $\pm$  e desvio padrão para 8 animais por grupo.

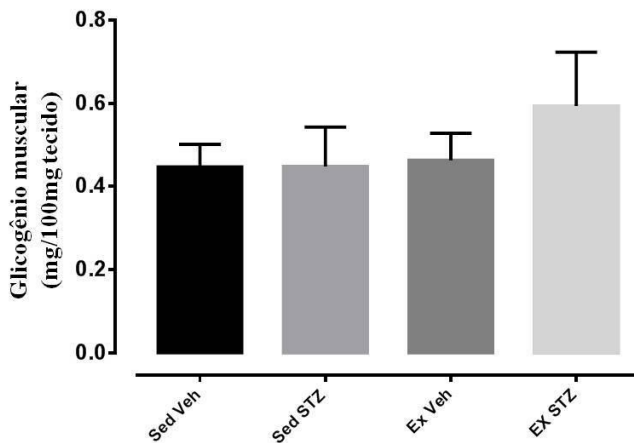
Na sequência, analisamos a produção de  $H_2O_2$ , onde na condição basal não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 7 A). A produção de  $H_2O_2$  foi aumentada por succinato em todos os grupos, no entanto, a adição de ADP não diminuiu a produção de  $H_2O_2$  no fígado do grupo Sed STZ, diferente do que aconteceu com outros grupos (Figura 7 A \* suc > basal; # SUC + ADP < SUC,  $p < 0,05$ ). O  $\Delta\Psi_m$  foi induzido por succinato e succinato + ADP como esperado no fígado em todos os grupos (Figura 7 B, \* basal > suc e suc + ADP,  $p < 0,05$ ).



**Figura 7** - Efeitos do exercício físico voluntário prévio e do Diabetes sobre os parâmetros hepáticos de camundongos avaliando: (A) Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no fígado na condição basal (basal), succinato (suc) e succinato + ADP (suc + adp); (B) Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ m) no fígado nas condições basal (basal), succinato(suc) e succinato + ADP(suc + adp). Nos grupos: Sedentário Veículo (Sed Veh); Sedentário Estreptozotocina (Sed STZ); Exercício Veículo (Ex Veh); Exercício Estreptozotocina (Ex STZ). Dados expressos com média  $\pm$  e desvio padrão para 8 animais por grupo.

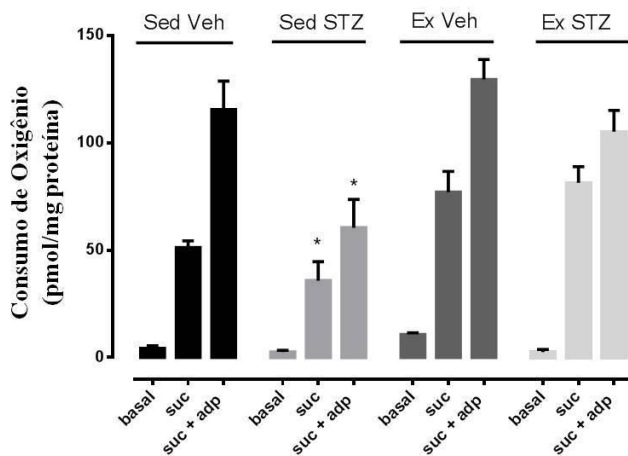
### 4.3 STZ MODULADA EM FUNÇÃO MITOCONDRIAL DO MÚSCULO

Ao investigar o efeito do diabetes e do exercício voluntário prévio sobre o conteúdo de glicogênio muscular, este não foi afetado no músculo quadríceps (Figura 8).



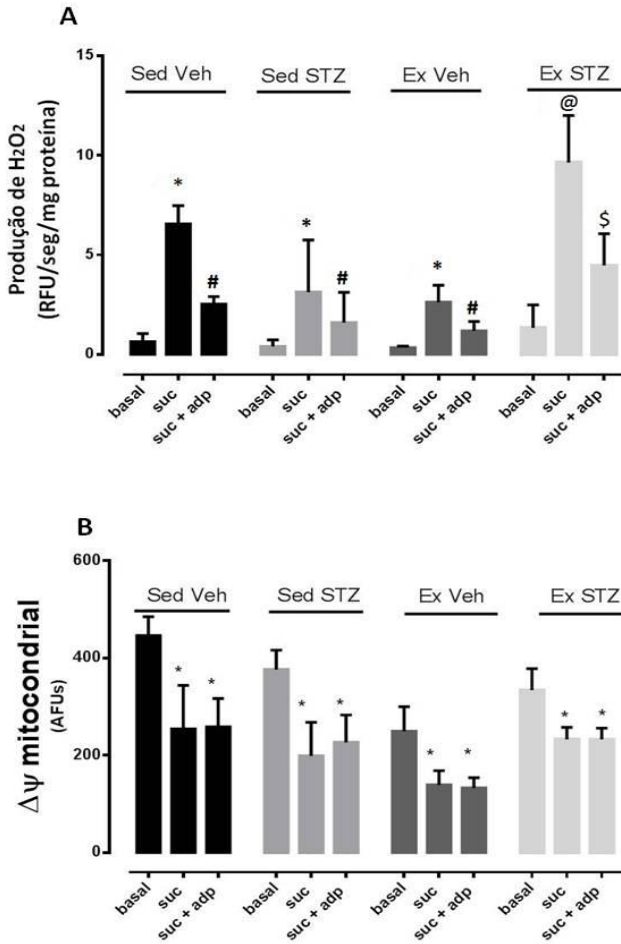
**Figura 8** - Concentração de Glicogênio Muscular nos grupos: Sedentário Veículo (Sed Veh); Sedentário Estreptozotocina (Sed STZ); Exercício Veículo (Ex Veh); Exercício Estreptozotocina (Ex STZ). Dados expressos com média  $\pm$  e desvio padrão para 8 animais por grupo.

Analisou-se também o consumo de  $O_2$ , este quando induzido por ADP e succinato foi diminuído nos animais diabéticos sedentários quando comparado com os outros grupos e o exercício voluntário prévio preveniu esse efeito (Figura 9 \* Sed STZ < Sed Veh, Ex Veh e Ex STZ,  $p < 0,05$ ).



**Figura 9** - Consumo de  $O_2$  no tecido muscular na condição basal (basal), adição de succinato (suc) e adição succinato + ADP (suc + adp). Nos grupos: Sedentário Veículo (Sed Veh); Sedentário Estreptozotocina (Sed STZ); Exercício Veículo (Ex Veh); Exercício Estreptozotocina (Ex STZ). Dados expressos com média  $\pm$  e desvio padrão para 8 animais por grupo.

O próximo passo do estudo foi avaliar a produção de  $H_2O_2$ , esta quando induzida por succinato foi aumentada no quadríceps de todos os grupos em comparação com os níveis basais e a adição de ADP diminuiu a produção de  $H_2O_2$  (Figura 10 A \* suc > basal; # SUC + ADP < SUC,  $p < 0,05$ ). A produção de  $H_2O_2$  no grupo Ex STZ foi aumentada quando comparado aos outros grupos (Figura 10 A @ \$ Ex STZ > Sed Veh, Sed STZ e Ex Veh,  $p < 0,05$ ). O  $\Delta\Psi_m$  foi induzido por succinato e succinato + ADP em todos os grupos (Figura 10 B, \* basal > suc e suc + ADP,  $p < 0,05$ ).



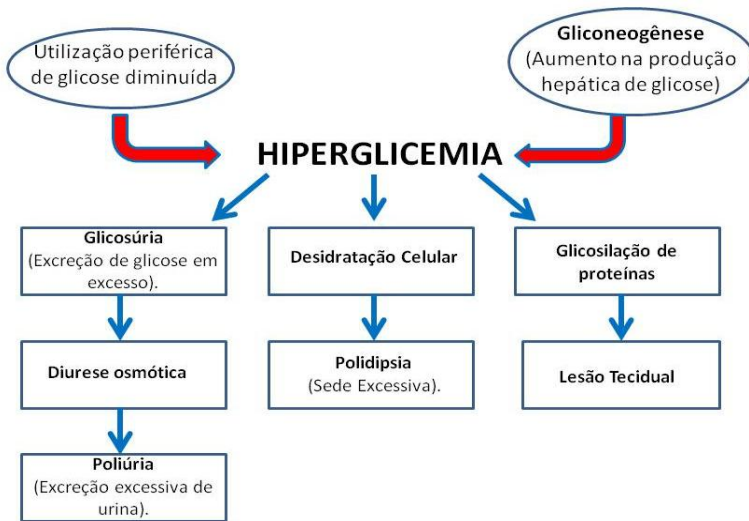
**Figura 10** – Efeitos do exercício físico voluntário prévio e do Diabetes sobre os parâmetros musculares (Quadríceps) de camundongos avaliando: (A) Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na condição basal (basal), succinato (suc) e succinato + ADP (suc + adp); (B) Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) nas condições basal (basal), succinato (suc) e succinato + ADP (suc + adp). Nos grupos: Sedentário Veículo (Sed Veh); Sedentário Estreptozotocina (Sed STZ); Exercício Veículo (Ex Veh); Exercício Estreptozotocina (Ex STZ). Dados expressos com média  $\pm$  e desvio padrão para 8 animais por grupo.



## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo mostramos que camundongos submetidos a trinta dias de exercício voluntário prévio à indução de DM I por injeção de STZ intraperitoneal apresentaram diminuição da glicemia em jejum quando comparados com grupo Sed STZ, sugerindo que o exercício foi capaz de melhorar a metabolização da glicose na ausência e/ou redução da produção de insulina. Além disso, o exercício prévio impediu a diminuição do glicogênio hepático o qual teve sua concentração diminuída no grupo Sed STZ; ainda, houve aumento na função mitocondrial no músculo quadríceps dos animais EX STZ quando comparados ao grupo Sed STZ. Estes resultados apontam uma integração metabólica que foi programada durante os dias de exercício prévio ao DM que pode ter auxiliado na regulação da glicemia dos animais.

Estes achados tornam-se importantes devido aos conhecidos efeitos deletérios da hiperglicemia (Figura 11). É conhecido que a hiperglicemia crônica está associada a lesões da microcirculação, prejudicando o funcionamento de vários órgãos como os rins, os olhos, os nervos e o coração (Alberti e Zimmet, 1998). Estudos, têm se demonstrado que os indivíduos que conseguem manter um bom controle da glicemia têm uma importante redução no risco de desenvolver tais complicações (Ropelle et al., 2006; Davidson et al., 2007). Portanto, nosso trabalho mostra um efeito protetor do exercício voluntário que pode auxiliar no controle de um dos principais sintomas e causas de intercorrências, a hiperglicemia.



**Figura 11** –Esquema da gliconeogênese e de uma utilização periférica de glicose diminuída ocasionando hiperglicemia crônica podendo levar a sintomas como: Poliúria, Polidipsia e estando associada com lesões de tecidos. Elaborado pelo autor (2016).

O exercício físico regular tem sido proposto como umas das principais intervenções ambientais para melhorar a qualidade de vida das pessoas e para o tratamento da obesidade e do DM (Chakravarthy and Booth 2004), uma vez que, além de aumentar o gasto energético, também atua como protetor contra doenças associadas com a obesidade e aumenta a sensibilidade à insulina (Molteni et al. 2004). A atividade física, principalmente de longa duração aumenta a sensibilidade à insulina; e o estilo de vida sedentário é responsável por, pelo menos, 25% da incidência de diabetes tipo II (Straczowski, 2001). Entretanto, as informações sobre o efeito do exercício prévio sobre o DM I são mais escassas. Eliminar o sedentarismo torna-se importante, pois nos últimos anos, tem se mostrado como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares, dislipidemia, diabetes, hipertensão e obesidade (Xiang et al., 2007; Riddell e Perkins, 2009). O sedentarismo é um dos principais inimigos da saúde pública no mundo, pela sua alta

prevalência, neste sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014) aponta o sedentarismo como a quarta causa de morte dentre as 19 principais.

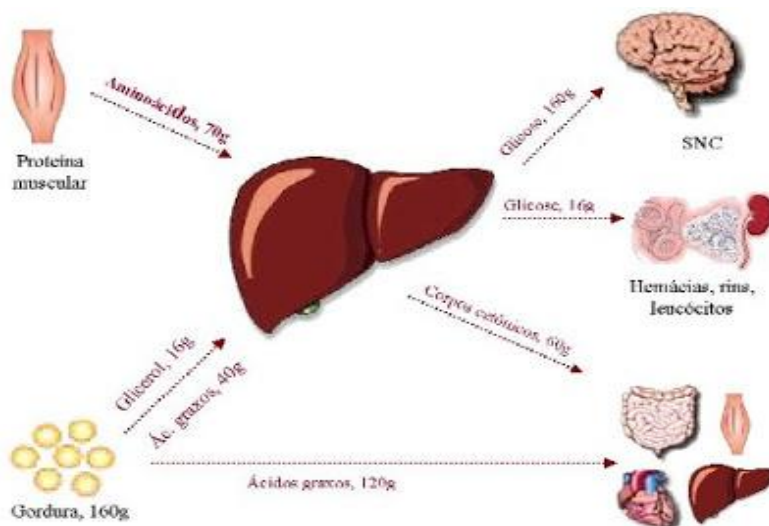
A insulina tem uma função chave na regulação da produção de glicose pelo fígado, de forma que, quando as concentrações de insulina estão baixas, a produção de glicose hepática aumenta (Port et al., 2003). Nossos achados mostraram que o exercício prévio pode ser um fator auxiliar no controle da hiperglicemia de jejum, por atuar em diferentes mecanismos intracelulares, sabe-se que a insulina é um potente hormônio anabólico polipeptídico composto por duas cadeias de aminoácidos que, é secretada no sangue pelas células beta nas ilhotas de Langerhans do pâncreas em resposta ao aumento da concentração de glicose, ácidos graxos e aminoácidos na corrente sanguínea após as refeições (Patti e Kahn, 1998; Aguirre et al., 2000; De Souza et al., 2010). Sua principal função é regular o metabolismo da glicose por meio da sinalização celular. A insulina aumenta a velocidade de transporte da glicose para dentro das células musculares e do tecido adiposo, se ela não for imediatamente oxidada para produção de energia, ocorre a produção de glicogênio e triglicerídeos nos tecidos, respectivamente. O efeito da insulina é hipoglicemiante, visto que reduz a glicemia sanguínea. No entanto, quando existe deficiência no organismo em produzir adequados níveis de insulina, ocorre o DM I, afetando diversos tecidos, principalmente fígado e músculo esquelético (Carvalho et al., 2002). E o exercício físico prévio pode ter modulado as enzimas que regulam o metabolismo de glicose para utilizá-la independente da ação de insulina.

Outro efeito importante da insulina é fazer com que a maior parte da glicose absorvida após uma refeição seja armazenada quase que imediatamente no fígado na forma de glicogênio. O mecanismo pelo qual a insulina provoca o armazenamento da glicose no fígado envolve diversos processos. O Glut-2 é uma proteína transportadora, esta presente nos hepatócitos, células  $\beta$  pancreáticas, mucosa intestinal e rins. O alto  $K_m$  e a baixa afinidade deste transportador com a glicose promove que o transporte a estas células seja proporcional à glicemia, principalmente quando ocorre a hiperglicemia pós-prandial (Ubiratan, 1998). A glicoquinase hepática entra em atividade quando os níveis de glicose no sangue são altos; ela fosforila a glicose transformando-a em glicose 6-fosfato (Haber et al., 2001), o que estimula a síntese de

glicogênio, que é caracterizado pela ativação da enzima glicogênio sintetase e inibição da enzima glicogênio fosforilase, a qual converte o excesso de glicose 6-fosfato livre em uma cadeia de glicose denominada glicogênio (Carvalho et al., 2002). Essa síntese de glicogênio pode chegar até 10% do peso total do fígado. O glicogênio hepático serve como reservatório de glicose para os tecidos; quando a glicose da alimentação não está disponível, o fígado produz glicose 6-fosfato pela quebra do glicogênio e pela gliconeogênese, regulando a glicemia (Nelson e Cox, 2014).

Em nosso trabalho o conteúdo de glicogênio no fígado dos animais sedentários foi reduzido pela STZ, confirmando a condição de ausência ou má produção da insulina pelo não armazenamento do glicogênio e pelo aumento da glicogenólise. No entanto, os animais diabéticos e que realizaram exercício voluntário prévio não apresentaram esta redução, sugerindo que o exercício melhora o controle glicêmico pela preservação do glicogênio hepático. Este efeito provavelmente se deve ao fato de maior sensibilidade da insulina existente ou de vias induzidas pelo exercício independentes da insulina.

O fígado é um dos principais órgãos do corpo e desempenha um papel central na regulação do metabolismo dos carboidratos e estoques de lipídios, garantindo um fornecimento adequado de precursores metabólicos, tanto para a atividade física vigorosa, como para síntese muscular e tecido cerebral (Wasserman e Cherrington 1991; Kjaer 1998; Wahren e Ekberg 2007; Fritsche et al 2008). (Figura 12). Portanto, no nosso trabalho, o excesso de glicose nos animais EX STZ foi utilizado para a manutenção do armazenamento de glicogênio ou formação de lipídios no fígado, o que não foi avaliado no nosso trabalho e merece atenção para novos estudos, considerando que a célula hepática não sofreu alteração do consumo de  $O_2$  pelo exercício físico no grupo EX STZ que foi diminuído pela indução de DM I.



**Figura 12** - Mecanismo de regulação da glicemia pelo fígado em estado de jejum e durante exercício. A primeira fonte de energia a ser usada são os carboidratos e, para tanto, reservas de glicogênio no fígado são degradadas fornecendo glicose, um processo chamado glicogenólise. A glicose resultante é liberada no sangue e abastece principalmente o cérebro, além dos demais tecidos que requerem esse substrato. Após 10 a 18 horas de jejum o glicogênio do fígado encontra-se quase esgotado. No entanto, 4 a 6 horas depois da última refeição começa um processo de formação de glicogênio a partir de substratos que não são glicose, como aminoácidos e glicerol (utilizado na síntese de triacilgliceróis do tecido adiposo). Tal processo é denominado gliconeogênese e ajuda a manter os níveis de glicose no jejum prolongado. Adaptado de Champe e Harvey (1996).

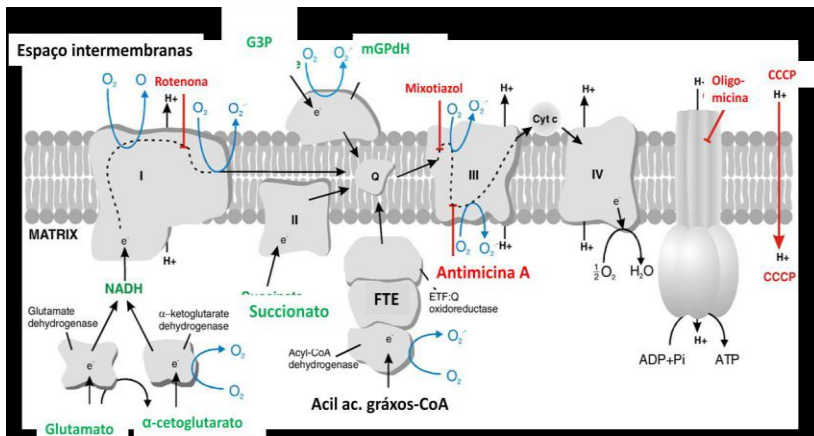
Os níveis de glicose sanguínea são resultantes da disponibilidade e utilização da glicose pelas células. No tecido muscular, a glicose é armazenada intracelularmente na forma glicogênio muscular pela ativação da via da glicogênese. Este glicogênio pode ser degradado e produzir glicose para gerar energia na via glicolítica em situações de demanda energética, como no exercício físico ou jejum. No tecido hepático, a glicose é armazenada via glicogênese na forma de glicogênio hepático e, na ausência de alimentação, o fígado regula a glicemia pela gliconeogênese e glicogenólise. A glicemia controlada pelo fígado é influenciada basicamente por 2 hormônios presentes em diferentes

estados metabólicos (alimentado e jejum). No estado alimentado, a insulina age aumentando a utilização da glicose pelos tecidos e seu armazenamento na forma de glicogênio muscular e hepático e também triglicerídeos no tecido adiposo (Carvalho et al., 2002). Na condição de jejum, o glucagon, que é um hormônio produzido pelas células alfa do pâncreas e liberado pelo estímulo da hipoglicemia, estimula a produção de glicose por meio da glicogenólise e gliconeogênese. Na ausência de insulina (como ocorre no DM tipo I) ou sua resistência (como ocorre no DM tipo II), ocorre degradação do glicogênio hepático, e a glicose é liberada na corrente sanguínea, contribuindo para a hiperglicemia observada nos pacientes com estas patologias (Drucker e Nauck, 2006). A partir da escassez do glicogênio hepático, ocorre a gliconeogênese, com a utilização de glicerol e aminoácidos (Smith et al., 2007). No presente trabalho, a inibição da produção de insulina por STZ provocou hiperglicemia e diminuiu glicogênio hepático; o exercício voluntário prévio preveniu este efeito, diminuindo os níveis de glicose e mantendo o glicogênio do fígado. Estes dados mostram um processo de adaptação hepática causado pelo exercício que é capaz de regular mais eficazmente a glicemia, independente da ação da insulina.

O Colégio Americano de Medicina do Esporte (1995) recomenda a prática regular de atividade física moderada à intensa com uma duração mínima de trinta minutos por dia, cinco vezes por semana, ou de exercício intenso por vinte minutos, três vezes por semana para adultos saudáveis como forma de prevenir os efeitos deletérios do sedentarismo (Haskell et al., 2007). A atividade física é prescrita como uma ferramenta terapêutica no controle e tratamento do diabetes e outras doenças metabólicas (Yu et al., 2007). O metabolismo muscular necessita de energia para realizar sua função fisiológica; essa energia é proveniente de 3 sistemas: o sistema ATP-CP; o metabolismo glicolítico; e o metabolismo oxidativo (McArdle et al., 2013). A mitocôndria é a organela central do metabolismo energético oxidativo. Sabe-se, também, que a respiração celular é controlada por diversos fatores que dependem de uma série de características, como as condições presentes na célula (taxa de utilização de ATP, hormônios) e o órgão examinado. As etapas finais da oxidação de lipídios e carboidratos são realizadas nas mitocôndrias, onde a energia armazenada durante a oxidação de NADH e FADH<sub>2</sub> é transformada em energia química (ATP) pelo processo denominado de fosforilação oxidativa (Devlin, 2011).

O sistema oxidativo é a via geradora de ATP mais complexa, duradoura e eficiente. Esse processo pode utilizar diferentes substratos energéticos. Entretanto, por ser dependente de oxigênio, é um processo relativamente lento. A mitocôndria é a principal organela envolvida nesse processo. Essas organelas estão dispersas no citoplasma ou próximas às miofibrilas (McArdle et al., 2013). As mitocôndrias são mais abundantes e ativas em alguns tipos celulares com atividades metabólicas e de função intensas, como células cardíacas, epiteliais, hepáticas e esqueléticas aeróbias, como é o caso do músculo quadríceps, o qual possui predominantemente fibras do tipo 1 com maior capacidade oxidativa (Pithon-Curi, 2013).

A teoria quimiosmótica (Mitchell, 1961) propõe que através da passagem dos elétrons pelos complexos I, III e IV ocorre o bombeamento dos prótons da matriz mitocondrial gerando um gradiente eletroquímico de prótons. Para cada dois elétrons transferidos para o  $O_2$ , quatro prótons são bombeados pelo complexo I, quatro prótons são bombeados pelo complexo III e dois pelo complexo IV. A diferença gerada pela concentração de prótons e separação de cargas produz uma energia eletroquímica, pela diferença de concentração ( $H^+$ ) nas 2 regiões separadas pela membrana gerando um gradiente de pH ( $\Delta pH$ ) e energia elétrica, que resulta da separação de cargas quando um próton se move através da membrana sem um contra-íon gerando um gradiente elétrico ou potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) (Nelson e Cox, 2014). O gradiente eletroquímico de prótons é transformado e armazenado em energia química, em forma de ATP. Este gradiente proporciona a força próton motriz para o complexo V ou da FoF1-ATP sintase, que realiza a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Figura 13).



**Figura 13. Sítios de produção de radical superóxido na Cadeia de Transporte de Elétons.** O superóxido pode ser gerado por redução monovalente do oxigênio em diversos sítios: pelas enzimas com a atividade desidrogenase, pela lançadeira glicerol 3-fosfato mitocondrial e flavoproteína transferidora de elétrons (FTE) e principalmente pelos complexos mitocondriais I e III. Em verde, são os substratos energéticos dos complexos. Em vermelho, são os inibidores dos complexos mitocondriais (Tahara et al., 2009).

Durante esse processo, pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). A mitocôndria é uma das maiores fontes geradoras de ERO, cerca de 2 a 5% do oxigênio consumido, que, em condições fisiológicas, é reduzido radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Halliwell e Gutteridge, 2007). O  $O_2^{\bullet-}$  formado é rapidamente decomposto, devido a sua instabilidade e sua reatividade, ou dismutado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), devido a atividade das enzimas antioxidantes Cobre-Zinco-Superoxido Dismutase (CuZnSOD), (Weisiger e Fridovich, 1973; Halliwell e Gutteridge, 2007). A produção de  $O_2^{\bullet-}$  dependerá da funcionalidade da mitocôndria. Na presença de substratos (succinato ou glicerolfosfato) para os complexos mitocondriais, há um aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$ ; com um ativador da respiração mitocondrial (ADP), o fluxo de elétrons aumenta ao longo da cadeia e diminui a geração  $O_2^{\bullet-}$ . A medição de  $O_2$  é muito difícil de ser quantificada e determinada, devido aos métodos de quantificação que sofrem muitas interferências. Um dos métodos de aferição mais aceitos é a produção de  $H_2O_2$  por espectrofluorimetria utilizando o reagente amplex red (Miranda et al., 2001), metodologia utilizada no presente



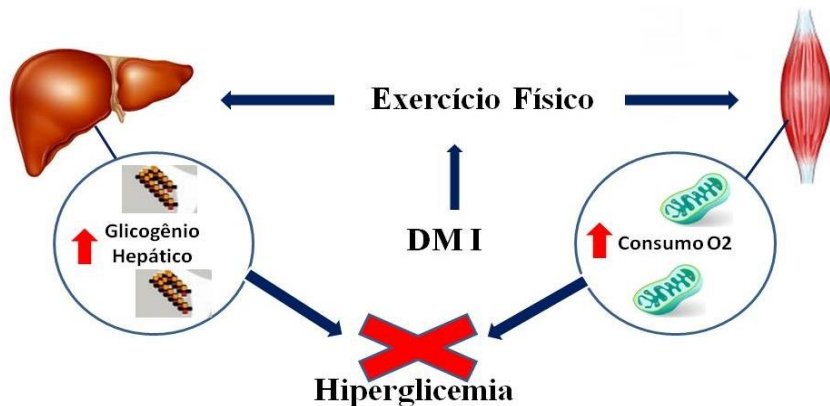
estudo. No nosso trabalho, o consumo de  $O_2$  hepático foi diminuído nos animais que receberam STZ, independente do exercício voluntário prévio, mostrando que a falta de insulina ou a hiperglicemia diminuíram o consumo de  $O_2$  pelas mitocôndrias do hepatócito.

A produção de  $H_2O_2$  e a indução do  $\Delta\Psi$  mitocondrial são parâmetros que avaliam a funcionalidade da mitocôndria, avaliando a cadeia de transporte de elétrons bem como o acoplamento com a fosforilação oxidativa responsável pela geração de ATP (Tocchetti et al., 2015). Nossos resultados demonstraram que, no fígado, a indução da produção de  $H_2O_2$  com succinato foi igual em todos os grupos, mostrando que a cadeia de transporte de elétrons estava funcionando de maneira semelhante, independente da indução do DM I ou do exercício voluntário prévio, nos hepatócitos. Entretanto, quando se adicionou ADP, que acopla a cadeia de transporte de elétrons com a produção de ATP e, conseqüentemente, diminui a produção de  $H_2O_2$ , não se observou essa diminuição nos animais Sed STZ, apontando para uma possível diminuição do acoplamento da cadeia de transporte de elétrons com a produção de ATP. A formação do  $\Delta\Psi$  mitocondrial pelo succinato não foi afetada pelos tratamentos, mostrando que as membranas mitocondriais estavam intactas, e que os resultados obtidos estão associados com a cadeia de transporte de elétrons e consumo de  $O_2$  no fígado.

A produção mitocondrial de ATP é importante para o metabolismo oxidativo envolvidos na produção de energia nos músculos esqueléticos, principalmente de fibras do tipo I, o predominante no músculo quadríceps. A disfunção mitocondrial e comprometimento da capacidade oxidativa do músculo esquelético são alguns dos mecanismos deletérios do DM (Jheng et al., 2012). Estudos demonstraram que o consumo de  $O_2$  pelo músculo esquelético fica prejudicado pelo diabetes (Tsalikian et al., 2005; Giannini et al., 2006; Miculis et al., 2010). O consumo de  $O_2$  estimulado por succinato e ADP foi diminuído no grupo Sed STZ quando comparado com outros grupos. Da mesma forma, DM I diminuiu a função mitocondrial dos cardiomiócitos com menores taxas de fosforilação de ADP e maior produção de  $H_2O_2$  (Tocchetti et al., 2015). O consumo de  $O_2$  aumenta durante a realização de exercício físico, na sua maior parte em decorrência do aumento do trabalho muscular e da necessidade de produzir ATP, a mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons, a principal fonte geradora de radicais livres (Green et al.,

2004). Em nosso trabalho, a avaliação do consumo de  $O_2$  mostrou uma diminuição nos camundongos Sed STZ, apesar de ser responsivo ao succinato. Nossos resultados também mostraram que o consumo de  $O_2$  do músculo quadríceps de camundongos EX STZ aumentaram quando estimulados com succinato e ADP quando comparados com Sed STZ, mostrando uma maior atividade das mitocôndrias musculares dos animais exercitados, o que pode ter contribuído para melhor regulação da glicemia de jejum. A produção de  $H_2O_2$  pelas mitocôndrias do músculo esquelético foi aumentada com a adição de succinato em todos os grupos. Entretanto, no grupo Ex STZ, esse efeito foi mais proeminente, mostrando uma adaptação deste tecido em aumentar a atividade metabólica. Sabe-se que o exercício aumenta a produção de  $H_2O_2$  induzida por succinato no músculo (Tocchetti et al., 2015), o que também pode estar associado a melhor regulação da glicemia nestes animais, uma vez que pode ocorrer uma maior metabolização de nutrientes pelas mitocôndrias de animais exercitados, inclusive glicose. Todos os grupos responderam de maneira igual à adição de ADP, diminuindo a produção de  $H_2O_2$  bem com em relação ao  $\Delta\Psi_m$  que induzido por succinato e succinato + ADP não foi afetado pelos tratamentos, mostrando a integridade das membranas das mitocôndrias. No entanto, não se pode descartar efeitos deletérios a longo prazo sobre mitocôndrias uma vez que a análise foi realizada apenas cinco dias após a indução do DM.

Como esquematizado na (Figura 14), nossos resultados mostraram que os trinta dias de exercício voluntário prévio em camundongos, previne a hiperglicemia de jejum induzida pela administração de STZ pela manutenção do glicogênio hepático e pelo aumento do metabolismo mitocondrial no músculo esquelético. Deste modo, melhora a capacidade do corpo responder ao DM I.



**Figura 14. Mecanismo dos efeitos do exercício físico prévio sobre o tecido muscular e hepático evitando a hiperglicemia de jejum.** O exercício físico prévio foi capaz de prevenir a hiperglicemia de jejum num modelo de diabetes tipo I (DM I) induzido por Estreptozotocina pela manutenção do glicogênio hepático e aumento da atividade mitocondrial no tecido muscular. Elaborado pelo autor (2016).



## 6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que camundongos submetidos a trinta dias de exercício voluntário prévio à indução de DM I por injeção de STZ intraperitoneal apresentaram diminuição da glicemia em jejum quando comparados com grupo Sedentário STZ, indicando que o exercício foi capaz de aperfeiçoar a metabolização da glicose na ausência e/ou redução da produção de insulina. A manutenção do glicogênio hepático o qual teve sua concentração diminuída no grupo Sedentário STZ foi um processo que auxiliou na regulação glicêmica; e ainda, houve aumento na função mitocondrial no músculo quadríceps dos animais Exercício STZ quando comparados ao grupo Sedentário STZ. Os resultados apontam uma integração metabólica que foi programada durante os dias de exercício prévio ao DM que pode ter auxiliado na regulação da glicemia dos animais.

Estes achados tornam-se importantes devido aos conhecidos efeitos deletérios da hiperglicemia. Portanto, nosso trabalho mostra um efeito protetor do exercício que pode auxiliar no controle de um dos principias sintomas e causas de intercorrências, a hiperglicemia. Assim, estes dados sugerem que o exercício físico prévio foi capaz de prevenir a hiperglicemia pela manutenção do glicogênio hepático e pelo aumento do metabolismo mitocondrial no músculo esquelético. Deste modo, melhora a capacidade do corpo responder ao DM I.



## REFERÊNCIAS

- Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 2001 Feb; 409(6821):729-33.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White M. The c-Jun NH(2) terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*. 2000 Mar; 275(12):9047-9054.
- Alberti K, Zimmet P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *Diabet Med*. 1998 Jul; 15(7):539-53.
- American College of Sports Medicine e American Diabetes Association. Posicionamento Oficial Conjunto: Diabetes mellitus e exercício. *Rev Bras Med Esporte*. 2000 Jan/Fev; 6(1): 16-22.
- Anderson T, Schein PS, Mcmenamin MG, Cooney DA. Streptozotocin Diabetes Correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest*. 1974 Set; 54(3):672-7.
- Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation*. 2001 Mar; 103(12):1618–1623.
- Brown Gk. Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2000 Mai; 23(3):237-46.
- Carvalho JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias da Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002 Ago; 46(4):419-425.
- Campbell MK. *Bioquímica*, 3 ed. Porto Alegre: Artmed; 2000.
- Chakravarthy MV, Booth FW. Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol*. 2004 Jan; 96(1):3-10.
- Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica Ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 1996.
- Chen H, Carlson EC, Pellet L, Moritz JT, Epstein PN. Overexpression of Metallothionein in Pancreatic b-Cells Reduces Streptozotocin-Induced DNA Damage and Diabetes. *Diabetes*. 2001 Set; 50(9): 2040-2046.
- Ciolac EM, Guimarães GV. Exercício físico e síndrome metabólica. *Rev Bras Med Esporte*. 2004 Jul/Ago, 10(4): 319-324.
- Correia ML, Haynes WG, Rahmounir K, Morgan DA, Sivitz WI, Mark AL. The concept of selective leptin resistance: Evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes*. 2002 Out; 51(2):439-42.

Costa ES, Gonçalves AA, Brito IJL, Silva CA. Metformina interage com o treinamento físico diminuindo a glicemia e aumentando o armazenamento de glicogênio em ratos diabéticos. *Rev Bras Med Esporte*. 2008 Jul/Ago; 14(4).

Davidson MH, Stein EA, Bays HE, Makj KC, Doyle RT, Shalwitz RA. Efficacy and tolerability of adding prescription omega-3 fatty acids 4 g/d to simvastatin 40 mg/d in hypertriglyceridemic patients: an 8-week, randomized, double-blind, placebocontrolled study. *Clin Ther*. 2007 Jul; 29(7):1354-1367.

De Souza CT, Frederico MJ, Da Luz G, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR. Acute exercise reduces hepatic glucose production through inhibition of the Foxo1/HNF-4alpha pathway in insulin resistant mice. *J Physiol*. 2010 Jun; 588(12):2239-2253.

Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dez; 14;444(7121): 881-887.

Devlin TM. *Manual de Bioquímica com correlações clínicas*. 7.ed. São Paulo: Blucher, 2011.

Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006 Nov 11;368(9548):1696-705.

Ferreira LT, Saviolli IH, Valenti VE, Abreu LC. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arq Bras Ciências da Saúde*. 2011 Set/Dez; 36(3): 182-8.

Ferreira SRG, Vivolo MA. Atividade física no Diabetes tipo 1 e 2: Bases fisiopatológicas, importância e orientação. In: Tambascia M, Mincucci WJ, Netto AP, editores. *E-book 2.0 Diabetes na prática clínica*. 3. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes; 2014.

Fuchsjäger-Mayrl G, Pleiner J, Wiesinger GF, Sieder AE, Quittan M, Nuhr MJ, Francesconi C, Seit HP, Francesconi M, Schmetterer L, Wolzt M. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002 Oct;25(10):1795-801.

Fritsche L, Weigert C, Haring HU, Lehmann R. How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver – implications for health and disease. *Curr Med Chem*. 2008 Mar; 15(13):1316–1329.

Giannini C, Mohn A, Chiarelli F. Physical exercise and diabetes during childhood. *Acta Biomed*. 2006 Ago; 77(5):18-25.



- Godois AM, Raizel R, Rodrigues VB, Ravagnani FCP, Fett CA, Voltarelli FA. Perda hídrica e prática de hidratação em atletas de futebol. *Rev Bras Med Esporte*. 2014 Jan/Fev; 20(1):544-552.
- Gonçalves RLS, Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Mogensen MH, Brand MD. Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *J Biol Chem*. 2015 Jan; 290(1):209-27.
- Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 2004 Feb; 53 (Suppl 1):S110-8.
- Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002 Feb; 46(1):16-26.
- Ha BG, Park JE, Shin EJ, Shon YH. Modulation of Glucose Metabolism by Balanced Deep-Sea Water Ameliorates Hyperglycemia and Pancreatic Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *PLoS One*. 2014 Jul; 9(7):e102095.
- Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2001 Jun; 45(3): 219-227.
- Hall KE, McDonald KN, Grisé KN, Campos OA, Noble EG, Melling JCW. The role of resistance and aerobic exercise training on insulin sensitivity measures in STZ-induced Type 1 diabetic rodents. *Metabolism*. 2013 Out; 62(10):1485-1494.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4.ed. Oxford: Clarendon: 2007.
- Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956 Jul; 11(3):298-300.
- Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA. Physical Activity and Public Health Updated Recommendation for Adults From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007 Ago; 39(8): 1423-34.
- Iscoe KE, Riddell MC. Continuous moderate-intensity exercise with or without intermittent high-intensity work: effects on acute and late glycaemia in athletes with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2011 Jul; 28(7):824–832.
- Jackson MJ, Papa S, Bolanos J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and

- mitochondrial function. *Mol Aspects Med.* 2002 Feb/Jun; 23(1-3):209-85.
- Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol.* 2012 Jan; 32(1):309-319.
- Kjaer M. Hepatic glucose production during exercise. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 441:117-127.
- Krisman CR. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem.* 1962 Jul; 4:17-23.
- Landt KW, Campaigne BW, James FW, Sperling MA. Effects of exercise training on insulin sensitivity in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1985;8:461-5.
- Marliss EB, Vranic M. Intense exercise has unique effects on both insulin release and its roles in glucoregulation: implications for diabetes. *Diabetes.* 2002 Feb; 51(1):S271-S283.
- McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano.* 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan; 2013.
- Miculis CP, Mascarenhas LP, Boguszewski MCS, Campos W. Atividade física na criança com diabetes tipo 1. *J Pediatr.* 2010 Jan; 86(4):271-278.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2001 Feb; 5(1): 62-71.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* 1961 Jul; 191:144-8.
- Molteni R, Zhong JQ, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Twiss JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun; 101(22): 8473-8478.
- Mosher PE, Nash MS, Perry AC, LaPerriere AR, Goldberg RB. Aerobic circuit exercise training: effect on adolescents with well-controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Phys Med Rehabil.* 1998 Jun;79(6):652-7.
- Muller AP, Cammarota M, Dietrich MO, Rotta LN, Portela LV, Souza DO. Different effect of high fat diet and physical exercise in the hippocampal signaling. *Neurochem Res.* 2008; 33(5): 880-885.
- Muller AP, Zimmer ER, Kalinene E, Haas CB, Oses JP, Assis AM. Physical Exercise Exacerbates Memory Deficits Induced by

- Intracerebroventricular STZ but Improves Insulin Regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in Mice Synaptosomes. *J Alzheimers Dis.* 2012; 30(4): 889–898.
- Muller AP, Hass CB, Camacho-Pereira J, Brochier AW, Gnoatto J, Zimmer ER. Insulin prevents mitochondrial generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat brain. *Exp. Neurol.* 2013 Set; 247:66-72. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.03.007. Epub 2013 Mar 13.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger-Princípios de Bioquímica.* 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.
- Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics.* 3. ed. San Diego, CA, USA: Academic Press; 2002.
- Organização Mundial de Saúde. *Global Status Report on noncommunicable diseases 2014.* WHO Library, Geneva; 2014.
- Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1998 Fev; 9(2): 89-109.
- Pauli, JR, Cintra DE, de Souza CT, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras endocrinol metab.* 2009 Mai; 53(4):399-408.
- Pithon-Curi TC. *Fisiologia do exercício.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
- Prats C, Cadefau JA, Cusso R, Qvortrup K, Nielsen JN, Wojtaszewski JF. Phosphorylation-dependent Translocation of Glycogen Synthase to a Novel Structure during Glycogen Resynthesis. *J Biol Chem.* 2005 Jun; 280(24):23165–23172.
- Prats C, Helge JW, Nordby P, Qvortrup K, Ploug T, Dela F. Dual Regulation of Muscle Glycogen Synthase during Exercise by Activation and Compartmentalization. *J Biol Chem.* 2009 Jun; 284(23):15692–15700.
- Porte D, Sherwin RS, Baron A. *Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus.* 6. ed. New York: McGraw-Hill; 2003.
- Qu ZS, Li L, Sun XJ, Zhao YW, Zhang J, Geng Z. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Production of Amyloid- $\beta$  Peptides and Tau Phosphorylation in Diabetic Rat Brain. *Scien Wor Jour.* 2014 Abr; 2014(5): 878123.
- Raduan RA. Controle da hiperglicemia intra-hospitalar em pacientes críticos e não críticos. In: Tambascia M, Minicucci WJ, Netto AP,

- editores. E-book 2.0 Diabetes na prática clínica. 3. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes; 2014.
- Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Machado JÁ. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008 Jun; 52(7):1096-1105.
- Riddell M, Perkins BA. Exercise and Glucose Metabolism in Persons with Diabetes Mellitus: Perspectives on the Role for Continuous Glucose Monitoring. *J Diabetes Sci Technol*. 2009 Jul; 3(4):914-923.
- Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, Souza CT de, Picardi KT, Faria MC. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol*. 2006 Ago; 577(3):997-1007.
- Saltiel, AR. Kahn, CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414(6865):799–806.
- Schneider CD, Oliveira AR de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2004 Jul/Ago; 10(4): 308-313.
- Shephard RJ, Johnson N. Effects of physical activity upon the liver. *Eur J Appl Physiol*. 2015 Jan; 115(1):1-46.
- Shulman RG, Blocht G, Rothman DL. In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Set; 92(19):8535-8542.
- Sigal RJ, Kenny GP, Wasserman DH, Castaneda SC, White RD. Physical activity/exercise and type 2 diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2006 Jun; 29(6):1433–8.
- Sigal R, Kenny G, Oh P, Perkins BA, Plotnikoff RC, Prud'homme D. Physical activity and diabetes. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee. Canadian Diabetes Association 2008 clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada. *Can J Diabetes*. 2008 Jul; 32(1):S37–9.
- Silva WJM, Ferrari CKB. Mitochondrial Metabolism, Free Radicals and Aging. *Rev Bras Geriatr Gerontol*. 2011; 14(3):441-451.
- Silva KAS, Silva RL, Rampasso RR, Abreu NP, Moreira ED, Mostarda CT. Previous Exercise Training Has a Beneficial Effect on Renal and Cardiovascular Function in a Model of Diabetes. *PLoS One*. 2012 Nov; 7(11):e48826.
- Silva LA da, Pereira RA, Turmina JA, Kerppens II, Altimar LR, Malfatti CRM. Acute caffeine intake lowers glycemia before and after acute

- physical exercise in diabetic rats. *Rev Nutri.* 2014 Mar/Abr; 27(2):143-149.
- Silveira LR, Hirabara SM, Lambertucci RH, Leandro CV, Fiamoncini J, Pinheiro CHJ. Regulação Metabólica e Produção de Espécies Reativas de Oxigênio Durante a Contração Muscular: Efeito do Glicogênio na Manutenção do Estado Redox Intracelular. *Rev Bras Med Esporte.* 2008 Jan/Fev; 14(1):57-63.
- Sims NR, Blass JP. Expression of classical mitochondrial respiratory responses in homogenates of rat forebrain. *J Neurochem.* 1986 Ago; 47(2):496-505.
- Smith C, Marks AD, Lieberman M. *Bioquímica Médica Básica de Marks: uma abordagem clinica.* 2.ed. Porto Alegre: Artemed, 2007.
- Sociedade Brasileira de Diabetes. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.* AC Farmacêutica 2014-2015; SBD, 2015.
- Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis SS, Stepien A, Skibinska E, Szelachowska M. The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab.* 2001 Jun; 27(1): 19-23.
- Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med.* 2009 Mai; 46(9): 1283-97.
- Tocchetti CG, Stanley BA, Sivakumaran V, Bedja D, O'Rourke B, Paolocci N. Impaired mitochondrial energy supply coupled to increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission under energy/redox stress leads to myocardial dysfunction during Type I diabetes. *Clinical Science.* 2015 Ago; 129(7): 561-574.
- Tsalikian E, Mauras N, Beck RW, Tamborlane WV, Janz KF, Chase HP. Diabetes Research In Children Network Direcnet Study Group Impact of exercise on overnight glycemic control in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr.* 2005 Out; 147(4):528-534.
- Ubiratan FM. Transportadores de glicose. *Arq Bras de Endocrinol Metab.* 1998 Dez; 42(6):413-421.
- Valerio G, Spagnuolo MI, Lombardi F, Spadaro R, Siano M, Franzese A. Physical activity and sports participation in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007 Jun; 17(5):376-82. Epub 2006 Mar 6.
- Vivolo MA, Ferreira SRG, Hidal JT. Exercício físico e diabetes melito. *Rev Soc Cardiol Est São Paulo* 6(1):102-10, 1996.

Xiang L, Naik JS, Abram SR, Hester RL. Chronic hyperglycemia impairs functional vasodilation via increasing thromboxane-receptor-mediated vasoconstriction *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Feb; 292(1):H231–H236.

Wahren J, Ekberg K. Splanchnic regulation of glucose production. *Annu Rev Nutr*. 2007 Ago; 27:329–345.

Wasserman DH, Cherrington AD. Hepatic fuel metabolism during muscular work: role and regulation. *Am J Physiol*. 1991 Jun; 260(1):E811-24.

Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem*. 1973 Mai; 248(10): 3582-92.

Yu AP, Wu EQ, Birnbaum HG, Emani S, Fay M, Pohl G. Short-term economic impact of body weight change among patients with type 2 diabetes treated with antidiabetic agents: analysis using claims, laboratory, and medical record data. *Curr Med Res Opin*. 2007 Set; 23(9): 2157-69.

Zinman B, Vranic M, Albisser AM, Leibel BS, Marliss EO. The role of insulin in the metabolic response to exercise in diabetic man. *Diabetes*. 1979 Jan; 28:76-81.