

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO NO PERFIL METABÓLICO E OXIDATIVO DE RATOS DIABÉTICOS TIPO 2

*Edite Teixeira de Lemos^{1,2}, Flávio Reis¹, Sofia Baptista¹, Ana Patrícia Garrido¹,
Rui Pinto³, Bruno Sepodes³, Helena Vala², Petronila Rocha-Pereira⁴,
Alice Santos Silva⁵, Frederico Teixeira¹*

ABSTRACT

The oxidative stress has been involved in the pathogenic processes of a variety of diseases, including diabetes, and might play an important role on diabetic complications. The exercise training may increase free radical production and overwhelm antioxidant defences, resulting in oxidative insult. Because patients with DT2 have impaired antioxidant defences and increased oxidative stress, they could potentially be more susceptible to exercise-induced oxidative stress. However, paradoxically, exercise is recommended in the management of diabetes. This study intended to assess the metabolic profile, the oxidative stress and the antioxidant defences in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat as type 2 diabetes model and the putative influence of a chronic swimming exercise training in these status.

Male ZDF (Gmi *fa/fa*) rats and their littermates (Gmi *+/+*), aged 8 weeks, were randomly assigned in two groups: an exercise trained group and a sedentary one. Swimming training was conducted 1h/day, 3 days/week, for 12 weeks. In order to minimize the acute effect of the exercise, the animals that practised exercise were sacrificed 48 hours after the end of the last training session. Food was removed from the animal cages in the night before the sacrifice.

The ZDF (*fa/fa*) rats when compared with their littermates have demonstrated a metabolic profile of hyperglycaemia, dislipidaemia (total cholesterol and triglycerides) and hyperinsulinaemia, accompanied with decreased activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) and an increased lipid peroxi-

¹ Unidade de Terapêutica, Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, 3004-504 Coimbra;

² ESAV, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu;

³ Unidade de Farmacologia e Farmacotoxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa;

⁴ Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Covilhã;

⁵ Departamento de Bioquímica, Faculdade de Farmácia e Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

Correspondência:

Prof. Frederico Teixeira, M.D.

Institute of Pharmacology and Experimental Therapeutics

Medicine Faculty – Coimbra University

3004-504 Coimbra, Portugal

Tel: +351-239-480066; Fax: +351-239-836200

E-mail: fredjt@ci.uc.pt

dation (MDA) and total antioxidant status (TAS). In the ZDF (*fa/fa*) rats that underwent swimming exercise all the referred metabolic abnormalities were prevented ($p < 0.001$) and an increase in SOD activity (+46%) and TAS levels (+29%) as well as a lipid peroxidation decrease (MDA: -25%) were observed.

The obtained results demonstrate that swimming exercise was able to partially prevent the hyperglycaemic, dislipidaemic and hyperinsulinaemic pattern observed in this model of type 2 diabetes as well as the oxidative stress profile, thus representing a potential non-pharmacological therapeutic action for the prevention/attenuation of T2D complications.

Key-words: Type 2 diabetes, chronic exercise, oxidative stress

RESUMO

O stress oxidativo parece estar envolvido na fisiopatologia de uma variedade de doenças, incluindo a diabetes, e pode ter um papel importante nas suas complicações. O exercício físico pode aumentar a produção de radicais livres e comprometer as defesas antioxidantes, resultando num agravamento oxidativo. Os indivíduos com Diabetes Tipo 2 são mais susceptíveis ao agravamento do stress oxidativo induzido pelo exercício físico pois apresentam defesas antioxidantes debilitadas e stress oxidativo aumentados. Contudo, paradoxalmente, a prática regular de exercício físico (treino) tem sido recomendada como medida de controlo da diabetes. Este trabalho pretendeu avaliar os possíveis efeitos do exercício físico aeróbio, praticado de forma crónica, no perfil metabólico e em alguns parâmetros de stress oxidativo e defesas antioxidantes de ratos ZDF.

Ratos ZDF machos (Gmi *fa/fa*) e os respectivos controlos (Gmi +/+), com 8 semanas de idade, foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: um grupo submetido a exercício físico e outro sem exercício (sedentário). O treino de natação estabelecido foi 1h/dia, 3 vezes por semana durante 12 semanas. Os animais foram sacrificados 48h após a última sessão de treino para minimizar o efeito agudo do exercício. A dieta foi retirada na noite anterior ao sacrifício.

Os ratos ZDF (*fa/fa*) quando comparados com os controlos demonstraram um perfil metabólico de hiperglicemia, dislipidemia (colesterol total e triglicéridos) e hiperinsulinemia, acompanhados pelo decréscimo da actividade da superóxido dismutase (SOD) e da glutathione peroxidase (GPx) e pelo aumento da peroxidação lipídica (MDA) e do estado antioxidante total (TAS). Os ratos ZDF (*fa/fa*) que praticaram exercício físico (natação) melhoraram todos os parâmetros metabólicos alterados pela doença ($p < 0,001$) verificando-se um ainda um aumento de actividade da SOD (+46%) e dos níveis de TAS (+29%), bem como pelo decréscimo da peroxidação lipídica (MDA: -25%).

Os resultados obtidos mostram que o protocolo de exercício utilizado foi capaz de prevenir parcialmente as alterações metabólicas (hiperglicemia, hiperinsulinemia e dislipidemia) e o stress oxidativo observado neste modelo experimental de Diabetes Tipo 2, constituindo assim uma potencial medida terapêutica não farmacológica na prevenção/atenuação das complicações da DT2.

Palavras-chave: diabetes tipo 2, exercício crónico, stress oxidativo.

INTRODUÇÃO

O exercício físico está associado a um aumento de radicais livres, principalmente devido ao consumo de oxigénio pelos tecidos activos. A maior parte do oxigénio consumido é utilizado na mitocôndria para a fosforilação oxidativa onde é reduzido a água. Entretanto, uma fracção pequena, porém significativa, do oxigénio consumido pode escapar da cadeia transportadora de electrões e produzir radicais livres de oxigénio (ROS)¹. Mesmo o exercício físico moderado pode produzir radicais livres com consequente diminuição das defesas antioxidantes, resultando dano oxidativo². Por outro lado, o exercício regular (treino), quer de *endurance* quer intervalado, parece induzir a protecção antioxidante com diminuição do dano oxidativo. O exercício físico regular é capaz de proteger o organismo contra o stress oxidativo induzido por ele próprio³. No rato, reduz os sinais inerentes ao envelhecimento, aumentando a média de esperança de vida em 10% e melhorando a função imune^{4,5}.

A diabetes é uma síndrome pluri-metabólica fundamentalmente caracterizada por perturbações no metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos e diagnosticada pela presença de hiperglicemia. Esta patologia constitui actualmente um problema à escala mundial, devido a um aumento da morbilidade e mortalidade cardiovasculares resultantes do desenvolvimento de complicações macro e microvasculares. A prevalência desta doença tem vindo a aumentar, não sendo alheias a este aumento certos factores ambientais tais como o sedentarismo e a obesidade.

O stress oxidativo, avaliado laboratorialmente através de índices de peroxidação lipídica e de oxidação proteica, encontra-se aumentado na DT2 e na DT1⁶, mesmo em doentes ainda sem graves complicações. Apesar desta evidência de que o stress oxidativo pode contribuir para a manifestação e progressão das complicações diabéticas, resta ainda esclarecer se o stress oxidativo estará associado ou se é causa das modificações fisiopatológicas subjacentes à diabetes. Tal deve-se sobretudo ao facto da avaliação do stress oxidativo ser feita de forma indirecta e inespecífica. E, por isso, o mecanismo ou mecanismos que conduzem ao stress oxidativo na diabetes permanecem por elucidar na sua totalidade. No entanto, tem sido sugerida a existência de mecanismos interligados⁷, em que há produção acrescida de radicais livres como o superóxido e, simultaneamente, uma diminuição do *status* antioxidante global⁸⁻⁹. Estes mecanismos incluem a glucooxidação¹⁰, a formação de produtos avançados da glicação (AGE)¹¹, a activação da via do polioli¹², as alterações da glutatona reduzida¹³, as alterações do metabolismo do ascorbato, da inactivação do monóxido de azoto (NO) ou do metabolismo das prostaglandinas¹⁴⁻¹⁵.

O exercício físico praticado de forma regular tem mostrado um efeito protector nas alterações desenvolvidas pelo sistema cardiovascular, sendo amplamente recomendado como uma medida preventiva e terapêutica em doentes diabéticos¹⁶. Todavia, nestes doentes, os mecanismos através dos quais o exercício diminui a mortalidade cardiovascular não são conhecidos. O exercício regular

poderá fortalecer as defesas antioxidantes, reduzindo assim o stress oxidativo provocado pelo exercício agudo e pela patologia consequente¹⁷.

Os ratos Zucker Diabetic Fatty (ZDF) proporcionam um bom modelo animal para o estudo da diabetes tipo 2 humana¹⁸. Descendentes dos ratos Zucker hiperglicémicos e obesos, apresentam uma mutação ao nível do receptor da leptina¹⁹, o que vai comprometer o efeito da leptina, nomeadamente ao nível de supressão do apetite e dos efeitos termogénicos²⁰. Assim, estes animais apresentam obesidade, níveis plasmáticos elevados de colesterol e triglicérides¹⁸, hiperfagia, poliúria e polidipsia²¹. O desenvolvimento da diabetes é muito semelhante ao que ocorre no homem, passando de um estadio de insulino-resistência (hiperinsulinémico - euglicémico) a um estadio em que as células beta não respondem ao aumento da glucose, levando a uma redução da secreção da insulina. Estes animais tornam-se assim, com o tempo, hiperglicémicos e com hipoinsulinemia relativa.

Este trabalho pretendeu avaliar os efeitos do exercício físico aeróbio, praticado de forma crónica, no perfil metabólico e no stress oxidativo de ratos ZDF.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e protocolo experimental

Foram utilizados 48 ratos ZDF machos, 24 euglicémicos magros (ZDF/Gmi +/+) e 24 diabéticos obesos (ZDF/Gmi *fa/fa*), com 6 semanas de idade (peso inicial 136,0-179,5 g, respectivamente), procedentes dos Laboratórios Charles River (Barcelona, Espanha),

mantidos em gaiolas individuais, em local com temperatura (22°C), humidade (60%) e luz (12 horas de luz) controladas. Antes e durante a fase experimental, foi fornecida aos animais ração de manutenção para roedores (A-04 Panlab, Barcelona, Espanha), adaptada ao seu peso (100 mg/g de peso) e água destilada *ad libitum*.

Às 8 semanas de idade foram sacrificados 8 ratos (+/+) e 8 ratos (*fa/fa*) para caracterização deste modelo animal, no tempo zero (T0). Os restantes animais foram distribuídos ao acaso em 4 grupos:

- **Ratos controlo (+/+) sem exercício:** animais não diabéticos magros (n=8) que não realizam exercício físico para além do naturalmente efectuado no espaço confinado à gaiola;
- **Ratos controlo (+/+) com exercício:** animais não diabéticos magros (n=8) que inicialmente são submetidos ao treino físico 7 dias/semana, durante 2 semanas, até se adaptarem a nadar 1h sem intervalo. Após este período, nadam 1 hora, 3 vezes por semana, durante mais 10 semanas;
- **Ratos diabéticos (*fa/fa*) sem exercício:** animais diabéticos obesos (n=8) que não realizam exercício físico para além do naturalmente efectuado no espaço confinado à gaiola;
- **Ratos diabéticos (*fa/fa*) com exercício:** animais diabéticos obesos (n=8), submetidos ao mesmo esquema de exercício que o grupo (+/+).

O exercício foi realizado num tanque cilíndrico com 120 cm de diâmetro e 80 cm de altura, contendo água a 30 –

32°C. Os animais foram colocados no tanque todos os dias à mesma hora (9h-10h) e manipulados pela mesma pessoa. A duração da natação, no período de adaptação, foi inicialmente de 15 minutos e foi gradualmente aumentada até atingir 60 minutos após o que se iniciou o treino propriamente dito. No final do exercício, os animais foram secos e mantidos em ambiente aquecido.

Nos dias em que decorreram as sessões de treino, os animais sedentários foram removidos das suas gaiolas e colocados no recipiente, previamente limpo e seco, onde decorrem as sessões de natação, por períodos de 60 minutos.

Os animais que praticaram exercício foram sacrificados 48 horas após o fim da última sessão de treino, de forma a minimizar os efeitos agudos do exercício.

Na noite que antecede o sacrifício foi retirada a comida aos animais.

Colheita das amostras

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com 2 ml/kg de uma solução 2:1 (v/v) de 50 mg/ml de cloridrato de cetamina (Ketalar[®] Parke-Davies, Pfizer Laboratories, Seixal, Portugal) em clorpromazina a 2,5 % (Largactil[®] Rhône-Poulenc Rorer, Laboratórios Vitória, Amadora, Portugal) e o sangue foi recolhido na veia jugular. O sangue assim obtido foi dividido em alíquotas para obtenção de soro, plasma e sangue total, para doseamento do colesterol total (Total-c), triglicérideos (TGs), glicose, HbA1c, insulina, MDA, estado antioxidante total (TAS) e da actividade da superóxido dismutase (SOD) e da glutathione peroxidase (GPx).

Determinações experimentais

A quantificação dos níveis séricos de T-col e TG foi feita num analisador Roche Hitachi 717 analyzer (Diamond Diagnostics, Holliston, MA, USA) através de metodologia padronizada para análises clínicas. Os resultados foram expressos em mg/dL. A concentração plasmática de glicose foi doseada através do método da glicose oxidase (Vitros 250, Diamond Diagnostics, Holliston, MA, USA).

O doseamento da hemoglobina glicosilada (HbA1c) foi efectuado no sangue total utilizando-se o método de imunoaglutinação, DCA 2000 (Bayer Diagnostics, Alemanha). Na determinação da insulina plasmática recorreu-se a técnicas de Enzyme Linked-Immunesorbent-Assay (ELISA, sandwich), através do kit comercial da Mercodia (Uppsala, Suécia).

A quantificação da peroxidação lipídica foi efectuada no soro, avaliando-se a presença de malondialdeído (MDA) pelo método de Yagi (1998), utilizando o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) como padrão²².

A determinação da actividade da SOD eritrocitária foi feita recorrendo ao Kit RANSOD (Randox Lab. Ltd U.K.) de acordo com McCord and Fridovich²³. A determinação da GPx foi realizada em sangue total utilizando o Kit RANSEL (Randox Lab. Ltd, U.K.) de acordo com Paglia and Valentine²⁴. O doseamento do TAS foi efectuado no plasma com o Kit TAS (Randox Lab. Ltd U.K.) de acordo com Miller *et al*²⁵.

Análise estatística

Os resultados são apresentados sob a forma de média \pm erro padrão

da média, sendo estatisticamente tratados pelo teste de Fisher's PLSD (*protected least significant difference*) obtidos por ANOVA. São considerados significativos os valores de probabilidade inferior a 0,05.

RESULTADOS

Caracterização metabólica

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das determinações de glicemia, HbA_{1c}, colesterol total e TGs, insulina efectuadas às 8 semanas de idade (T0: tempo inicial) e às 20 semanas de idade (Tf: tempo final), isto é, com 12 semanas de experimentação.

No T0, o grupo de ratos diabéticos (*fa/fa*) exibiu já diferenças significativas relativamente ao seu controlo não diabético (+/+) em todos os parâ-

metros avaliados. Com efeito, os ratos (*fa/fa*) apresentaram um aumento significativo da glicemia, HbA_{1c}, Total-c e TGs. Doze semanas depois, às 20 semanas de idade, não se verificaram alterações significativas destes parâmetros nos ratos controlo (+/+), excepto para o peso que sofreu um aumento de 56%. Já no grupo de ratos diabéticos (*fa/fa*) verificou-se um aumento ainda mais relevante e significativo em todos aqueles parâmetros: valores mais elevados de peso (+86%), glicemia (+163%), HbA_{1c} (+202%), insulina (+32,13 %), colesterol total (+77%) e triglicéridos (+95%).

O exercício foi capaz de prevenir de forma estatisticamente significativa o aumento daqueles valores no grupo dos ratos diabéticos (*fa/fa*), isto é, foram sempre obtidos valores significativamente mais baixos do que aqueles que não praticaram exercício:

Parâmetro	Grupo	Tempo inicial (8 semanas de idade)	Tempo final (20 semanas de idade)		Efeito do exercício
			Sem exercício	Com exercício	
Peso corporal (g)	(+/+)	199,00 ± 3,50	311,43 ± 5,12 ^{b***}	323.75 ± 6.58	↑ +4.0% NS
	(<i>fa/fa</i>)	228,40 ± 4,05 ^{a***}	425,50 ± 20,80 ^{b***}	438.00 ± 14.82	↑ +2.9% NS
Glicose (mg/dl)	(+/+)	147,60 ± 11,85	133,30 ± 1,20	124.17 ± 1.31	↓ -6.9% NS
	(<i>fa/fa</i>)	234,60 ± 12,65	618,10 ± 3,60 ^{b***}	548.50 ± 15.40 ^{c***}	↓ -11.3% S
HbA _{1c} (%)	(+/+)	3,24 ± 0,08	3,16 ± 0,12	3.05 ± 0.10	↓ -3.5% NS
	(<i>fa/fa</i>)	4,20 ± 0,16 ^{a***}	12,56 ± 0,20 ^{b***}	11.73 ± 0.20 ^{c***}	↓ -6.6% S
Insulina (pmol/L)	(+/+)	384,16 ± 6,58	380,66 ± 1,59	397.11 ± 3.94	↑ +4.3% NS
	(<i>fa/fa</i>)	1020,26 ± 9,20 ^{a***}	1348,07 ± 16,50 ^{a***}	1317.11 ± 5.24 ^{c**}	↓ -2.3% S
Total-c (mg/dl)	(+/+)	84,25 ± 3,79	78,14 ± 2,60	72.50 ± 1.77	↓ -7.2% NS
	(<i>fa/fa</i>)	113,38 ± 6,12 ^{a***}	200,63 ± 10,34 ^{b***}	165.90 ± 9.63 ^{c***}	↓ -17.3% S
TGs(mg/dl)	(+/+)	60,75 ± 1,65	66,43 ± 1,80	61.75 ± 1.96 ^{c***}	↓ -7.0% NS
	(<i>fa/fa</i>)	218,40 ± 5,80 ^{a***}	426,40 ± 4,80 ^{b***}	289.38 ± 9.60 ^{c***}	↓ -32.1% S

Os valores estão expressos como média ± e.p.m. para cada grupo. Significâncias estatísticas: ^a(*fa/fa*) vs (+/+) no tempo inicial; ^btempo final vs tempo inicial; ^cratos com exercício vs ratos sem exercício e *, ** e *** para p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente. ↓ indica as variações estatisticamente significativas; ↓ e ↑ indicam variações tendenciais.

Tabela 1. Caracterização metabólica dos ratos não diabéticos ZDF (+/+) e diabéticos ZDF (*fa/fa*) no início da experiência (8 semanas de idade) e no final do período experimental (20 semanas de idade), sem e com exercício durante 12 semanas. Em cada grupo e cada tempo n=8.

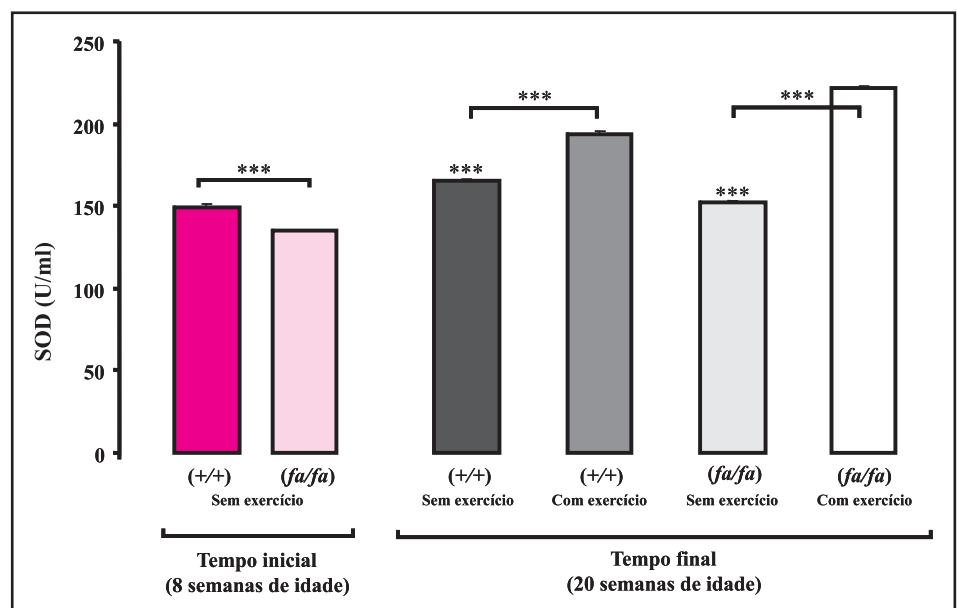
glicemia (-11,3%), HbA1c (-6,6%), insulina (-2,3%) colesterol total (-17,3%) e triglicerídeos (-32%). Também nos ratos não diabéticos (controle) que praticaram exercício se observou uma tendência para valores inferiores, aos obtidos em ratos que o não fizeram, em todos aqueles parâmetros avaliados, embora sempre com diferenças estatisticamente não significativas (Tabela 1).

Nos animais que praticaram exercício observou-se uma tendência para um aumento de peso nas duas séries de animais: (+3,8%) para o grupo (+/+) com exercício e (+2,8%) no grupo (*fa/fa*) com exercício (Tabela 1), embora tal não seja estatisticamente significativo.

Equilíbrio oxidativo

Os valores da SOD nos ratos ZDF diabéticos (*fa/fa*) com 8 semanas de vida (T0) diferem significativamente dos apresentados pelos ratos não diabéticos (+/+) com a mesma idade ($151,80 \pm 1,60$ U/ml vs $164,86 \pm 1,66$ U/ml; $p < 0,001$) (Fig. 1). Doze semanas depois, os dois grupos, (*fa/fa*) e (+/+), registaram um aumento significativo dos níveis de SOD: +12,56% e +10,20, respectivamente.

O exercício físico aeróbio (natação) levou a um aumento significativo ($p < 0,001$) dos valores de SOD, quer nos ratos diabéticos (*fa/fa*) (+46%) quer nos ratos não diabéti-



Parâmetros	Grupo	Tempo zero (8 Semanas de idade)	Tempo final (20 semanas de idade) 12 Semanas de treino	
			Sem exercício	Com exercício
SOD(U/ml)	(+/+)	$149,60 \pm 1,86$	$164,86 \pm 1,67^{b***}$	$193,38 \pm 2,54^{c***}$
	(<i>fa/fa</i>)	$134,80 \pm 0,37^{a****}$	$151,75 \pm 1,60^{b****}$	$221,75 \pm 0,86^{c****}$

Figura 1. Actividade da Superóxido Dismutase (SOD) eritrocitária observada nos ratos ZDF não diabéticos (+/+) e ZDF diabéticos (*fa/fa*), no tempo zero (8 semanas de vida) e no tempo final (20 semanas de vida), sem e com exercício durante um período de 12 semanas. Os valores representam médias \pm e.p.m de $n = 8$ ratos de cada grupo. Significância estatística *, ** e *** para $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.

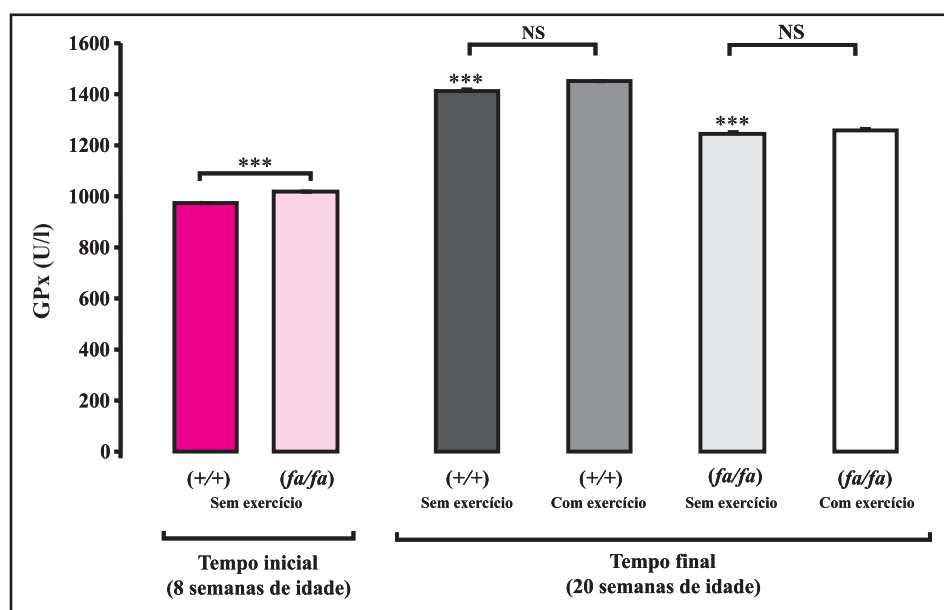
cos (+/+) (+17%), às 20 semanas de vida (após 12 semanas de exercício).

Às 8 semanas de idade (T0) os animais pertencentes ao grupo (*fa/fa*) apresentaram níveis de actividade da GPx significativamente superiores ($p < 0,001$) aos apresentados pelo grupo controlo (+/+) ($1018,00 \pm 0,84$ U/l vs $975,40 \pm 0,40$ U/l). Às 20 semanas de vida (Tf) observou-se um aumento dos valores de GPx quer para o grupo de ratos diabéticos (*fa/fa*), onde esse aumento foi de (+22%; $p < 0,001$), quer para o grupo de ratos não diabéticos (+/+), para o qual se registou um acréscimo de +45% ($p < 0,001$) (Fig. 2).

O exercício físico não modificou significativamente a actividade de GPx

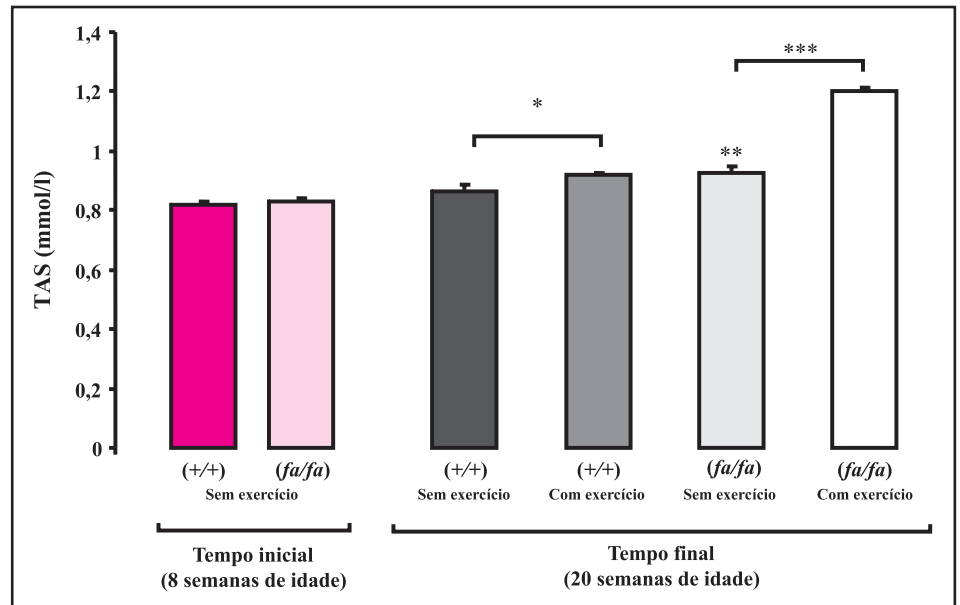
nos grupos em estudo, apresentando, no entanto, valores de actividade da GPx tendencialmente aumentados.

Os valores encontrados para a capacidade antioxidante total (TAS) no início do período experimental (às 8 semanas de idade dos ratos) para o grupo diabético (*fa/fa*) e para o grupo não diabético (+/+) não diferem significativamente entre si ($0,830 \pm 0,12$ vs $0,820 \pm 0,12$). Todavia, 12 semanas depois (às 20 semanas de idade) verificou-se um aumento significativo do valor de TAS para o grupo diabético (*fa/fa*), com um acréscimo de +11,57% ($p < 0,01$), não havendo alterações para o grupo controlo não diabético (+/+) (Fig. 3).



Parâmetros	Grupo	Tempo zero (8 Semanas de idade)	Tempo final (20 semanas de idade) 12 Semanas de treino	
			Sem exercício	Com exercício
GPx(U/l)	(+/+)	975,40 ± 0,40	1414,00 ± 4,98 ^{b***}	1450,50 ± 3,89
	(fa/fa)	1018,00 ± 0,84 ^{a***}	1242,88 ± 5,80 ^{b***}	1260,12 ± 6,33

Figura 2. Actividade da Glutaciona Peroxidase (GPx) em sangue total observada nos ratos ZDF não diabéticos (+/+) e ZDF diabéticos (*fa/fa*), no tempo zero (8 semanas de vida) e no tempo final (20 semanas de vida), sem e com exercício por um período de 12 semanas. Os valores representam médias ± e.p.m de n = 8 ratos de cada grupo. Significância estatística *, ** e *** para $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente.



Parâmetros	Grupo	Tempo zero (8 Semanas de idade)	Tempo final (20 semanas de idade) 12 Semanas de treino	
			Sem exercício	Com exercício
TAS (mmol/l)	(+/+)	0,82 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,92 ± 0,03 [*]
	(fa/fa)	0,83 ± 0,01	0,93 ± 0,02 ^{b**}	1,20 ± 0,02 ^{c***}

Figura 3. Estado antioxidante total (TAS) séricos nos ratos ZDF não diabéticos (+/+) e ZDF diabéticos (fa/fa) no tempo zero (8 semanas de vida) e no tempo final (20 semanas de vida), sem e com exercício por um período de 12 semanas. Os valores representam médias ± e.p.m. de n=8 ratos de cada grupo. Significância estatística *, ** e *** para p<0,05; p<0,01 e p<0,001, respectivamente.

A natação promoveu o aumento da capacidade antioxidante total (+29,60%; p<0,001) quer no grupo de ratos diabéticos ZDF (fa/fa) quer no grupo de ratos não diabéticos (+/+) (+ 6,97%; p<0,05).

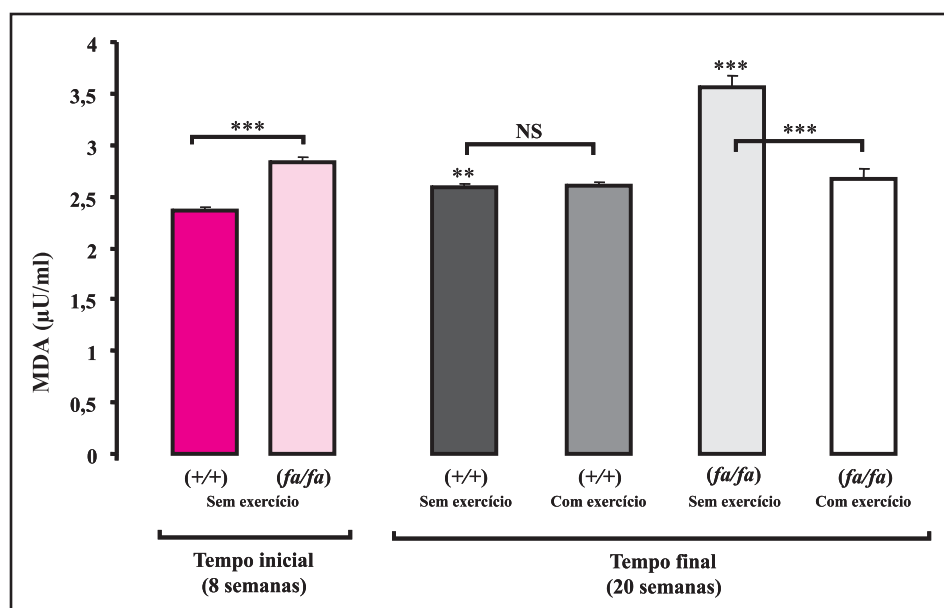
A peroxidação lipídica, avaliada pelos níveis de malondialdeído, estava já aumentada no grupo de ratos diabéticos (fa/fa), relativamente ao seu controlo de ratos não diabéticos (+/+) (2,84±0,05 vs 2,36±0,04; p<0,001), no início do período experimental, isto é às 8 semanas de vida. Das 8 para as 20 semanas de idade, verificou-se um aumento estatisticamente significativo dos valores de MDA quer nos ra-

tos diabéticos (fa/fa) (+25,6%; p<0,001), quer nos animais do grupo não diabético (+/+) (+9,89%; p<0,01).

O exercício físico preveniu a elevação dos valores de MDA no grupo diabético (fa/fa) (-24,99%; p<0,001), ao contrário do que aconteceu no grupo de ratos não diabético (+/+) em que os valores de MDA não diferiram significativamente dos verificados nos mesmos ratos sem exercício (Fig. 4).

DISCUSSÃO

Algumas evidências apontam o exercício físico aeróbio, praticado de



Parâmetros	Grupo	Tempo zero (8 Semanas de idade)	Tempo final (20 semanas de idade) 12 Semanas de treino	
			Sem exercício	Com exercício
MDA (μU/ml)	(+/+)	2,36 ± 0,04	2,60 ± 0,03 ^{b**}	2,61 ± 0,03
	(fa/fa)	2,84 ± 0,05 ^{a***}	3,56 ± 0,12 ^{b***}	2,67 ± 0,12 ^{c***}

Figura 4. Concentração sérica de Malondialdeído (via TBARS) nos ratos ZDF não diabéticos (+/+) e ZDF diabéticos (fa/fa) no tempo zero (8 semanas de vida) e no tempo final (20 semanas de vida), sem e com exercício por um período de 12 semanas. Os valores representam médias ± e.p.m. de n = 8 ratos de cada grupo. Significância estatística *, **, e *** para p<0,05; p<0,01 e p<0,001, respectivamente.

forma regular (treino), como uma medida profilática das perturbações metabólicas e cardiovasculares associadas à DT2²⁶⁻²⁷. Todavia, os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a estes efeitos benéficos no Homem têm sido difíceis de elucidar, razão pela qual é frequente a utilização de modelos animais. Neste contexto, a utilização dos ratos ZDF (fa/fa) para o estudo dos efeitos do exercício físico na DT2 e no stress oxidativo a ela associado poderá ser de grande utilidade.

Este estudo confirma os efeitos positivos do exercício regular na correcção/prevenção da desregulação metabólica que acompanha a DT2²⁸⁻²⁹.

Com efeito, os animais diabéticos que realizaram um programa de treino de natação regular apresentaram valores mais baixos de glicemia, HbA1c, colesterol e triglicédeos do que os animais que não fizeram. Este decréscimo significativo nos parâmetros metabólicos não foi acompanhado de alterações no peso corporal, observando-se mesmo uma tendência para o seu aumento. Este resultado está de acordo com o observado por outros autores que encontraram um aumento da massa muscular com a concomitante diminuição do tecido adiposo após o treino^{30,31}. A melhoria metabólica induzida pelo treino de nata-

ção poderá, assim, contribuir para a diminuição da glicotoxicidade e lipotoxicidade observada nos ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*).

Deverá salientar-se que, neste trabalho, as amostras foram recolhidas em estado de jejum e 48 horas após a última sessão de treino, reflectindo, por isso, um estadio de cronicidade que permitirá a extrapolação dos resultados para as condições observadas no quotidiano.

É actualmente aceite que a hiperglicemia, a hiperinsulinemia e a insulino-resistência aumentam a geração de radicais livres ou diminuem as defesas antioxidantes, contribuindo desta forma para o stress oxidativo na DT2^{32,33}. A avaliação do stress oxidativo pode, por isso, contribuir para o conhecimento dos processos fundamentais envolvidos nas anomalias metabólicas, uma vez que o aumento do stress oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento e na progressão da diabetes e no aparecimento das suas complicações.

Os níveis de MDA, uma medida indirecta da peroxidação lipídica, são claramente diferentes entre os grupos. Os ratos diabéticos que praticaram treino de natação durante 12 semanas apresentaram níveis de MDA muito inferiores ao dos animais diabéticos sedentários, sugerindo efeitos benéficos produzidos pelo exercício.

A natação foi também descrita como capaz de aumentar as defesas antioxidantes em vários órgãos e no sangue de animais saudáveis^{34,35} e também em ratos diabéticos³⁶. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que tanto nos ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*) como no seu controlo não diabético (+/+) a natação praticada de forma

regular durante doze semanas foi capaz de prevenir a diminuição da actividade da SOD (Fig. 1), verificando-se uma tendência para o aumento da actividade da GPx nos ratos diabéticos (*fa/fa*). Os resultados da GPx foram semelhantes aos obtidos por Stoppa *et al.*³⁷ em ratos diabéticos do Tipo 1. Por outro lado, sabendo que a SOD funciona nas células como uma defesa primária contra os radicais superóxido, poder-se-á afirmar que o aumento dos seus níveis observado nos animais diabéticos que praticam exercício, corresponde a um aumento da resistência ao stress oxidativo³⁸.

A capacidade antioxidante total (TAS) nos animais diabéticos sedentários (*fa/fa*) foi superior à observada nos ratos controlo não diabético sedentário, contrariando alguns autores que mostraram uma diminuição da actividade de TAS em diabéticos^{39,40}. Um grande número de métodos tem sido desenvolvido para avaliar a capacidade antioxidante total, medindo cada componente antioxidante de forma separada. No entanto, o TAS não é necessariamente igual à soma de todos os antioxidantes presentes no soro e a sua quantificação dá-nos a ideia do equilíbrio dinâmico entre os pró-oxidantes e os antioxidantes⁴¹. Este aumento do valor de actividade do TAS ocorreu em paralelo com o aumento do MDA verificado no grupo (*fa/fa*) e poderá indicar uma capacidade do sistema antioxidante para reagir à agressão oxidativa numa tentativa para proteger os ratos diabéticos sedentários (*fa/fa*) contra o stress oxidativo. O treino de natação regular durante 12 semanas foi capaz de aumentar a actividade do TAS no grupo diabético ZDF (*fa/fa*), o que sugere um aumento da actividade an-

tioxidante do organismo de forma a permitir a remoção dos ROS. Acresce a este facto que a peroxidação lipídica nos animais diabéticos (*fa/fa*) que praticaram exercício se mostrou também diminuída (-25%).

De um modo geral, o exercício físico, quando praticado de forma regular (treino) aumenta o aporte de energia aos tecidos activos, criando condições para o stress oxidativo (efeito conhecido como paradoxo do exercício). Os resultados obtidos mostraram que a natação praticada de forma regular durante 12 semanas aumentou a actividade das enzimas SOD e GPx nos animais saudáveis (grupo controlo não diabético (+/+)), tal como observado por outros autores³⁵, sugerindo que é necessário um sistema antioxidante eficiente para neutralizar os radicais livres produzidos durante o exercício. Por sua vez, o aumento de actividade daquelas enzimas antioxidantes (SOD) foi ainda mais acentuado nos ratos diabéticos ZDF (*fa/fa*), sugerindo haver aqui um esforço acrescido para contrariar não só o stress oxidativo induzido pelo exercício como também o induzido pela hiperglicemia. Isto é, a disponibilização de um suporte efectivo do possível efeito protector/preventivo do exercício físico regular (natação) contra o stress oxidativo na diabetes.

Em conclusão, considerando que o stress oxidativo aumentado possa estar na génese das perturbações cardiovasculares observadas na DT2⁴²⁻⁴³, poder-se-á dizer, pelos resultados obtidos neste trabalho, que o exercício físico regular poderá constituir uma medida terapêutica importante como coadjuvante da terapêutica farmacológica, na prevenção do stress oxidativo induzido pela DT2.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Fundação Merck Sharp & Dohme.

REFERÊNCIAS

1. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; 10: 125-40.
2. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2 Suppl): 653S-69S.
3. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 283-292.
4. Holloszy JO. Longevity of exercising male rats: effect of an antioxidant supplemented diet. *Mech Ageing Dev* 1998; 100: 211-9.
5. De la Fuente M., Hernanz A, Vallejo MC. The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1356-66.
6. Atalay M, Laaksonen DE, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O, Sen CK. Altered antioxidant enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiol Scand* 1997; 161: 195-201.
7. Cameron NE., Cotter MA, Hohman TC. Interactions between essential fatty acid, prostanoid, polyol pathway and nitric oxide mechanisms in the neurovascular deficit of diabetic rats. *Diabetologia* 1996; 39: 172-82.
8. Ceriello A, Giugliano D, Quattraro A, Dello-Russo P, Lefebvre PJ. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabetic Medicine* 1991; 8: 540-2.
9. Dandona P, Thushu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996; 347: 444-5.
10. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Radic Biol & Med* 1991; 10: 339-52.
11. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997; 99: 457-68.
12. Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R, Shigeta Y. Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. *Diabetes* 1996; 45:S84-S86.
13. De Mattia G, Laurenti O, Bravi C, Ghiselli A, Iuliano L, Balsano F. Effect of aldose reductase inhibition on glutathione redox status in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 1994; 43:965-968.
14. Sinclair AJ, Girling AJ, Gray L, Le-Guen C, Lunec J, Barnett AH. Disturbed handling of ascorbic acid in diabetic patients with and without microangiopathy during high dose ascorbate supplementation. *Diabetologia* 1991; 34: 171-5.

15. Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H, Ito T, Nakagawa A, Kigoshi T, Ishibashi T, Nishio M, Uchida K. Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetic subjects. Relationship to microvascular complications. *J Diabetes Complic* 2001; 15:135-143.
16. American Diabetes Association. Clinical practice recommendations. *Diabetes Care* 1998; 21:S1-95.
17. Sen C.K. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 1995; 79:675-86.
18. Peterson RG, Shaw WN, Neel MA, et al. Zucker diabetic fatty rat as a model for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Inst Lab Anim Resources News* 1990;32:16-27.
19. Pickavance L, Widdowson PS, King P, Ishii S, Tanaka H, Williams G. The development of overt diabetes in young Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and the effects of chronic MCC-555 treatment. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 767-70.
20. Terretaz J., Jeanrenaud B. In vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (*fa/fa*) rats. *Endocrinology* 1983; 112:1346-51.
21. Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE. Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 2001; 50: 1021-9.
22. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 1998; 108: 101-6.
23. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I.Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; 244: 6056-63.
24. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
25. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* 1993; 84: 407-12.
26. Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen LK, Mustonen J, Sen CK, Lakka TA, Uusitupa MI. Aerobic exercise and the lipid profile in type 1 diabetic men: a randomized controlled trial. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 1541-8.
27. Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Hu FB. Physical activity in relation to cardiovascular disease and total mortality among men with type 2 diabetes. *Circulation* 2003; 7: 2435-9.
28. Kelley DE, Goodpaster BH. Effects of exercise on glucose homeostasis in Type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(6 Suppl): S495-501.
29. Thompson WG. Early recognition and treatment of glucose abnormalities to prevent type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 1137-43.
30. Boule NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA* 2001; 286: 1218-27.
31. Mourier A, Gautier JF, De Kerviler E, Bigard AX, Villette JM, Garnier JP, Duvallat A, Guezennec CY, Cathelineau G. Mobilization of visceral adipose tissue related to the improvement in insulin sensitivity in response to physical training in NIDDM. Effects of branched-chain amino acid supplements. *Diabetes Care* 1997; 20: 385-91.
32. Mosinger BJ. Higher cholesterol in human LDL is associated with the increase of oxidation susceptibility and the decrease of antioxidant defence: experimental and simulation data. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453: 180-4.
33. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.
34. Venditti P, Di Meo S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. *Int J Sports Med* 1997; 497-502.
35. Cesquini M, Torsoni MA, Ogo H. Adaptive response to swimming exercise: antioxidant systems and lipid peroxidation. *J Anti-Ageing Med* 1999; 357-63.
36. Gul M, Laaksonen DE, Atalay M, Vider L, Hanninen O. Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports* 2002; 12:163-70.
37. Stoppa GR, Cesquini M, Roman EA, Ogo SH, Torsoni MA. Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. *Life Sci* 2006; 78: 1352-61.
38. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 1025-33.
39. Ceriello A, Bortolotti N, Pirisi M, Crescentini A, Tonutti L, Motz E, Russo A, Giacomello R, Stel G, Taboga C. Total plasma antioxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20: 1589-93.
40. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, LeGuen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1997; 34(Pt 6): 638-44.
41. Castillo C, Hernandez J, Valverde I, Pereira V, Sotillo J, Alonso ML, Benedito L. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res Vet Sci* 2006; 80: 133-9.
42. Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002; 133: 493-505.
43. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.