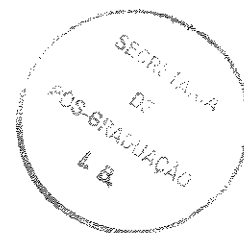


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



EUNICE CRISTINA DA SILVA

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÇÃO CIRCULANTE

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO METFORMINA – EXERCÍCIO REGULAR NO  
METABOLISMO DE RATOS DIABÉTICOS

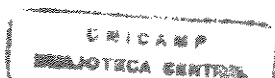
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Eunice Cristina da Silva e aprovada pela Comissão Julgadora.

10/09/2001  
*[Handwritten signature]*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves

Campinas  
2001



UNIDADE 00  
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP  
Si 38e  
 V.      Ex.       
 TOMBO BC/ 46.02A  
 PROC. 16-392/01  
 C  D   
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 15-02-01  
 N.º CPD     

II-A

CM00158787-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Silva, Eunice Cristina da**

**Si38e** Efeitos da associação metformina – exercício regular no metabolismo de ratos diabéticos/Eunice Cristina da Silva. – Campinas-SP. [s.n.], 2001.  
 82p. Il.

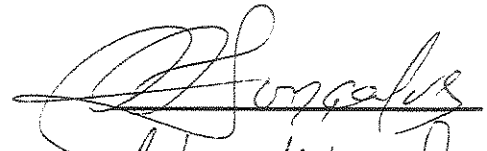
Orientador: Antonio Ari Gonçalves  
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
 Instituto de Biologia.

1. Diabetes. 2. Metabolismo energético. 3. Exercício físico.  
 I. Gonçalves, Antonio Ari. II. Universidade Estadual de Campinas.  
 Instituto de Biologia. III. Título.

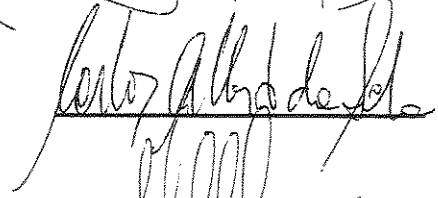
Data da Defesa: 10/04/2001

BANCA EXAMINADORA:

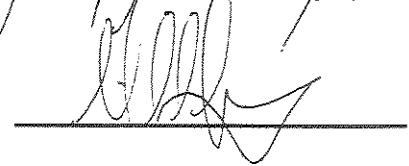
Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves (Orientador)

Handwritten signature of Antonio Ari Gonçalves in black ink, written over a horizontal line.

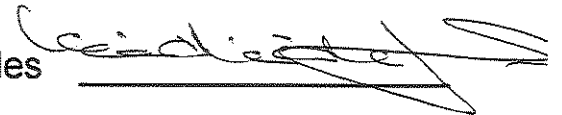
Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

Handwritten signature of Carlos Alberto da Silva in black ink, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Handwritten signature of Miguel Arcanjo Areas in black ink, written over a horizontal line.

Prof. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Handwritten signature of Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes in black ink, written over a horizontal line.

*Filho, desde a juventude acolhe a instrução, e até à velhice encontrarás a sabedoria:*

*Como o lavrador e semeador, aproxima-te dela e espera-seus-bons frutos.*

*Por algum tempo labutarás em seu cultivo mas comerás, em breve, de seus produtos.*

**Eclo-6,18-19;**

**Principalmente aos meus pais e aos meus irmãos pela ajuda e incentivos  
constantes**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Ari Gonçalves, pela sua dedicação e amizade, favorecendo meu aprendizado científico e profissional;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva, pelo grande auxílio na execução dos experimentos e pela presença e estímulos constantes;

A amiga Isaura Jaqueline de Lima Brito, pela amizade e auxílio na execução dos experimentos;

A Esméria, pela ajuda fundamental na execução do protocolo experimental;

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela amizade e contribuição em minha formação;

A todos professores pela minha formação;

A todos colegas da pós-graduação pela amizade e ajuda no dia-a-dia;

A todos funcionários do Depto de Fisiologia e Biofísica pela amizade, e em especial a Aparecida, pela sua grande ajuda e dedicação nos experimentos;

Ao Prof. Dr. Sidnei Ragazzi pela ajuda na análise estatística dos dados;

Ao programa de bolsas da FAPESP pelo auxílio financeiro proporcionado;

Ao programa de bolsas do CNPq pelo auxílio financeiro durante a iniciação científica que proporcionou o desenvolvimento deste projeto de mestrado;

Ao grupo Lipha S.A. – International Pharmacological Support pela assistência e fornecimento de metformina durante toda a execução do projeto;

Ao programa de bolsas FAEP que propiciou o auxílio para a divulgação de parte deste trabalho em Congresso internacional;

Aos meus pais, Manuel e Laurinda, sem os quais, nada disso seria possível;

Aos meus irmãos, Fernando e Paulo, pelos incentivos constantes;

Ao meu namorado Sérgio, pela paciência e tolerância;

A Deus que sempre me deu forças para continuar lutando.

Obrigada.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Eletrofisiologia e Metabolismo no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP).

## RESUMO

**Introdução:** O armazenamento e a mobilização das reservas energéticas podem ser afetadas por muitos fatores, tais como: exercício e doenças. O treinamento promove adaptações que melhoram a utilização das reservas metabólicas e preserva o armazenamento de glicogênio no fígado e nos músculos. Doenças, como diabetes diminui a habilidade do organismo em manter o armazenamento de glicogênio. Em estudos anteriores, nós mostramos que o exercício regular e a droga anti-hiperglicemiante, metformina, trouxeram benefícios a ratos diabéticos.

**Objetivo:** Dessa forma, o objetivo deste trabalho é estudar os efeitos do treinamento e da metformina, uma droga anti-hiperglicemiante, sobre a insulina plasmática e os parâmetros metabólicos (glicemia, ácidos graxos livres, triglicerídeos e glicogênio) de ratos diabéticos.

**Método:** Antes de receberem a injeção de aloxana (40mg/kg peso corpóreo), os ratos foram adaptados à natação ( $\pm 28^{\circ} \text{C}$ ). Os ratos dos grupos Treinado Diabetes (TD),  $n = 6$ ; Treinado Diabetes Metformina (TDM),  $n = 6$ ; Treinado (T),  $n = 5$  e Treinado Metformina (TM),  $n = 4$  foram treinados durante 20 sessões de natação de 30 minutos, 5 vezes por semana, com repouso de 2 dias. Os grupos controle: Sedentário (S),  $n = 6$ ; Sedentário Metformina (SM),  $n = 6$ ; Sedentário Diabetes (SD),  $n = 6$ ; Sedentário Diabetes Metformina (SDM),  $n = 8$  foram apenas manipulados. Os ratos tratados receberam metformina (M) *ad libitum* na água de beber (5.6  $\mu\text{g/ml}$ ) e o volume de água foi medida para estimar a quantidade ingerida. Após 28 dias de tratamento, amostras de sangue foram coletadas após 30-45 min de efeito da anestesia (pentobarbital, 40 mg/kg peso corpóreo, i.p.) para medir glicemia (mg/dL), ácidos graxos livres (mMol/L) e triglicerídeos (mg/dL). Insulina plasmática (ng/mL) foi determinada para confirmar o estado diabético. Amostras de fígado, sóleo, gastrocnêmio e ventrículo foram coletadas para medir o glicogênio (mg/100 mg). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  SEM e as diferenças foram consideradas como significativas quando os valores de P foram menores que 0,05.



**Resultados:** O tratamento com metformina diminuiu a glicemia no grupo SD, sem alterar a insulina plasmática. A metformina também aumentou o armazenamento de glicogênio no fígado e nos músculos sóleo e gastrocnêmio em ratos dos grupos tratados com metformina, SM e SDM. O treinamento, *per se*, aumentou o glicogênio hepático e muscular em ambos grupos T e TD. Este aumento está relacionado ao aumento da captação de glicose pelas células musculares, que por sua vez ativa a hexoquinase e fosfofrutoquinase, resultando em aumento de glicogênio (BROOKS, 1998; KOVAL et al, 1998). A associação metformina e treinamento aumentou o armazenamento de glicogênio apenas no fígado e sóleo.

O mecanismo de ação da metformina ainda é desconhecido. Entretanto, sabe-se que a metformina diminui a lipólise em células do tecido adiposo, contribuindo para corrigir o balanço entre glicose e ácidos graxos (Ciclo de Randle) em diabéticos (PERRIELO et al., 1994). Estes autores sugerem que a diminuição da saída de ácidos graxos livres do tecido adiposo contribuem para o efeito anti-hiperglicêmico da metformina. Nossos resultados podem ser interpretado dessa forma devido à reconhecida ação inibidora da metformina sobre a lipólise, bem como sobre os níveis de triglicerídeos plasmáticos, como verificado em ratos dos grupos S e SD. No grupo TDM os níveis de ácidos graxos livres diminuíram à metade, porém, continuando superiores aos do que o grupo S.

Nossos resultados sugerem que a associação metformina-exercício regular melhorou o controle glicêmico e o perfil lipídico, preservando, também, o glicogênio no fígado e muscular de ratos diabéticos, porém, com pouco efeito em relação aos grupos apenas tratados com metformina.

## ABSTRACT

**Introduction:** Storage and mobilization of fuel reserves is affected by many factors, such as, exercise and diseases. So, training adaptation improves the utilization of metabolic reserves and preserves the glycogen content in liver and muscles. On the other hand, diabetes decreases the glycogen stores in many tissues. In previous work, we have shown that regular exercise and the anti-hyperglycemic drug, metformin (M) were beneficial to diabetic rats.

**Aim:** For that reasons, this work study the effects of training and of metformin, an anti-hyperglycemic drug, on plasmatic insulin and some metabolic parameters such as glucose, free fatty acids, triglycerides and glycogen in diabetic rats.

**Methods:** Before made diabetics by alloxan (40 mg/kg body weigh), rats were adapted to swimming ( $\pm 28^{\circ}$  C). The groups: Trained (T), n= 5, Trained Metformin (TM), n=4, Trained Diabetes (TD), n = 6, Trained Diabetes Metformin, (TDM), n = 6, were trained during 20 swimming sessions with 30 min duration, 5 times a week, resting 2 days. The control groups: Sedentary (S), n=6, Sedentary Metformin (SM), n = 6, Sedentary Diabetes (SD), n = 6 and Sedentary Diabetes Metformin (SDM), n = 8 were manipulated, only. Treated rats received metformin *ad libitum* in the drinking water (5.6  $\mu$ g/ml). The amount of metformin taken was estimated by measuring the volume of water intake. After 28 days treatments, samples of blood were collected 30-45 min after anesthesia (Pentobarbital, 40 mg/kg of body weigh, i.p.) for the measurements of glycemia (mg/dL), free fatty acids (mMol/L) and triglycerides (mg/dL). Plasmatic insulin (ng/mL), was measured to confirm the diabetic state. Samples of liver, soleus, gastrocnemius and ventricle were collected to measure the glycogen content (mg/100 mg). Data are presented as mean  $\pm$  SEM and the differences were regarded as significant for P values below 0,05.

**Results:** The treatment with metformin decreased glycemia in SD group, but did not alter plasmatic insulin. Metformin, also increased glycogen storage in liver and in soleus muscles of groups SM and DM and gastrocnemius muscle of groups DM. *Per se*,

training increased hepatic and muscular glycogen in both, T and TD groups. This increase is related to the increased uptake of glucose by the muscle cells that increases hexokinase and fosfofrutokinase activation resulting in increase of glycogen synthase into muscle (BROOKS, 1998; KOVAL et al, 1998).

Notwithstanding, when this rats were treated by metformin, the glycogen storage increased in liver and soleus muscle, only.

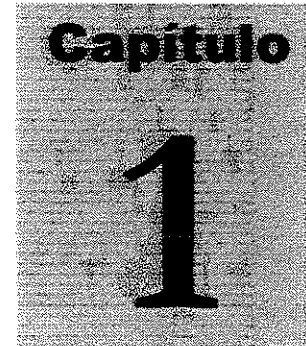
The mechanism of action of metformin are unknown. However, it is known, that metformin decreases lipolysis in adipocytes, which certainly contributes for the recovery of the equilibrium between glucose and free fatty acids in blood (Randle cycle) (PERRIELLO et al, 1994). This authors suggest that the reduction of free fatty acids outflow from adipose tissue contributes to the anti-hyperglycemic effect of metformin. Our results could be interpreted in this way because metformin, probably, through its inhibition of lipolysis decrease free fatty acids in blood, as well as, plasmatic triglycerides in groups SM and SDM. In the trained diabetic rats which were treated with metformin the levels of free fatty acids were further decreased yet, still higher than in the control group.

Our results suggest that the association metformin-regular exercise improved the glycemic control and the lipid profile, also preserving the liver and muscle glycogen storage of diabetic rats, but is few in relation to the group only treated metformin.

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
1.1 APRESENTAÇÃO	4
1.2 DIABETES	6
1.3 METFORMINA	8
1.4. EFEITOS DO EXERCÍCIO SOBRE A SÍNTESE E A DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS	10
<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>14</b>
3.1 ANIMAIS	15
3.2 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS	16
3.3 TRATAMENTO COM METFORMINA	16
3.4 EXERCÍCIO FÍSICO, ESQUEMA DE TREINAMENTO E MANUTENÇÃO	17
3.5 PARÂMETROS MEDIDOS EM GAIOLA METABÓLICA	17
3.6 AMOSTRAGEM	18
3.7 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO	18
3.8 DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA E DOS TRIGLICERÍDEOS	18
3.9 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES ( A.G.L.)	19
3.10 SECREÇÃO DINÂMICA DE INSULINA	19
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
<b>RESULTADOS</b>	<b>20</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL, CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR	21
4.1.1 RATOS MANTIDOS EM GAIOLAS INDIVIDUAIS	21
4.1.2 RATOS MANTIDOS EM GAIOLA COLETIVA	22
4.2 INSULINA E PARÂMETROS METABÓLICOS DE RATOS MANTIDOS EM GAIOLAS COLETIVAS	23
4.2.1 EFEITO DA INDUÇÃO DE DIABETES POR ALOXANA	23
4.3 EFEITOS DA METFORMINA EM RATOS NORMAIS SEDENTÁRIOS E TREINADOS	23
4.3.1 EFEITO DA METFORMINA EM RATOS NORMAIS SEDENTÁRIOS	23
4.3.2 EFEITO DO TREINAMENTO EM RATOS NORMAIS	24
4.3.3 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO: METFORMINA E TREINAMENTO EM RATOS NORMAIS	24
4.4 EFEITOS DO TRATAMENTO COM METFORMINA EM RATOS DIABÉTICOS SEDENTÁRIOS E TREINADOS	25
4.4.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA EM RATOS DIABÉTICOS	25
4.4.2 EFEITO DO TREINAMENTO SOBRE RATOS DIABÉTICOS	25
4.4.3 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO: METFORMINA E TREINAMENTO EM RATOS DIABÉTICOS	26
4.5 FIGURAS	27

<b>DISCUSSÃO</b>	52
5.1 EVOLUÇÃO PONDERAL, GANHO DE PESO, CONSUMO HÍDRICO E ALIMENTAR	53
5.2 PARÂMETROS METABÓLICOS	54
<b>CONCLUSÃO</b>	60
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	62



# **INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 APRESENTAÇÃO

A biossíntese de glicogênio no fígado e músculos tem sido associada ao estado nutricional do organismo, atividade física e às concentrações de hormônios, como insulina, glucagon, catecolaminas e glicocorticóides (KRISMAN & BARRENGO, 1975; SMYTHE & COHEN, 1991).

O padrão metabólico de um indivíduo pode ser afetado pelo tipo, intensidade e duração do exercício, promovendo utilização diferenciada de reservas energéticas (BROOKS & FAHEY, 1985; HOLLOZZY & KOHRT, 1996), afetando os níveis circulantes de glicose, triglicerídeos e ácidos graxos livres, podendo trazer benefícios à saúde. Assim, os efeitos do exercício físico bem programado contribuem para reduzir os riscos de doenças cardiovasculares. Sabe-se que o exercício físico é responsável por alterações metabólicas, através do aumento do número de mitocôndrias, da atividade oxidativa, dos níveis de enzimas envolvidas na síntese de ATP e, conseqüentemente, estimulando o metabolismo de carboidratos e ácidos graxos. Assim, melhora o controle de glicose e dos lipídeos circulantes, o que é benéfico para os portadores de diabetes mellitus (BROOKS, 1998; FELIG et al, 1987; STANLEY & CONNETT, 1991; HOLLOSZY & KOHRT, 1996).

O diabetes mellitus é caracterizado pela ausência ou secreção deficiente de insulina ou pela resistência periférica ao hormônio, afetando o metabolismo de carboidratos, de lipídeos e de proteínas, resultando em hiperglicemia e glicosúria. Os portadores deste distúrbio metabólico podem desenvolver cetoacidose em virtude de grande mobilização de glicose dos reservatórios hepáticos e pelo aumento da lipólise (SHEPHARD & ASTRAND, 1992).

O exercício aeróbio é o mais indicado para portadores de doenças metabólicas, como o diabetes, por manter a normoglicemia, não aumentar os níveis de ácido láctico e porque aumenta as reservas de glicogênio nos tecidos (BROOKS & FAHEY, 1985; BERG, 1986). Além disso, reduz o peso corporal, adapta o sistema cardiovascular e o sistema neurovegetativo e simultaneamente, aumenta os níveis de colesterol do tipo

HDL (SHEPHARD & ASTRAND, 1992). Todavia, a atividade física somente, pode não ser suficiente para o controle glicêmico, podendo ser necessário associá-la a medicamentos para restabelecer completamente a normalidade glicêmica.

Um dos agentes farmacológicos utilizado no tratamento de diabéticos tipo 2 é a metformina, a qual reduz a glicemia sem provocar hipoglicemia (De FRONZO et al, 1991; BAILEY, 1992) e por isto é classificada como anti-hiperglicemiante. Os episódios de hipoglicemia relatados com metformina são muito raros quando comparados aos efeitos de agentes que estimulam a secreção de insulina, como a glibenclâmida (LALAU et al, 1995; CAMPBELL et al, 1988).

Ao planejarmos este trabalho, consideramos os efeitos benéficos do exercício regular e da metformina sobre alguns parâmetros metabólicos. Em experimentos preliminares demonstramos que o tratamento com metformina durante 10 dias aumentou o conteúdo de glicogênio hepático em ratos normais e a recuperação parcial destas reservas em ratos diabéticos (da SILVA & GONÇALVES, 1994). Dando continuidade a estes estudos, em nossa monografia (da SILVA, 1998) demonstramos que a metformina modificou o perfil metabólico, tanto em ratos sedentários submetidos ao estresse por exercício (natação), quanto em ratos treinados, melhorando a resistência ao exercício.

Considerando estes resultados, é possível que a associação entre o exercício regular e o tratamento com metformina possa contribuir para melhorar os parâmetros metabólicos (glicose, triglicerídeos, ácidos graxos livres) e aumentar as reservas de glicogênio em músculos e no fígado de ratos diabéticos.



## 1.2 DIABETES

No diabetes mellitus, ao lado de um reduzido transporte de glicose nos tecidos sensíveis à insulina também há uma grande produção de glicose pelo fígado. Estas anormalidades são decorrentes, principalmente, de insuficiente secreção de insulina em resposta à glicose e/ou insensibilidade tecidual à ação da insulina (resistência à insulina). As causas do aparecimento do diabetes mellitus não são bem conhecidas. Ao menos, uma predisposição é hereditária. Foram reconhecidos dez diferentes tipos de genes relacionados ao diabetes mellitus tipo 1, sendo que os mais importantes estão situados nos cromossomos 6 e 11, onde estão os genes responsáveis pela produção de insulina (TODD, 1995). O diabetes mellitus também pode ser causado por destruição de células  $\beta$  por drogas ou por doenças de origem viral ou desenvolver-se em decorrências de desnutrição ou gravidez. Modernamente, classifica-se o diabetes mellitus em dois tipos.

O tipo 1 ou diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM), anteriormente chamado diabetes juvenil, porque manifesta-se com maior frequência em crianças e adolescentes (em torno de 12 anos idade). Nos indivíduos portadores de diabetes tipo 1 o pâncreas produz pouca ou nenhuma insulina. Esta é uma desordem auto-imune na qual as células T ativadas infiltram-se nas ilhotas e provocam a destruição das células  $\beta$ . O tratamento do diabético tipo 1 é feito principalmente através de injeções de insulina e o controle do número e conteúdo das refeições. O médico leva em conta a sensibilidade de cada paciente aos efeitos da insulina (EMILIEN et al, 1999).

Os principais sintomas do diabetes tipo 1 são: aumento de micção (frequência e volume), aumento da sede, perda de peso e cansaço. Estes sintomas são causados pelo aumento de glicose no sangue e sua perda na urina. A perda de glicose e de água na urina resulta em desidratação, o que provoca sede. Em virtude do aumento do metabolismo lipídico, parte dos sub produtos é convertida a cetonas. Se esta produção for excessiva, haverá aumento de acidez no plasma que será eliminada na urina e no ar expirado.

O diabetes do tipo 2 ou diabetes mellitus não dependente de insulina (NIDDM), aparece mais freqüentemente em indivíduos com mais de 40 anos e em obesos mais jovens. Em geral, pode ser causada por diminuição da secreção de insulina por diminuição do número de células  $\beta$  ou por diminuição da sensibilidade delas ou por aumento da resistência periférica ao hormônio (ex.: aumento de peso, diminuição da atividade física).

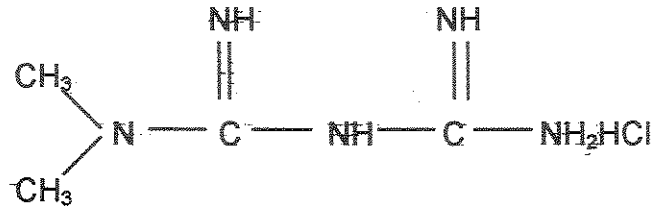
No caso do diabetes tipo 2 ser causado por aumento da resistência à insulina uma das prioridades é diminuir a hiperglicemia. O objetivo principal é reduzir as complicações micro- e macro-vasculares e, ao mesmo tempo, reduzir a insulinemia. A abordagem padrão tem sido exercício e dietas. Estas são particularmente planejados para facilitar a perda de peso em obesos. Quando estas práticas não são suficientes para baixar a glicemia, há necessidade de adicionar medicamentos à terapia. Agentes orais como sulfoniluréias, metformina e acarbose, foram instituídas como monoterapias. Recentemente, uma nova classe de medicamentos tornou-se disponível, as tiazolidinas (troglitazona e rosiglitazona). Associações entre estas terapias com a finalidade de obter proveito de suas respectivas propriedades tem sido sugeridas para melhorar o tratamento (BAILEY & TURNER, 1996).

A manutenção crônica da hiperglicemia e altas concentrações de lipídeos (glicotoxicidade e lipotoxicidade) em diabéticos agravam o quadro de resistência à insulina, causando complicações, entre elas, problemas cardiovasculares, como: arteriosclerose, hipertensão arterial e hiperlipoproteinemia. Outras complicações do diabetes são nefropatia, retinopatia, glaucoma, neuropatia e lesões dermatológicas (BODEN, 1997).

A hiperglicemia mantida causa a glicosilação não-enzimática das proteínas, que altera sua estrutura e função, como a glicosilação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que não mais são capazes de se ligarem aos receptores de LDL. A glicosilação da hemoglobina é um processo contínuo dentro das hemácias e reflete a concentração de glicose a qual a célula esteve exposta durante sua vida (BENNETT & CECIL, 1997) e por esta razão a hemoglobina glicosilada é utilizada como um indicador do estado do diabético.

### 1.3 METFORMINA

A metformina é uma biguanida, cuja fórmula estrutural é:



As biguanidas, conhecidas de longa data, foram utilizadas no tratamento de diabetes já em 1920 (DAWIS & GRANNER, 1996). Fenformin, a primeira a ser utilizada, foi retirada do mercado pois seu uso foi associado à cetoacidose. Metformina tem sido utilizada a longo tempo para tratar do diabetes tipo 2 na Europa e mais recentemente no Brasil. Metformina tem sido utilizada no tratamento do diabetes tipo 2, sozinha ou em associação com outras drogas, pois melhora o controle glicêmico e lipídico em pacientes que não respondem à dieta alimentar (De FRONZO & GOODMAN, 1995; HOWLETT & BAILEY, 1999). Em contraste com as sulfonilurêias, metformina promove a perda de peso do diabético, não aumenta a secreção de insulina e não causa hipoglicemia. Consequentemente metformina favorece a diminuição da resistência à insulina. Além disso, recentemente foi mostrado que ela também protege contra doenças cardiovasculares particularmente, em obesos, dislipidêmicos e hipertensos (HOWLETT & BAILEY, 1999). Em conjunto, vários efeitos da metformina reduzem a glicemia: supressão da saída de glicose hepática, estimulação da captação de glicose pelas células musculares, estimulação do aumento do armazenamento de glicogênio e inibição da oxidação de ácidos graxos (RICCIO et al, 1991; STUMVOLL et al, 1995; da SILVA, 1998, BAILEY, 1999).

O mecanismo de ação da metformina é multifatorial, mas ainda não é completamente conhecido. É sugerido que metformina pode ativar o mecanismo de ação da insulina, aumentando a atividade do receptor de insulina levando a translocação dos transportadores de glicose GLUT4 para a membrana plasmática dos

músculos esqueléticos (HOWLETT & BAILEY, 1999). Entretanto, a presença de insulina é necessária para que o efeito da metformina se manifeste (BAILEY, 1995). Nos músculos esqueléticos, tecido adiposo e fígado a metformina aumenta a oxidação de glicose e diminui a oxidação de ácidos graxos livres. Entretanto, metformina talvez possa também afetar a oxidação de glicose e ácidos graxos livres em outros tecidos, inclusive nas células  $\beta$ . Estes efeitos são importantes no tratamento de diabéticos pois, quando os ácidos graxos livres estão em excesso, a oxidação de glicose diminui (ciclo de Randle); principalmente pela inibição da atividade da piruvato desidrogenase (PATANÉ et al., 2000).

Embora ainda haja controvérsias, parece que a metformina também está associada a modestas reduções (<10%) no conteúdo de triglicerídeos plasmáticos, colesterol total e de lipoproteínas de baixa densidade (BAILEY, 1992).

Efeitos colaterais foram observados em 20% dos pacientes no início do tratamento com metformina, incluindo desconforto abdominal, sabor metálico, náuseas, anorexia e diarreia. Segundo HERMANN, 1979 e SCARPELLO et al, 1998, a diarreia pode refletir em distúrbio na absorção de sais biliares. Apesar da rápida excreção urinária com meia vida plasmática entre, 1,5 e 4,5 h (HOWLETT & BAILEY, 1999), há um pequeno risco de acidose láctica (0,1 caso por 1000 pacientes/ano). Por isso, esta droga não é recomendada a pacientes com deficiências hepáticas e renais.

## 1.4. EFEITOS DO EXERCÍCIO SOBRE A SÍNTESE E A DEGRADAÇÃO DE SUBSTRATOS

Na maioria dos vertebrados, a glicose é convertida em piruvato na via glicolítica e posteriormente oxidada a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , utilizando oxigênio molecular. Nos músculos brancos (gastrocnêmio) durante a atividade muscular intensa (corrida de 100 metros), quando o fornecimento de oxigênio não é suficiente para oxidar todo o piruvato, a glicólise anaeróbia é particularmente importante. Consequentemente, os músculos utilizam parte do seu conteúdo de glicogênio como combustível aumentando a produção de lactato que será convertido em glicose pelo fígado (LENINGHER et al, 1993).

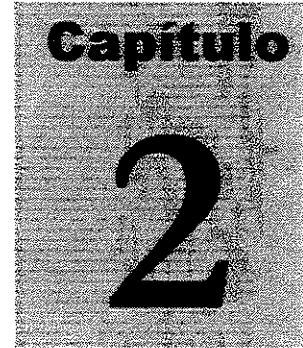
Este processo também ocorre em músculos vermelhos. Mais recentemente, tem sido realçado que o lactato é uma importante fonte de energia durante o jejum e a atividade física prolongada. Ele transita rapidamente entre compartimentos teciduais via transporte facilitado e também é convertido em glicose no fígado através do Ciclo de Cori (LENINGHER et al, 1993). Além da utilização do lactato como fonte energética, o treinamento de resistência favorece maior utilização de lipídeos em substituição à glicose e ao glicogênio, como fontes de energia, retardando a fadiga já que a redução dos estoques de glicogênio são determinantes na exaustão do indivíduo (ROMIJN et al, 1993; BROOKS, 1998; ZIERLER, 1999). Este aumento da utilização de lipídeos é decorrente do aumento de transportadores carnitina e do número de mitocôndrias, onde ocorre a  $\beta$  oxidação (BROOKS, 1998).

Algumas destas mudanças no metabolismo do indivíduo já começam a ocorrer na primeira sessão de exercício físico. Apenas uma sessão de exercício proporciona aumento da captação de glicose e, consequentemente, o aumento da concentração de glicose-6-fosfato e da atividade da hexoquinase II que resulta em aumento da atividade da glicogênio sintetase no músculo esquelético, independente de insulina (CARTEE et al, 1991; PERSEGHIN et al., 1996, DELA, 1996; KOVAL et al 1998).

Sendo assim, o exercício proporciona aumento do metabolismo celular, além de maior sensibilidade dos receptores insulínicos das células dos músculos, do fígado e

de outros tecidos, aumentando a captação de glicose (CARTEE et al, 1991; PERSEGHIN et al., 1996; DELA, 1996).

Todos esses eventos ocorrem também em indivíduos diabéticos (VRANIC & BERGER, 1979; BERG, 1986, PERSEGHIN, 1996; DELA, 1996). Isto não significa a cura do diabetes pelo exercício, mas é um importante agente não farmacológico que favorece o tratamento. Todavia, são necessárias algumas precauções para a prescrição de atividade física a indivíduos diabéticos, em virtude da possibilidade de ocorrer acidose láctica e hipoglicemia se o paciente estiver em uso associado de insulina. Para evitar tais complicações é necessário a prática de exercícios de resistência com intensidade moderada acompanhada de supervisão médica.



## **OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

Considerando que, o exercício regular moderado e a metformina corrigem vários parâmetros metabólicos que usualmente estão alterados nos diabéticos, decidimos investigar se estas formas de tratamento associadas melhoram o metabolismo de carboidratos e lipídeos em ratos diabéticos.



**Capítulo**

**3**

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos, albinos, Wistar (fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP) com idade de 10 semanas. Os ratos foram mantidos em ciclo fotoperiódico de 12 h claro/12 h escuro, a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, sendo alimentados com ração (Purina® para roedores) e água "ad libitum". Os ratos foram distribuídos em gaiolas coletivas (grupos de 4 a 5 ratos), com trocas diárias. Grupos idênticos foram mantidos em gaiolas individuais.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos, a saber:

Grupos Sedentários:

1. Sedentário (**S**) (n=6) - ratos normais (controle) que foram apenas manuseados;
2. Sedentário Metformina (**SM**) (n=6) - ratos normais que foram apenas manuseados e tratados com metformina;
3. Sedentário Diabético (**SD**) (n=6) - ratos diabéticos que foram apenas manuseados;
4. Sedentário Diabético Metformina (**SDM**) (n=8) - ratos sedentários diabéticos que foram apenas manuseados e tratados com metformina;

Grupos Treinados

O efeito do exercício regular será avaliado em ratos treinados em sessões de natação. Os grupos treinados foram assim constituídos:

1. Treinado (**T**) (n=4) - ratos normais
2. Treinado Metformina (**TM**) (n=5) - ratos normais tratados com metformina
3. Treinado Diabético (**TD**) (n=6) - ratos diabéticos.
4. Treinado Diabético Metformina (**TDM**) (n=6) - ratos diabéticos tratados com metformina.

### 3.2 Indução do diabetes mellitus

Antes da indução do diabetes mellitus, os ratos foram mantidos em jejum durante 24 horas, com livre acesso a água. Após a anestesia (pentobarbital sódico, 40mg /kg de peso corporal, i.p.), os ratos receberam uma injeção de aloxana em salina (40 mg/kg de peso, i.v., pH 4,5). O estabelecimento do diabetes foi verificado através da presença de glicose na urina usando fita (Glicofita®).

Constatando o estado diabético, os ratos receberam subcutaneamente, 1 UI (unidade internacional) de insulina de longa duração (Neosulin N, NPH® suína, monocomponente) nos três dias seguintes. Esse curto período de tratamento com insulina serviu para diminuir a mortalidade que geralmente ocorre nos primeiros dias após a administração da aloxana.

### 3.3 Tratamento com metformina

Os ratos tratados (diabéticos e normais) receberam metformina (5,6 µg/ml) na água de beber durante 28 dias.

Ratos em situação semelhante foram colocados em gaiolas metabólicas para medir a ingestão de água. Dessa forma, pudemos quantificar a metformina ingerida pelos ratos ( $3,35 \pm 0,18$  µg/g de peso corporal para o grupo diabetes sedentário, n=5 e  $2,6 \pm 0,07$  µg/g de peso corporal para o grupo diabetes treinado, n=7;  $P > 0,05$ ). Considerando que o consumo médio de água pelos ratos mantidos em gaiolas coletivas não diferiu dos mantidos em gaiolas individuais, usamos os mesmos parâmetros para estimar a quantidade de metformina ingerida individualmente.

### **3.4 Exercício físico, esquema de treinamento e manutenção**

Ratos constituem um bom modelo para a observação da maioria dos efeitos metabólicos produzidos pelo treinamento (OSTMAN-SMITH, 1979; VAN DIJK et al, 1994).

Para melhorar o condicionamento aeróbio é necessário que ocorra o aumento da frequência, duração ou intensidade da atividade física, sem sobrepor duas variáveis ao mesmo tempo. Normas do American College of Sports Medicine estabelecem que o exercício aeróbio deve durar de 20 a 60 minutos, em 3 a 5 sessões por semana. Neste trabalho, utilizamos a variável intensidade, isto é, aumento progressivo de carga para aumentar o condicionamento aeróbio. Para isso, adicionamos um peso ao rato, que foi aumentado semanalmente, correspondendo ao máximo de 3% de peso corporal.

Após privação de alimento por 1 h, ratos dos grupos treinados nadaram em um tanque (95 x 50 x 50 cm), contendo água a  $30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ . Os ratos do grupo Treinado Diabético, foram adaptados à natação antes de receberem a injeção de aloxana para reduzir, assim, o estresse associado e, conseqüentemente o número de mortes. Este período iniciou-se com uma sessão de 5 minutos, aumentando progressivamente 5 min em cada sessão até completar 30 min, 5 vezes por semana. Após a indução do diabetes, os ratos nadaram por uma semana sem adição de peso, por 30 minutos. Os ratos não diabéticos do grupo Treinado foram submetidos ao mesmo procedimento. As sessões de natação foram realizadas pela manhã, 5 vezes por semana, totalizando 20 sessões. Da 6ª até a 10ª sessão de treinamento, cada rato nadou com um peso equivalente a 1% do peso corporal; da 11ª até a 15ª sessão o peso correspondeu a 2% do peso corporal e da 16ª até o final, com 3% do peso corporal.

### **3.5 Parâmetros medidos em gaiola metabólica**

Para avaliar a evolução ponderal, ingestão alimentar e hídrica, excreção urinária e volume fecal dos ratos treinados e sedentários tratados ou não com metformina,

utilizamos gaiolas metabólicas, sendo as medidas realizadas a cada 24 horas, sempre pela manhã (início 8:00).

### **3.6 Amostragem**

Ao final do período experimental, as amostras de tecidos para análise de glicogênio foram retiradas de ratos alimentados de todos os grupos experimentais (treinados em repouso de 48 horas e sedentários) no período da manhã (entre 7:00 e 9:00 horas) sob anestesia com pentobarbital sódico, (40 mg/kg de peso corporal, i.p.). Após 30-45 min de efeito anestésico, o sangue foi coletado em seringas heparinizadas e o plasma separado por centrifugação (3000 rpm) e a seguir colhemos amostras de fígado (500 mg) e dos músculos sóleo, gastrocnêmio e ventrículo cardíaco (200 mg).

### **3.7 Extração e determinação do glicogênio**

As amostras de tecidos foram digeridas em KOH 30%, a quente, e o glicogênio precipitado a partir da passagem por etanol. Entre uma fase e outra da precipitação, a amostra foi centrifugada (3000 rpm, 15 min). O glicogênio precipitado, foi submetido a hidrólise ácida na presença de fenol a quente (LO et al, 1970). A concentração de glicogênio, foi estimada pelo equivalente de glicose produzido ao final (mg/100 mg de peso úmido) através da leitura da absorbância a 490 nm em espectrofotômetro.

### **3.8 Determinação da glicemia e dos triglicerídeos**

A glicemia foi determinada pelo método da glicose oxidase (TRINDER, 1969) usando "kit" laboratorial Laborlab<sup>®</sup>. A concentração de triglicerídeos foi determinada pelo método de McGOWAN, (1983) através de "kit" laboratorial Laborlab<sup>®</sup>.

### **3.9 Determinação dos ácidos graxos livres ( A.G.L.)**

Para avaliação dos ácidos graxos livres foi utilizado o método de REGOUW et al, (1971). Em resumo, a 0,3 ml de plasma foram adicionados 7 ml da mistura solvente, composta de clorofórmio, heptano e metanol, na proporção 28:21:1. Após agitar, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado uma solução de 0,05 de  $\text{MCu}(\text{NO}_3)_2$ , 0,10 M de trietanolamina, 0,035-N de NaOH e NaCl a 35%, pH 8,1, seguida de nova agitação e centrifugação. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 0,5 ml de solução de dietilditilcarbamato de sódio (1mg/ml de butanol secundário) a 3,0 ml do sobrenadante. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 435 nm usando como padrão uma solução de ácido palmítico em clorofórmio. Os valores foram expressos em mMol/L.

### **3.10 Secreção dinâmica de insulina**

Para determinar o real estado diabético dos ratos aloxanizados em comparação ao controle, alíquotas do plasma foram armazenadas a  $-80^\circ \text{C}$  para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio (HERBERT et al., 1965).

### **3.11 Análise estatística**

Os dados apresentados são as médias  $\pm$  SEM. As comparações foram efetuadas através da análise de variância para dois fatores e teste de Tukey para comparações entre as médias. As diferenças foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

**Capítulo**  
**4**

**RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

Neste trabalho, os ratos dos grupos não diabéticos foram utilizados apenas para avaliar os padrões de “normalidade”, sendo predominantemente tratados aqui, os resultados obtidos de animais diabéticos, alvo de nosso estudo.

### 4.1 Avaliação da evolução ponderal, consumo hídrico e alimentar

#### 4.1.1 Ratos mantidos em gaiolas individuais

Ao iniciar este estudo medimos e o consumo de água e alimento durante uma semana. Inicialmente, o peso dos ratos variava de 270 g a 300 g, com média ( $\pm$  SEM)  $285 \pm 4,3$  g;  $n = 37$  (tab. 1). Neste período, o consumo hídrico foi  $34,42 \pm 0,72$  ml (tab. 3) e o alimentar  $22,42 \pm 0,7$  g (tab. 5), não diferindo entre os respectivos grupos. Este perfil de consumo foi mantido em todos os ratos que não receberam aloxana (S, SM, T e TM; figs 5 a 8) até o final da fase experimental.

Nos ratos que receberam a injeção de aloxana, já no dia seguinte, o peso havia diminuído para  $254,5 \pm 3,16$  g;  $n = 19$  (tab. 1). Na seqüência do período experimental (tratamento e/ou treinamento) todos ganharam peso e, ao final de 28 dias, eles pesavam  $290,4 \pm 1,74$  g ( $p < 0,001$ ), valor 17 % menor que os registrados no grupo controle ( $339,8 \pm 1,6$  g; figs 1 e 2 e tab. 1). Por outro lado, o consumo hídrico dos diabéticos aumentou (fig. 3 e 11) de  $47,86 \pm 2,55$  mL; logo após indução de diabetes, para  $148,6 \pm 1,73$  mL, na última semana. O consumo alimentar inicial foi de  $24,27 \pm 0,51$  g; enquanto na última semana foi de  $37,78 \pm 0,92$  g;  $p < 0,001$  (figs. 3, 4, 11 e 12 e tabs 3 e 5).

Nestes ratos, o tratamento com metformina e/ou o treinamento tiveram efeitos positivos, mostrando uma tendência de diminuição do consumo hídrico (fig. 11 e tab. 3). Diferença significativa só foi manifestada na última semana do período experimental.



entre o Grupo treinado e tratado com metformina e os demais diabéticos (vide fig. 11; tab. 3).

Quanto ao peso final, os grupos TD, TDM obtiveram 18 e 36 g de ganho ( $p < 0,05$ ; figs. 9 e 10 e tab. 1) e peso final superior a todos os demais grupos ( $p < 0,05$  vs SD;  $p < 0,01$  vs SDM e  $p < 0,001$  vs TD).

#### 4.1.2 Ratos mantidos em gaiola coletiva

Embora as medidas de consumo de água em gaiolas individuais tenham sido essenciais para estimar a ingestão individual de metformina, a maioria dos nossos dados e de outros pesquisadores tem sido obtidos de ratos mantidos em gaiolas coletivas.

Apesar disto não constituir o nosso objetivo inicial, decidimos comparar alguns parâmetros experimentais (evolução ponderal, ganho de peso e consumo hídrico) nos grupos Controle e Diabetes em gaiolas individuais com os seus respectivos grupos em gaiolas coletivas.

Os ratos do grupo controle mantidos em gaiola coletiva obtiveram, em média, ganho de peso maior ( $p < 0,002$ ) que aqueles dos grupos mantidos em gaiolas individuais, apesar de seus pesos terem sido iguais (tab. 1 e 2), apresentando peso final no grupo Controle (coletiva):  $347,4 \pm 1,0$  g e no grupo Controle (individual):  $330,6 \pm 3,29$  g. Entretanto, o consumo hídrico obtido por nestes grupos foi semelhante até o término da fase experimental (tabs. 3 e 4).

No grupo Diabetes mantidos em gaiola coletiva, os ratos obtiveram maior ganho de peso e peso final maior ( $p < 0,001$ ) do que aqueles mantidos em gaiola metabólica (tabs. 1 e 2; figs 9,10, 15 e 16). Além disso, o consumo hídrico de ratos mantidos em gaiola coletiva foi menor do que no grupo mantido em gaiola individual ( $112,6 \pm 6,94$  mL vs  $175,6 \pm 3,35$  mL;  $p < 0,001$ ; tabs 3 e 4).

A partir do próximo capítulo, serão analisados apenas os resultados dos ratos mantidos em gaiolas coletivas.

## **4.2 Insulina e parâmetros metabólicos de ratos mantidos em gaiolas coletivas**

### **4.2.1 Efeito da indução de diabetes por aloxana**

Ao final do experimento, os ratos diabéticos (grupo SD) apresentaram baixa concentração de insulina plasmática ( $1,28 \pm 0,16$  ng/mL) em relação ao grupo S ( $2,18 \pm 0,16$  ng/mL;  $p < 0,003$ ; fig. 18). Em decorrência disso a glicemia no grupo SD aumentou para  $435 \pm 15$  mg/dL enquanto no grupo S foi  $129 \pm 7$  mg/dL ( $p < 0,01$ ; fig. 17). Também as reservas de glicogênio foram afetadas pelo diabetes. No fígado a concentração diminuiu de  $3,16 \pm 0,18$  mg/100 mg no grupo S para  $1,69 \pm 0,22$  mg/100 mg no grupo SD ( $p < 0,001$ ; fig. 21) e no sóleo diminuiu de  $0,3 \pm 0,015$  mg/100 mg para  $0,21 \pm 0,008$  mg/100 mg ( $p < 0,001$ ; fig. 22) sem alterar as concentrações de glicogênio no gastrocnêmio (figura 23). Entretanto no grupo SD houve aumento ( $p < 0,05$ ; figura 24) do glicogênio do ventrículo, o que é característico dos diabéticos. Houve aumento também na concentração de ácidos graxos livres sendo  $0,60 \pm 0,04$  mMol/L no grupo SD e  $0,13 \pm 0,007$  mMol/L no grupo S ( $p < 0,0001$ ; fig. 19) e de triglicerídeos (grupo SD:  $232,5 \pm 12,6$  mg/dL vs grupo S:  $61,6 \pm 7$  mg/dL;  $p < 0,04$ ; fig. 20).

## **4.3 Efeitos da metformina em ratos normais sedentários e treinados**

### **4.3.1 Efeito da metformina em ratos normais sedentários**

O tratamento com metformina não modificou a glicemia e a concentração de insulina plasmática (figs. 25 e 26) em ratos do grupo SM. Entretanto, induziu aumento das reservas de glicogênio no fígado ( $4,52 \pm 0,16$  mg/100 mg vs  $3,16 \pm 0,18$  mg/100 mg;  $p < 0,05$ ; fig. 29) e no sóleo ( $0,38 \pm 0,005$  mg/100 mg vs  $0,3 \pm 0,015$  mg/100 mg;  $p < 0,01$ ; fig. 30). Não foram demonstradas diferenças quanto as concentrações de glicogênio no gastrocnêmio e ventrículo (figs. 31 e 32). Também não houve alteração

da concentração de ácidos graxos livres e as de triglicerídeos plasmáticos (figs 27 e 28).

#### **4.3.2 Efeito do treinamento em ratos normais**

O treinamento não alterou a concentração plasmática de glicose (fig. 25), porém diminuiu a insulina plasmática de  $2,18 \pm 0,16$  ng/mL no grupo S para  $1,13 \pm 0,08$  ng/mL ( $p < 0,001$ ; fig. 26) no grupo T. O treinamento também proporcionou aumento das reservas de glicogênio nos tecidos estudados (figs. 29, 30, 31 e 32), sendo no fígado de  $3,16 \pm 0,18$  mg/100 mg no grupo S para  $5,35 \pm 0,23$  mg/100 mg no grupo T ( $p < 0,001$ ); no sôleo de  $0,3 \pm 0,015$  mg/100 mg para  $0,52 \pm 0,01$  mg/100 mg ( $p < 0,001$ ), no gastrocnêmio de  $0,35 \pm 0,02$  mg/100 mg para  $0,66 \pm 0,02$  mg/100 mg ( $p < 0,001$ ) e no ventrículo de  $0,19 \pm 0,007$  mg/100 mg para  $0,37 \pm 0,007$  mg/100 mg ( $p < 0,001$ ).

As concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres foram menores nos treinados do que nos sedentários ( $0,07 \pm 0,004$  mMol/L vs  $0,13 \pm 0,007$  mMol/L; fig. 27), enquanto as dos triglicerídeos não foram modificadas (fig. 28).

#### **4.3.3 Efeito da associação: metformina e treinamento em ratos normais**

Em ratos tratados e treinados (grupo TM) não houve alteração na glicose plasmática (fig. 25), mas houve aumento da concentração plasmática de insulina ( $1,13 \pm 0,08$  ng/mL vs  $1,74 \pm 0,08$  ng/mL;  $p < 0,05$ ; fig. 26). Em relação aos lipídeos, houve diminuição na concentração de ácidos graxos livres ( $0,05 \pm 0,008$  mMol/L vs  $0,13 \pm 0,007$  mMol/L,  $p < 0,001$ ; fig. 27) e de triglicerídeos plasmáticos do grupo TM ( $54,5 \pm 5,2$  mg/dL vs  $79,5 \pm 5,5$  mg/dL;  $p < 0,05$ ; fig. 28).

Quanto ao glicogênio, as figuras 29, 30 e 32 mostram que houve aumento no fígado ( $7,79 \pm 0,55$  mg/100 mg vs  $5,35 \pm 0,23$  mg/100 mg;  $p < 0,001$ ); no sôleo ( $0,64 \pm 0,016$  mg/100 mg vs  $0,52 \pm 0,01$  mg/100 mg,  $p < 0,001$ ) e no ventrículo ( $0,74 \pm 0,04$

mg/100 mg vs  $0,37 \pm 0,007$  mg/100 mg;  $p < 0,001$ ) e diminuição no gastrocnêmio ( $0,55 \pm 0,014$  mg/100 mg vs  $0,66 \pm 0,02$  mg/100 mg;  $p < 0,001$ ; fig. 31).

#### **4.4 Efeitos do tratamento com metformina em ratos diabéticos sedentários e treinados**

##### **4.4.1 Efeito do tratamento com metformina em ratos diabéticos**

Após o tratamento com metformina, houve diminuição nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres ( $0,23 \pm 0,01$  mMol/L vs  $0,6 \pm 0,04$  mMol/L;  $p < 0,001$ ; fig.35), de triglicerídeos ( $178,5 \pm 18$  mg/dL vs  $232,5 \pm 12,6$  mg/dL;  $p < 0,05$ ; fig. 6) e de glicose ( $230 \pm 20$  mg/dL vs  $435 \pm 15$  mg/dL;  $p < 0,001$ ; fig. 33) sem alterar os níveis de insulina plasmática (fig. 34).

Por outro lado o tratamento induziu aumento de glicogênio no fígado ( $3,53 \pm 0,24$  mg/100 mg vs  $1,69 \pm 0,22$  mg/100 mg;  $p < 0,001$ ; fig. 37) e nos músculos sóleo ( $0,42 \pm 0,03$  mg/100 mg vs  $0,21 \pm 0,008$  mg/100 mg;  $p < 0,01$ ; fig. 38), gastrocnêmio ( $0,46 \pm 0,03$  mg/100 mg vs  $0,33 \pm 0,02$  mg/100 mg;  $p < 0,01$ ; fig. 39) sem alterar as concentrações no ventrículo (fig. 40).

##### **4.4.2 Efeito do treinamento sobre ratos diabéticos**

O treinamento foi eficiente, baixando a glicemia em ratos diabéticos (grupo TD) (de  $435 \pm 15$  mg/dL para  $143 \pm 8,1$  mg/dL;  $p < 0,001$ ; fig. 33), assim como, a concentração de ácidos graxos livres (de  $0,6 \pm 0,04$  mMol/L para  $0,42 \pm 0,032$  mMol/L; fig. 35) e triglicerídeos plasmáticos (de  $232,5 \pm 12,6$  mg/dL para  $143 \pm 8,1$  mg/dL;  $p < 0,001$ ; fig. 36), sem alterar a concentração de insulina plasmática (fig. 34).

Por outro lado, o treinamento aumentou o conteúdo de glicogênio hepático ( $3,36 \pm 0,16$  mg/100 mg; fig. 37) e no gastrocnêmio ( $0,53 \pm 0,03$  mg/100 mg; fig. 39) a níveis equivalentes ao normal.

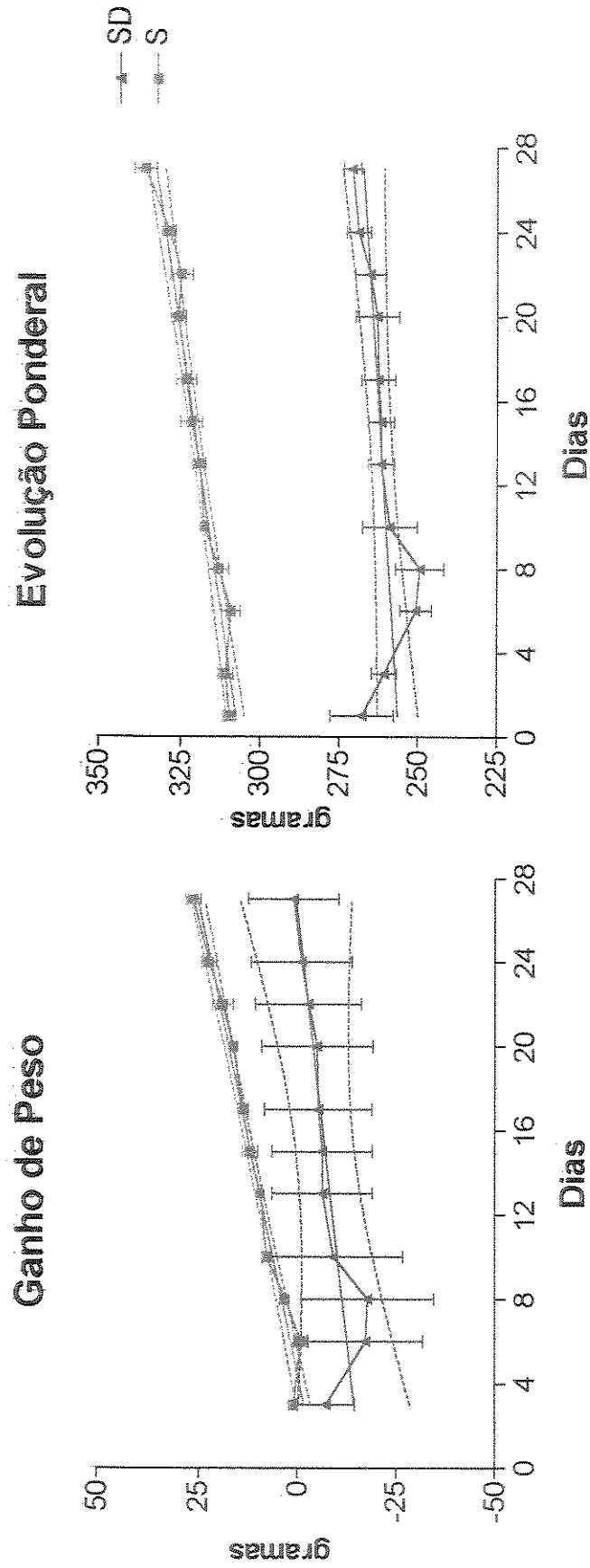
#### 4.4.3 Efeito da associação: metformina e treinamento em ratos diabéticos

Ambas as abordagens, treinamento e tratamento com metformina, aplicadas simultaneamente, resultaram em grande redução da glicemia de ratos do grupo TDM ( $435 \pm 15$  mg/dL vs;  $138 \pm 19$  mg/dL  $p < 0,001$ ; fig. 33) a níveis próximos do grupo não diabético ( $129 \pm 7$  mg/dL), porém sem diferir dos demais grupos.

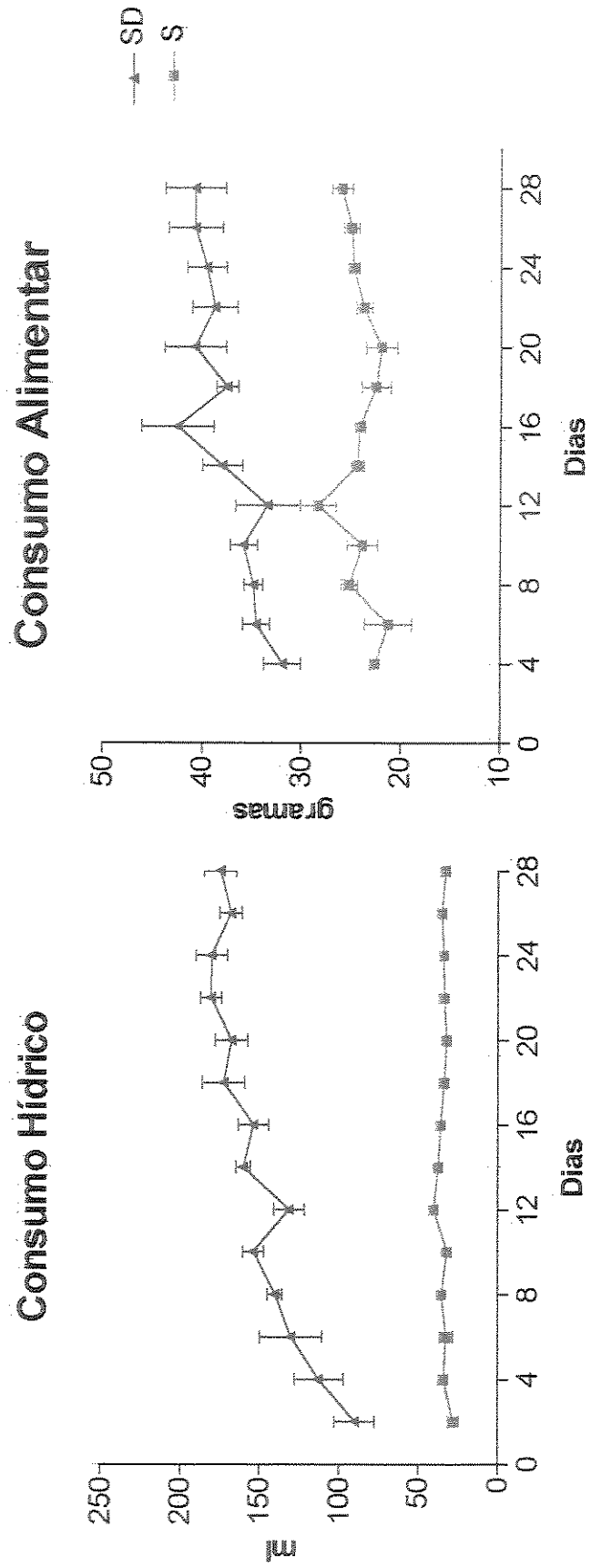
Por outro lado, a associação promoveu aumento do conteúdo de glicogênio no fígado em relação a ambos os grupos, DT e SDM ( $6,48 \pm 0,34$  mg/100 mg vs  $3,36 \pm 0,16$  mg/100 mg  $p < 0,001$  e vs  $3,53 \pm 0,24$  mg/100 mg  $p < 0,001$ ; respectivamente, fig. 37). No ventrículo, houve interação entre os tratamentos, de modo que diferiu de todos os grupos ( $0,28 \pm 0,024$  mg/100 mg vs TD,  $0,15 \pm 0,014$  mg/100 mg;  $p < 0,01$ ; vs SDM,  $0,40 \pm 0,02$  mg/100 mg,  $p < 0,05$ ; vs SD,  $0,33 \pm 0,07$  mg/100 mg  $p < 0,05$ ; fig. 40). Por outro lado, a associação não afetou a concentração plasmática de insulina.

Quanto aos parâmetros lipídicos do plasma, a associação não afetou a concentração de ácidos graxos livres, porém diminuiu os triglicerídeos, diferindo de todos os demais grupos ( $87,8 \pm 7,5$  mg/dL vs TD,  $143 \pm 8,1$  mg/dL; vs SDM,  $178 \pm 18,0$  mg/dL; vs SD,  $232 \pm 12,5$  mg/dL,  $p < 0,01$ ).

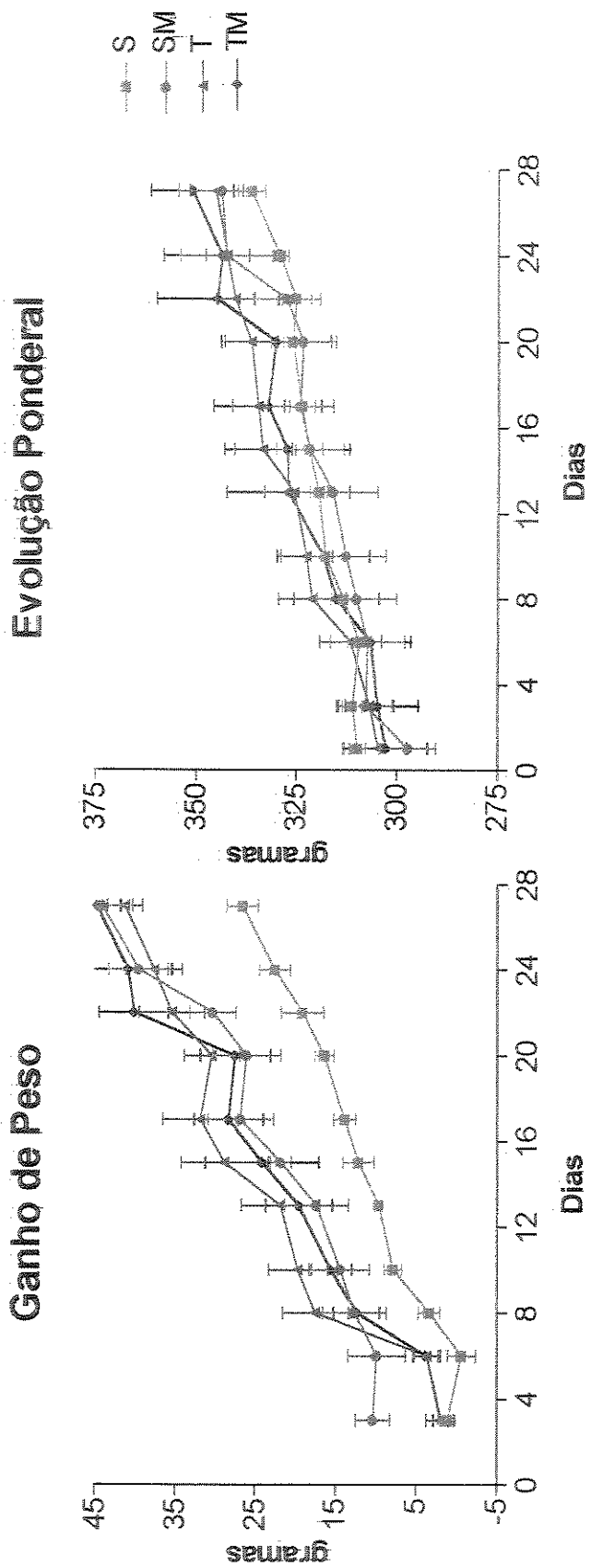
**FIGURAS 1 e 2:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) em ratos diabéticos e normais sedentários, mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos Controlé e Diabètes. Valores de  $Y+X$  para evolução ponderal  $Y(S) = 307 + 0,97; Y(SD) = 256,2 + 0,43$ ; Valores de  $Y+X$  para ganho de peso:  $Y(S) = -4,61 + 1,11; Y(D) = -15,94 + 0,61$ .



**FIGURAS 3 E 4:** Avaliação do consumo hídrico (ml) e alimentar (g) em ratos diabéticos e normais sedentários durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos  $\square$  e  $\blacktriangle$ .

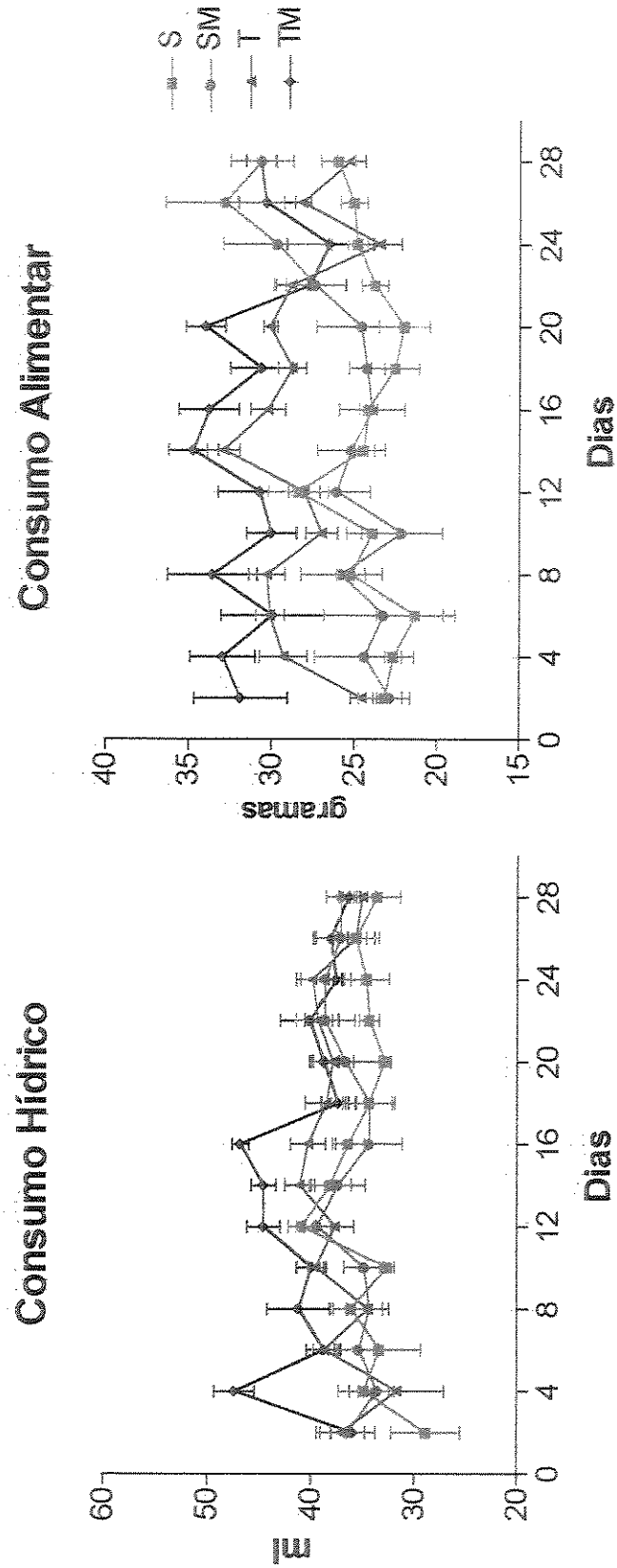


**FIGURAS 5 e 6:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) de ratos normais mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos S e SM e  $n = 5$  para os grupos T e TM. Os valores de  $Y+X$  para evolução ponderal  $Y(S) = 307 + 0,97$ ;  $Y(SM) = 297,6 + 4,8$ ;  $Y(T) = 304,8 + 1,63$ ;  $Y(TM) = 299,2 + 6,67$ ; Valores de  $Y+X$  para ganho de peso.  $Y(S) = -4,61 + 1,11$ ;  $Y(SM) = 1,53 + 1,44$ ;  $Y(T) = 0,54 + 1,61$ ;  $Y(TM) = 4,14 + 1,85$ .

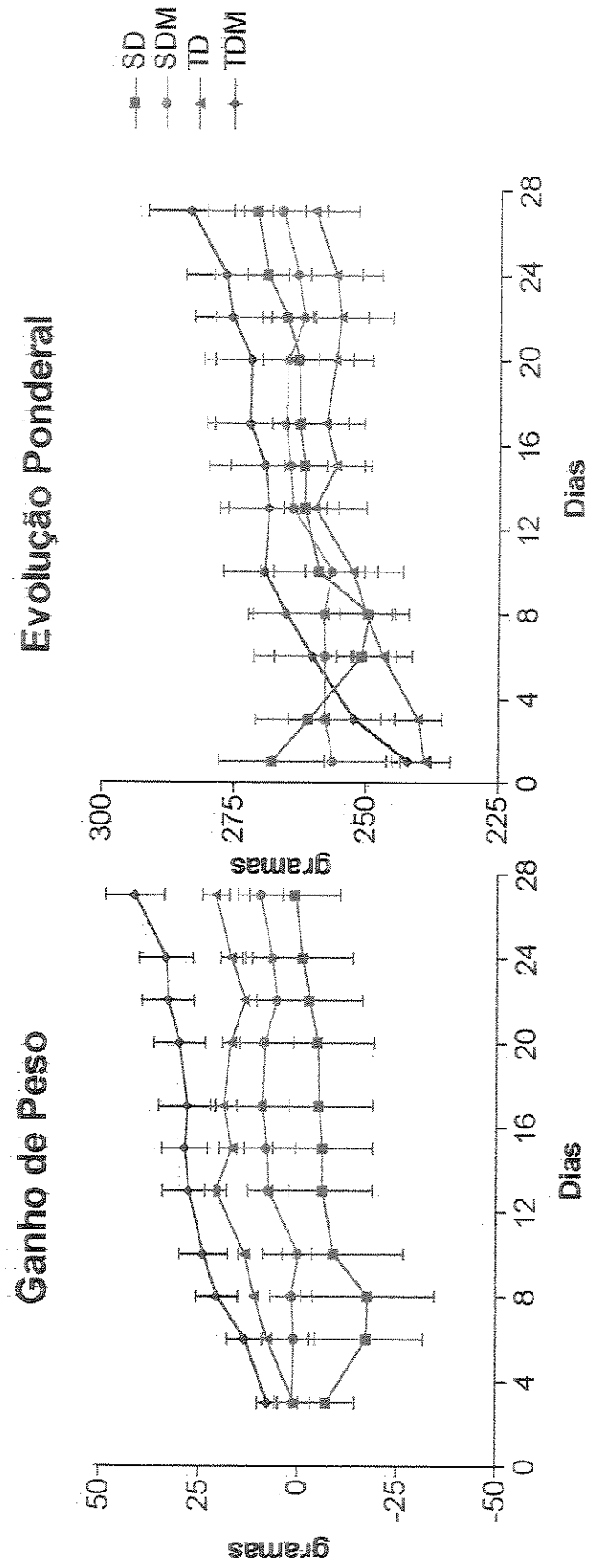




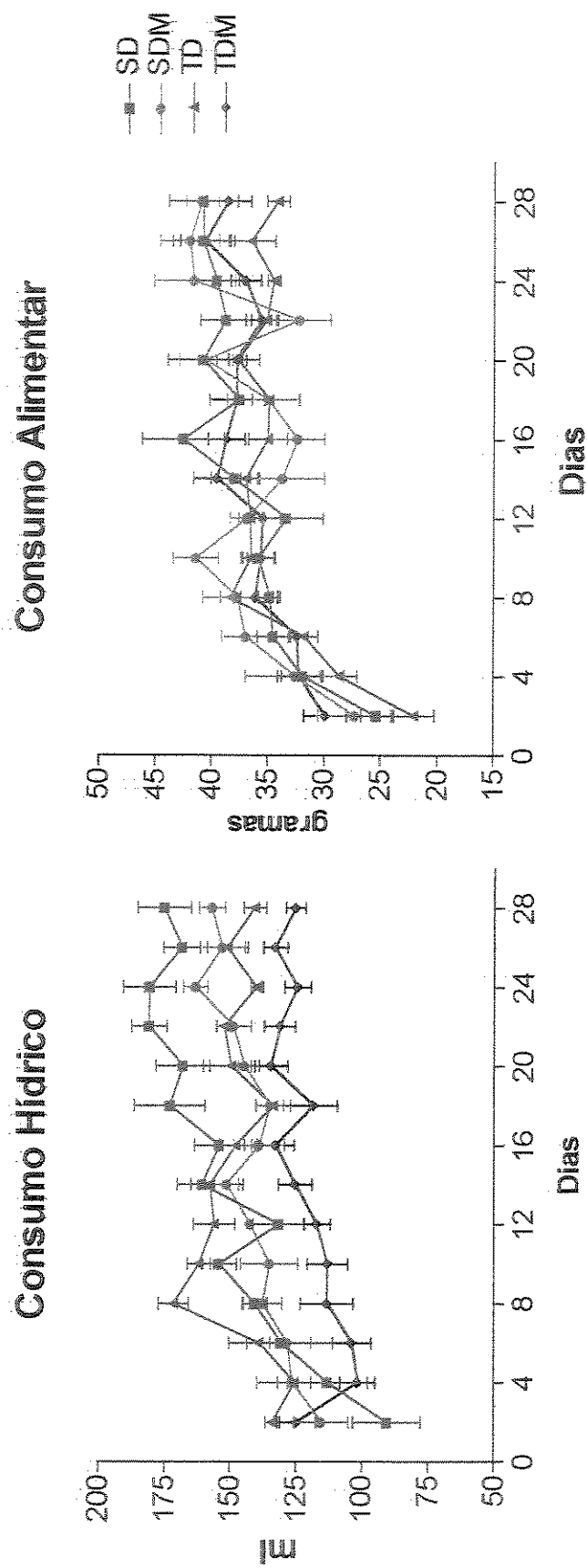
**FIGURAS 7 E 8:** Avaliação do consumo hídrico (ml) e consumo alimentar (g) em ratos normais mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos S e SM e  $n = 5$  para os grupos T e TM.



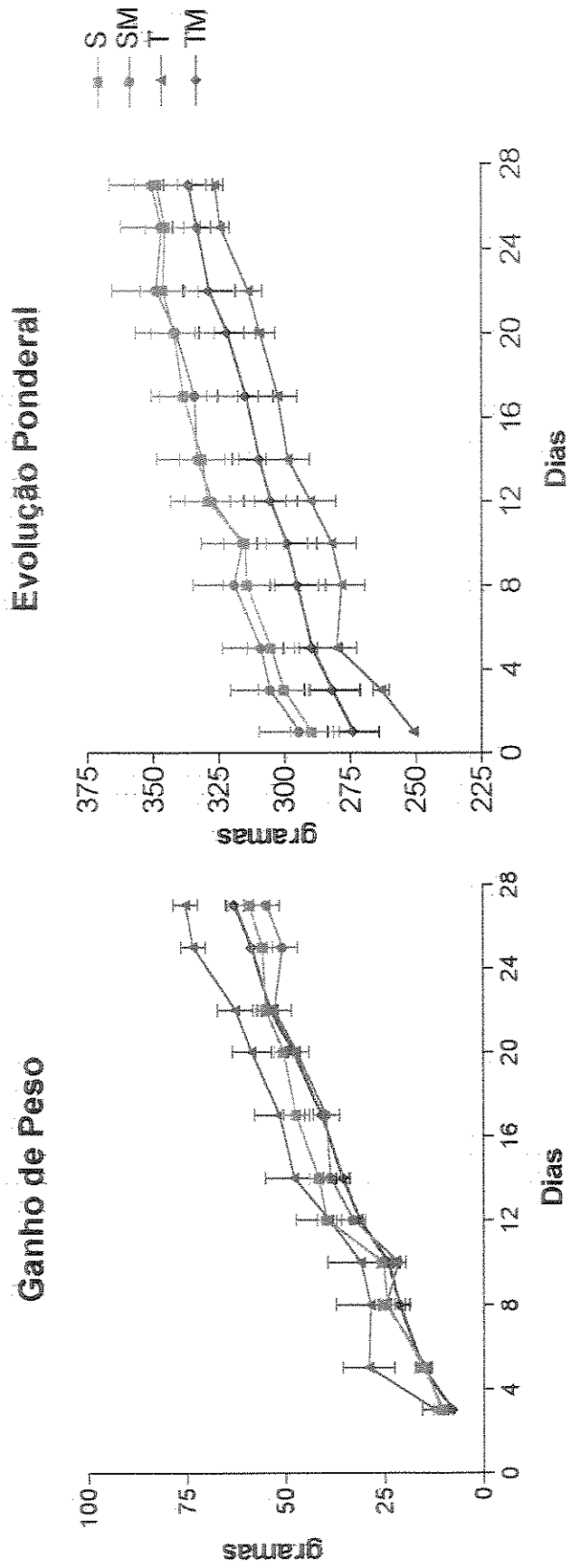
**FIGURAS 9 e 10:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) em ratos diabéticos (SD, SDM, TD, TDM) mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos SD, SDM e TD e  $n = 7$  para o grupo TDM. Valores de  $Y + X$  para evolução ponderal  $Y(\text{SD}) = 256,2 + 0,43$ ;  $Y(\text{SDM}) = 256,4 + 0,38$ ;  $Y(\text{TD}) = 242,7 + 0,71$ ;  $Y(\text{TDM}) = 250,2 + 1,24$ ; Valores de  $Y + X$  para ganho de peso:  $Y(\text{SD}) = -15,94 + 0,61$ ;  $Y(\text{SDM}) = -0,034 + 0,37$ ;  $Y(\text{TD}) = 5,84 + 0,58$ ;  $Y(\text{TDM}) = 8,69 + 1,16$ .



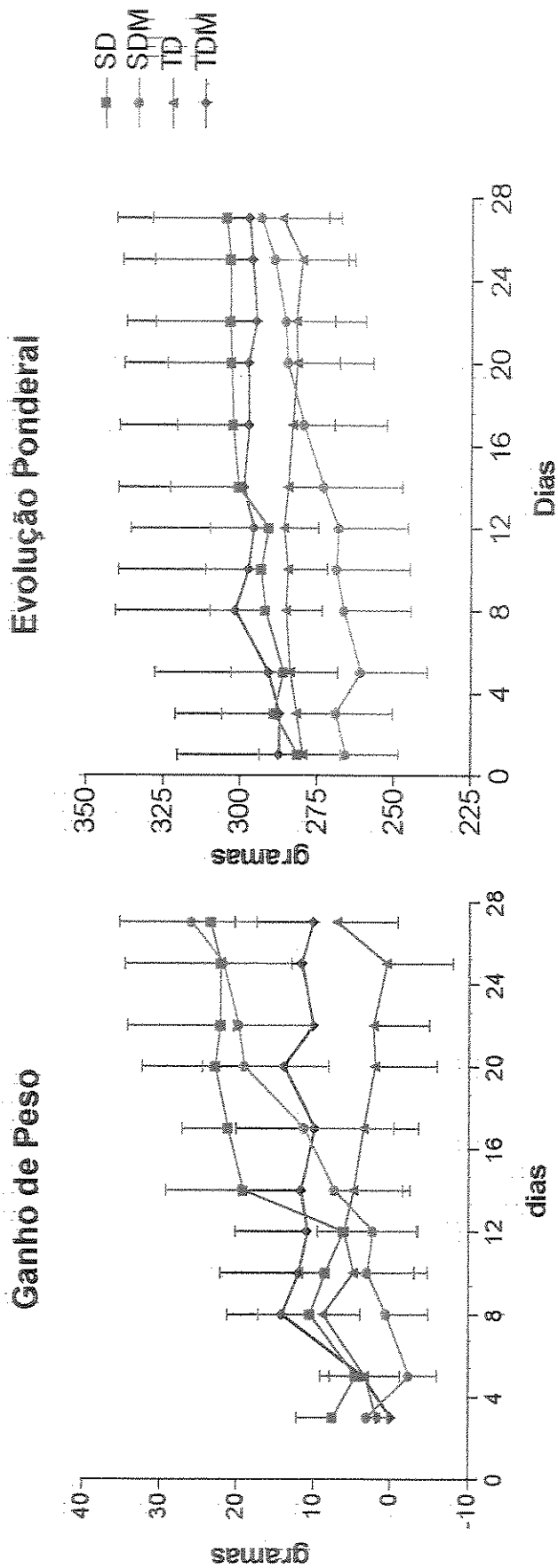
**FIGURAS 11 e 12:** Avaliação do consumo hídrico e alimentar em ratos diabéticos (SD, SDM, TD, TDM) mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos SD, SDM e TD e  $n = 7$  para o grupo TDM.



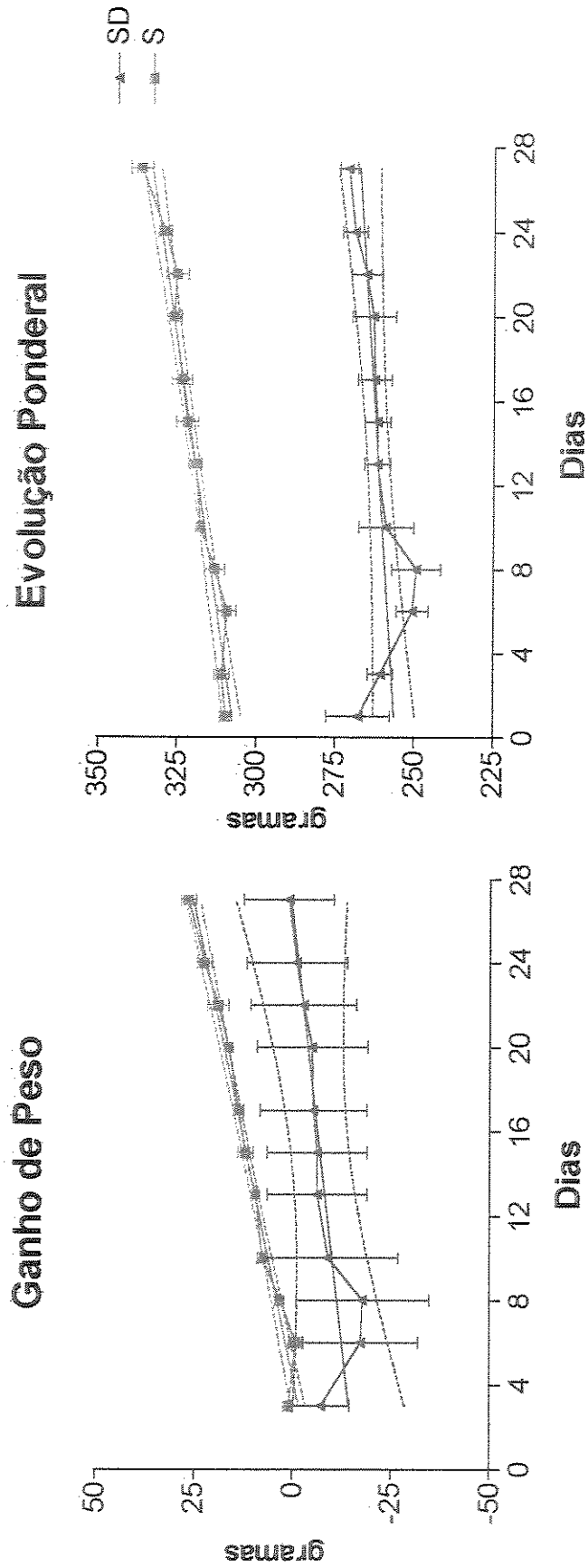
**FIGURAS 13 e 14:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) em ratos normais (S, SM, T, TM) mantidos em gaiola coletiva durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$  para os grupos C e CM;  $n = 4$  para o grupo T;  $n = 5$  para o grupo TM. Valores de Y + X para evolução ponderal: Y(S) =  $295,1 + 2,26$ ; Y(SM) =  $289,1 + 2,1$ ; Y(T) =  $257,2 + 2,67$ ; Y(TM) =  $275,5 + 2,35$ ; Valores de Y + X para ganho de peso: Y(S) =  $-8,13 + 2,07$ ; Y(SM) =  $7,51 + 1,89$ ; Y(T) =  $9,77 + 2,48$ ; Y(TM) =  $3,03 + 1,13$



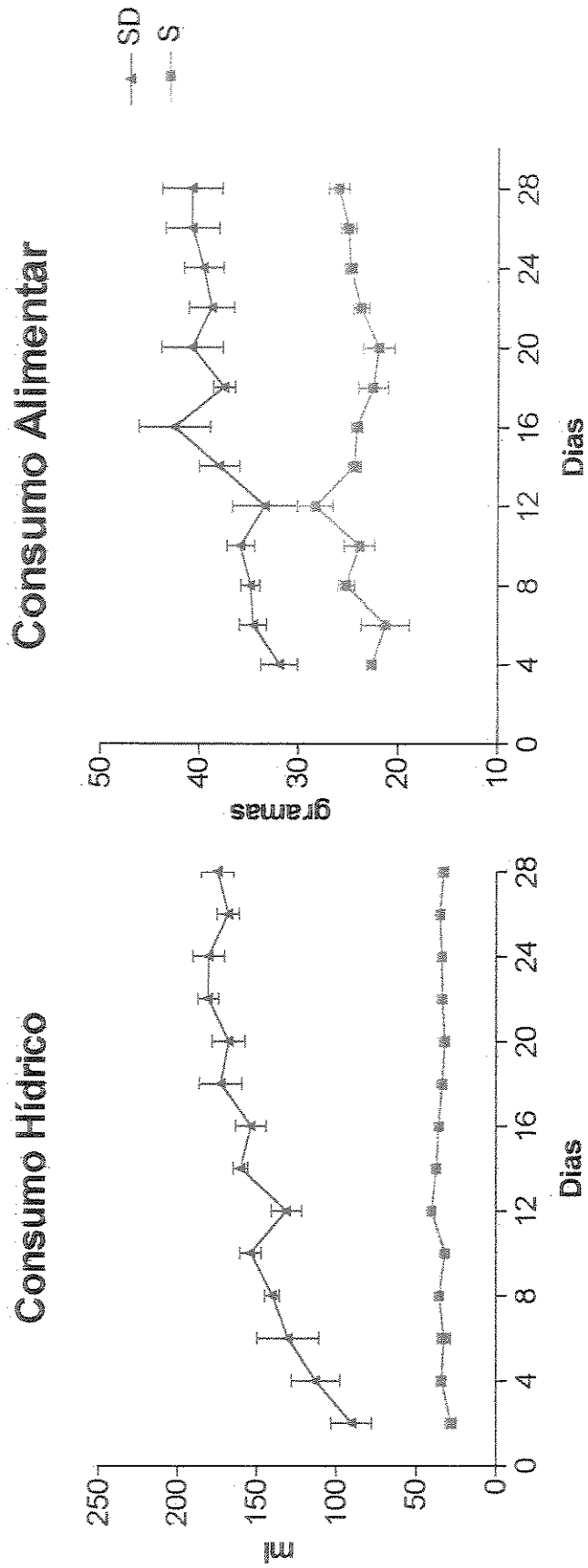
**FIGURAS 15 e 16:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) em ratos diabéticos (SD, SDM, TD, TDM) mantidos em gaiola coletiva durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M., n = 3 para o grupo SD, n = 4 para o grupo SDM, n = 6 para os grupos TD e TDM. Valores de Y + X para evolução ponderal: Y(SD) = 284,2 + 0,88; Y(SDM) = 259,8 + 1,17; Y(TD) = 283,0 + 0,047; Y(TDM) = 291,4 + 0,3; Valores de Y + X para ganho de peso: Y(SD) = 2,74 + 0,86; Y(SDM) = -7,02 + 1,17; Y(TD) = 5,01 + 0,05; Y(TDM) = 5,8 + 0,28.



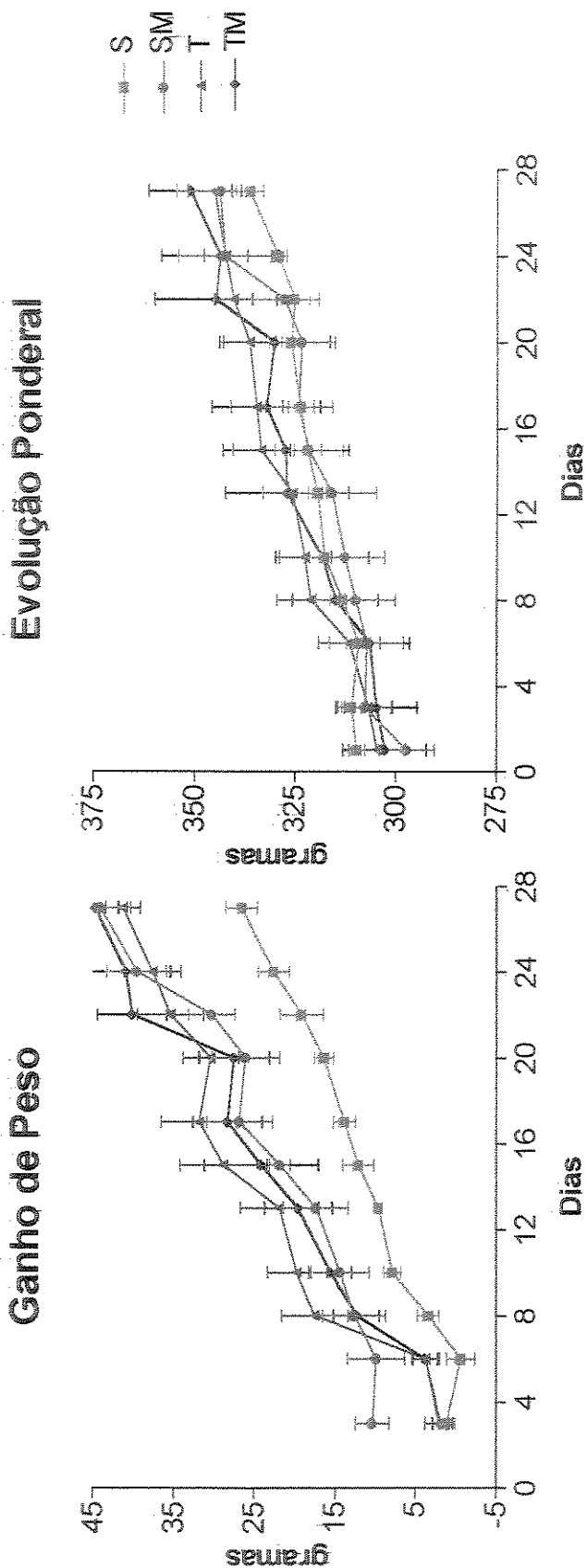
**FIGURAS 1 e 2:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) em ratos diabéticos e normais sedentários mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos Controle e Diabete. Valores de  $Y+X$  para evolução ponderal  $Y(S) = 307 + 0,97; Y(SD) = 256,2 + 0,43$ ; Valores de  $Y+X$  para ganho de peso:  $Y(S) = -4,61 + 1,11$ ;  $Y(D) = -15,94 + 0,61$ .



**FIGURAS 3 E 4:** Avaliação do consumo hídrico (ml) e alimentar (g) em ratos diabéticos e normais sedentários durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos  $\square$  e  $\triangle$ .

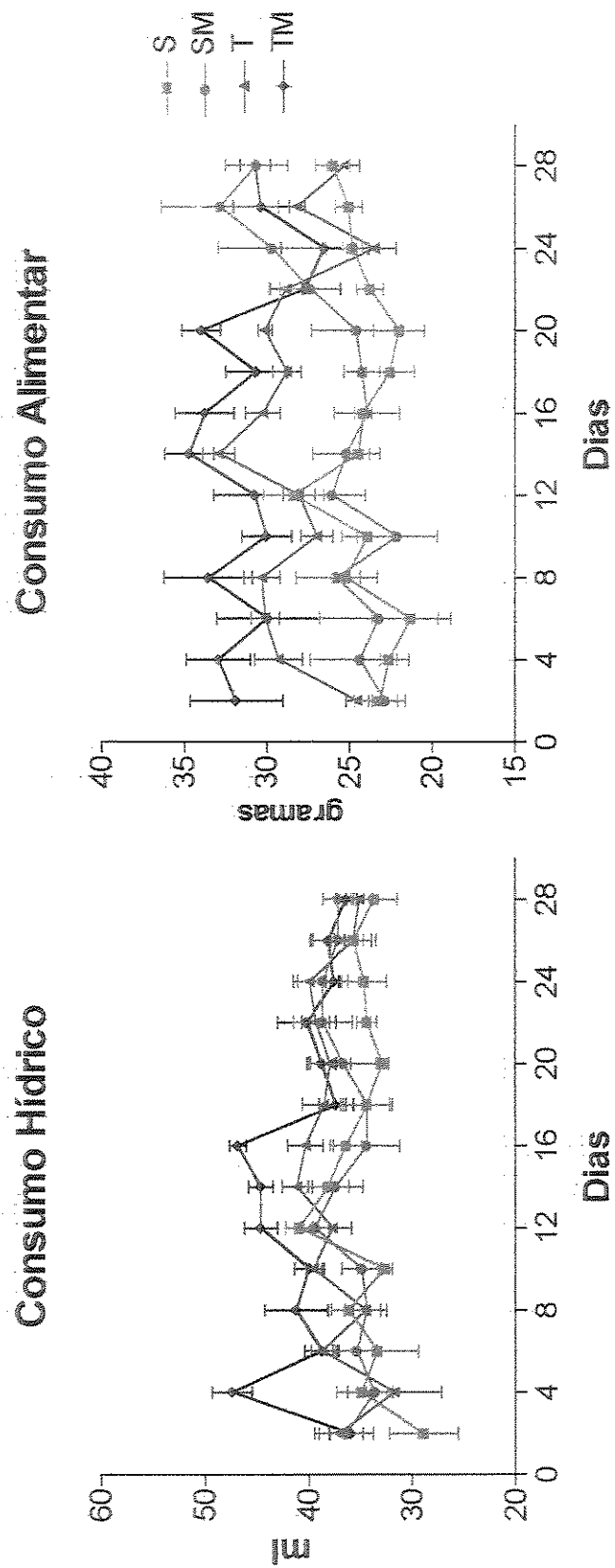


**FIGURAS 5 e 6:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) de ratos normais mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos S e SM e  $n = 5$  para os grupos T e TM. Os valores de  $Y+X$  para evolução ponderal  $Y(S) = 307 + 0,97$ ;  $Y(SM) = 297,6 + 4,8$ ;  $Y(T) = 304,8 + 1,63$ ;  $Y(TM) = 299,2 + 6,67$ ; Valores de  $Y+X$  para ganho de peso.  $Y(S) = -4,61 + 1,11$ ;  $Y(SM) = 1,53 + 1,44$ ;  $Y(T) = 0,54 + 1,61$ ;  $Y(TM) = 4,14 + 1,85$ .

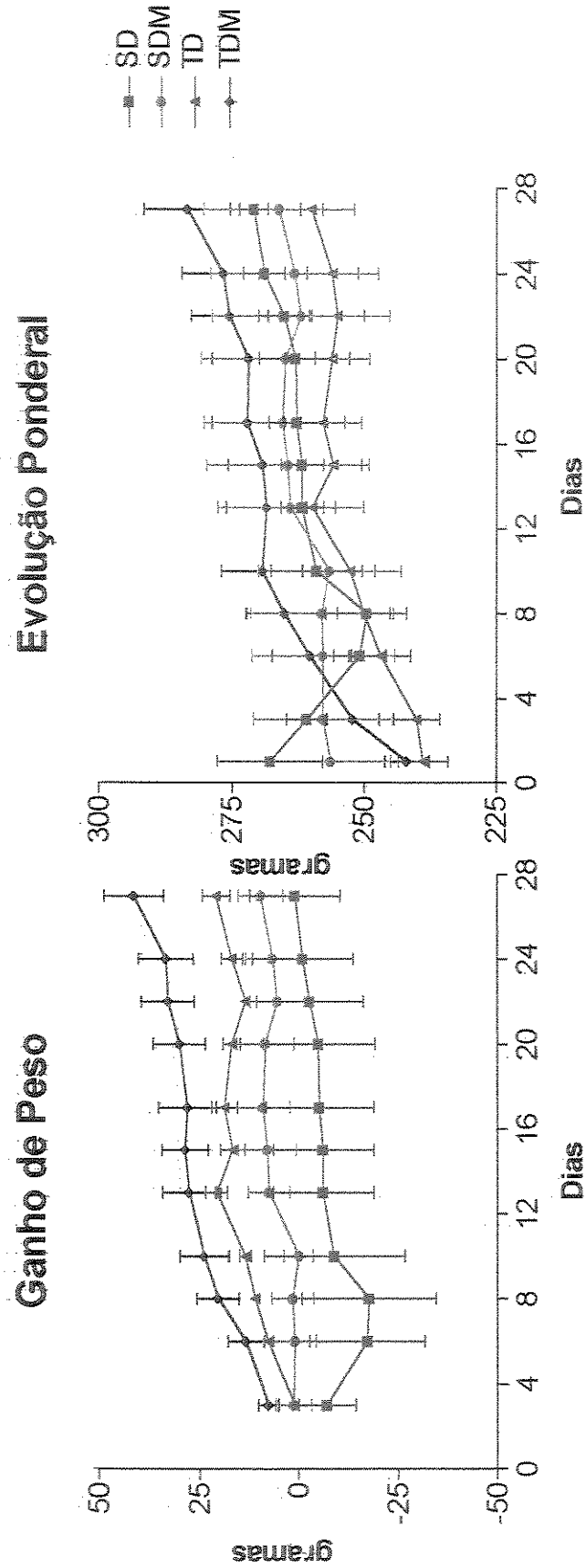




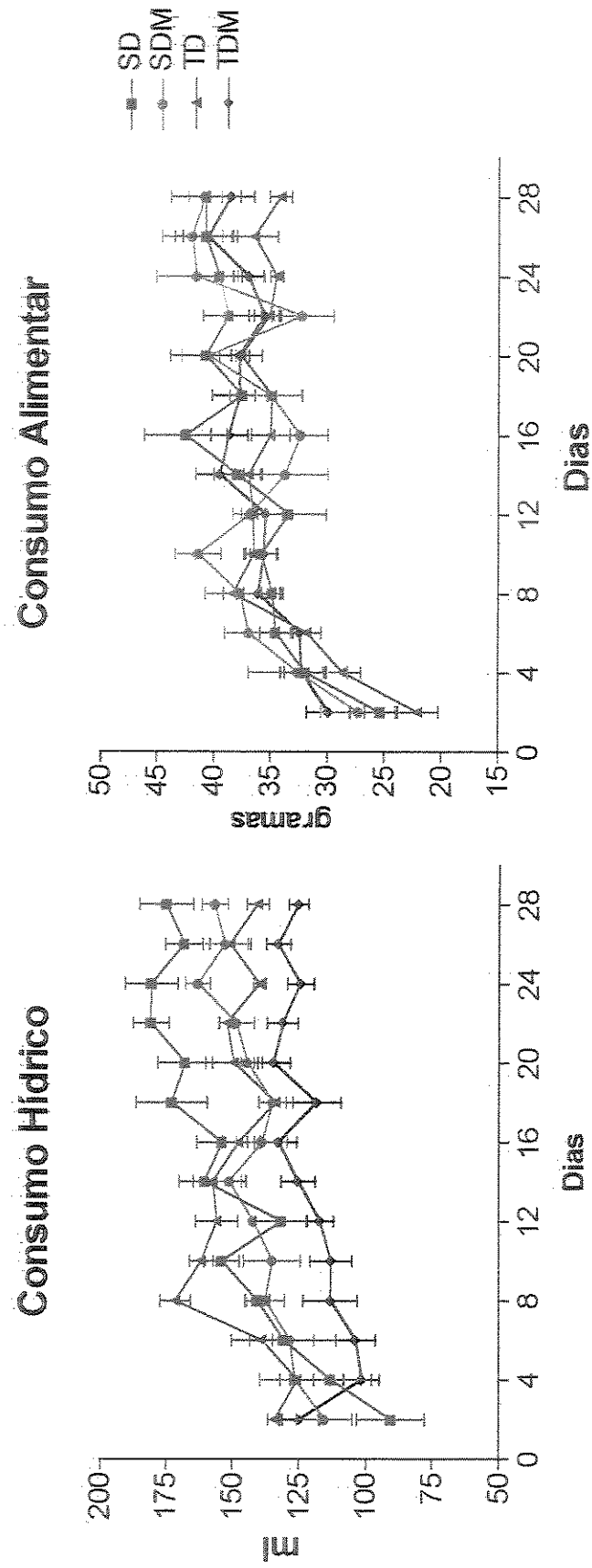
**FIGURAS 7 E 8:** Avaliação do consumo hídrico (ml) e consumo alimentar (g) em ratos normais mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M., n = 4 para os grupos S e SM e n = 5 para os grupos T e TM.



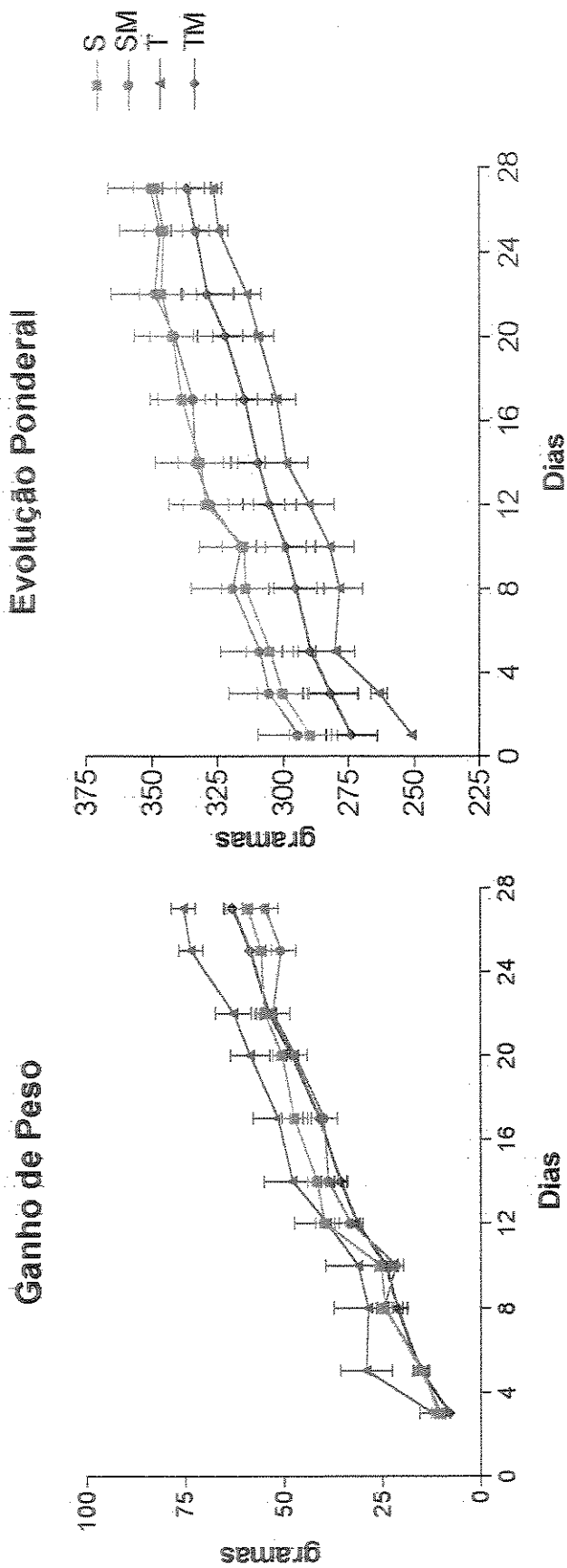
**FIGURAS 9 e 10:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) em ratos diabéticos (SD, SDM, TD, TDM) mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos SD, SDM e TD e  $n = 7$  para o grupo TDM. Valores de  $Y + X$  para evolução ponderal  $Y(SD) = 256,2 + 0,43$ ;  $Y(SDM) = 256,4 + 0,38$ ;  $Y(TD) = 242,7 + 0,71$ ;  $Y(TDM) = 250,2 + 1,24$ ; Valores de  $Y + X$  para ganho de peso:  $Y(SD) = -15,94 + 0,61$ ;  $Y(SDM) = -0,034 + 0,37$ ;  $Y(TD) = 5,84 + 0,58$ ;  $Y(TDM) = 8,69 + 1,16$ .



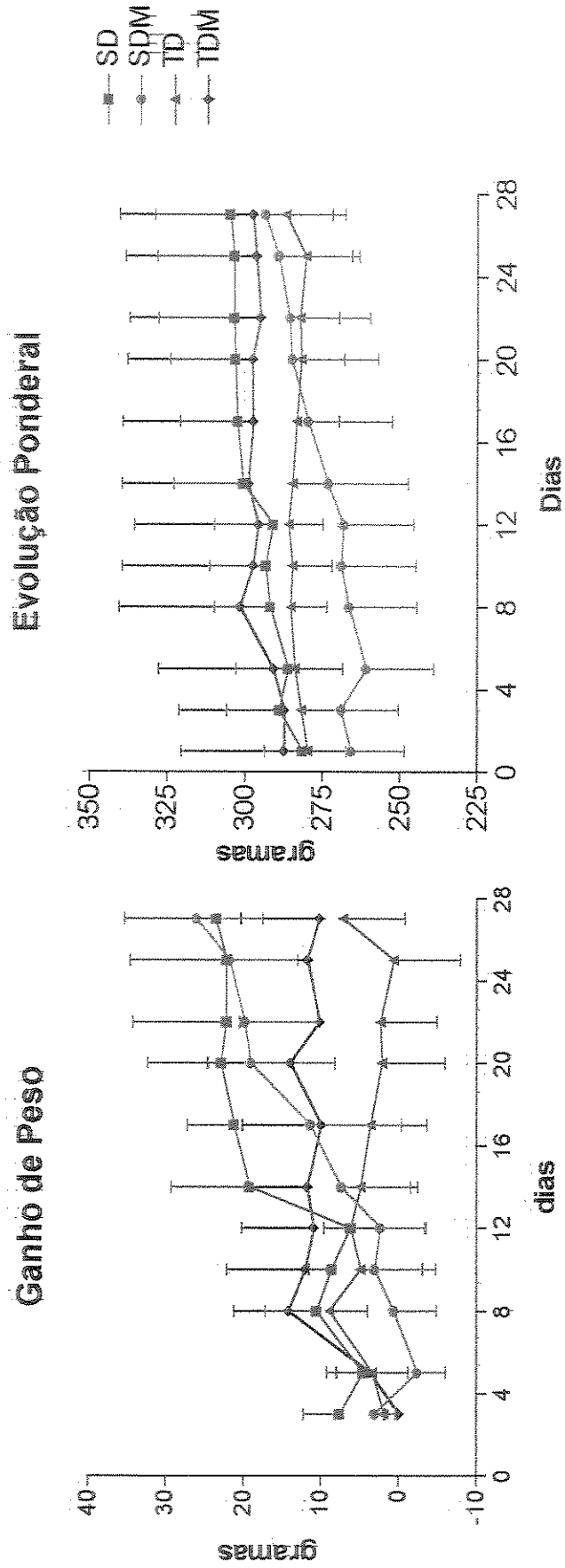
**FIGURAS 11 e 12:** Avaliação do consumo hídrico e alimentar em ratos diabéticos (SD, SDM, TD, TDM) mantidos em gaiolas individuais durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 4$  para os grupos SD, SDM e TD e  $n = 7$  para o grupo TDM.



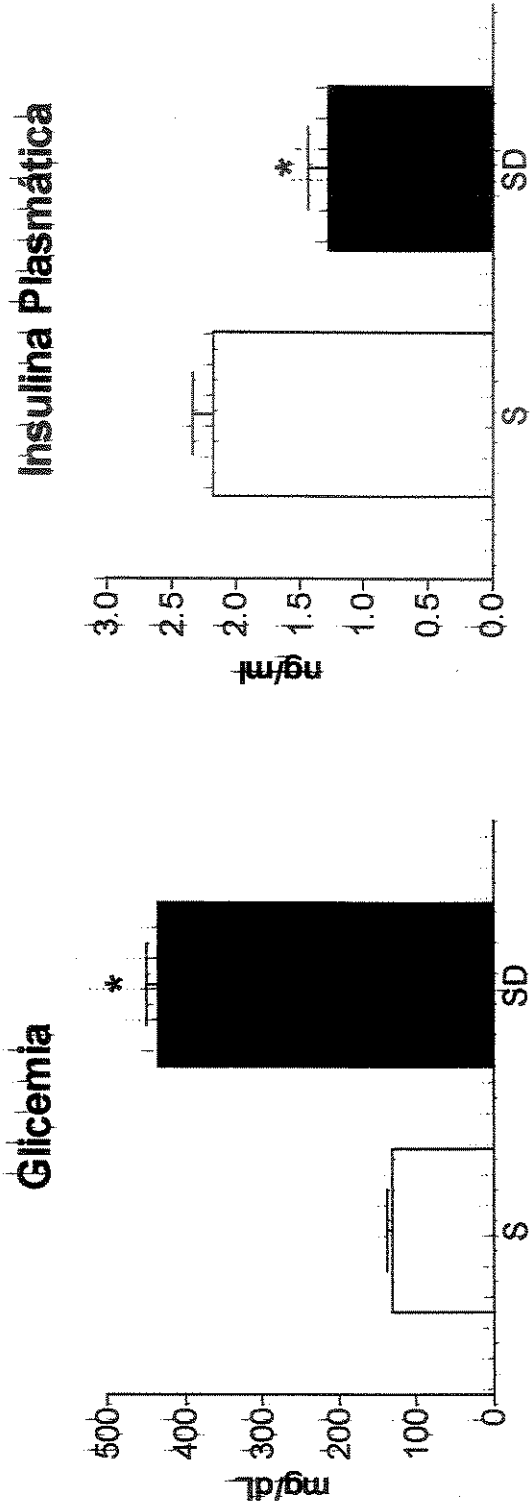
**FIGURAS 13 e 14:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) em ratos normais (S, SM, T, TM) mantidos em gaiola coletiva durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$  para os grupos C e CM;  $n = 4$  para o grupo T;  $n = 5$  para o grupo TM. Valores de Y + X para evolução ponderal: Y(S) = 295,1 + 2,26; Y(SM) = 299,1 + 2,1; Y(T) = 257,2 + 2,67; Y(TM) = 275,5 + 2,35; Valores de Y + X para ganho de peso: Y(S) = -8,13 + 2,07; Y(SM) = 7,51 + 1,89; Y(T) = 9,77 + 2,48; Y(TM) = 3,03 + 1,13



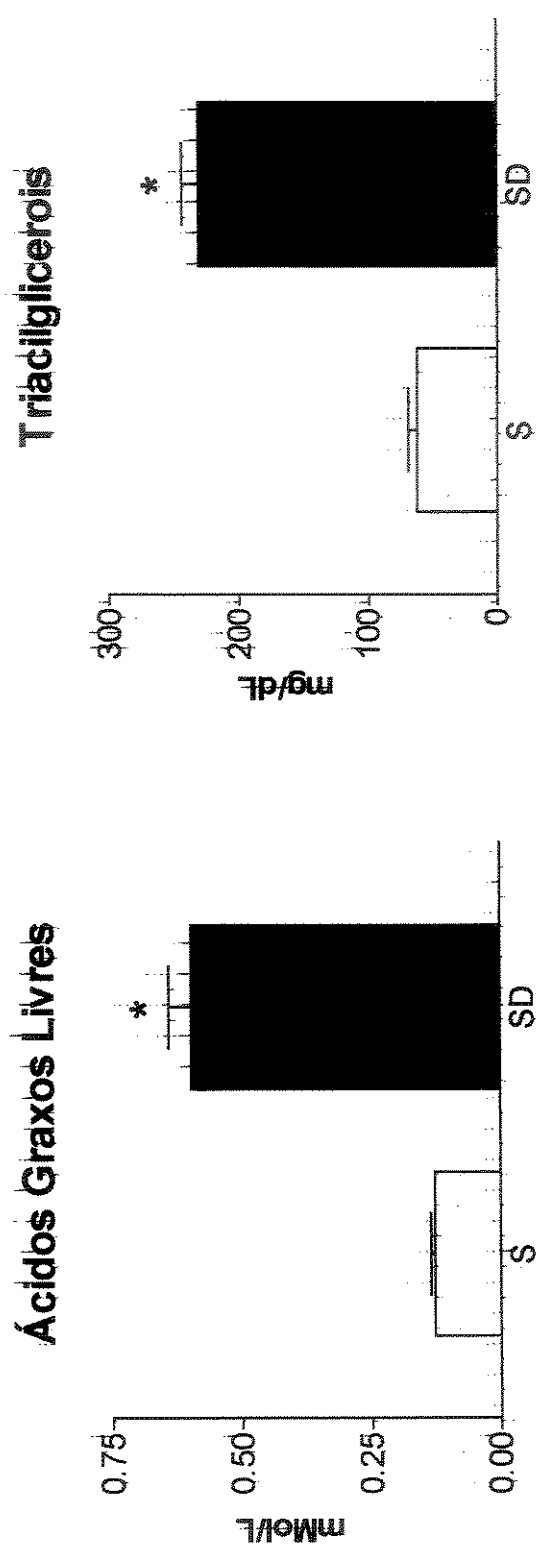
**FIGURAS 15 e 16:** Evolução ponderal e curva de ganho de peso (gramas) em ratos diabéticos (SD, SDM, TD, TDM) mantidos em gaiola coletiva durante período experimental. Os valores correspondem às médias  $\pm$  S.E.M., n = 3 para o grupo SD, n = 4 para o grupo SDM, n = 6 para os grupos TD e TDM. Valores de Y + X para evolução ponderal: Y(SD) = 284,2 + 0,88; Y(SDM) = 259,8 + 1,17; Y(TD) = 283,0 + 0,047; Y(TDM) = 291,4 + 0,3; Valores de Y + X para ganho de peso: Y(SD) = -7,02 + 1,17; Y(SDM) = 2,74 + 0,86; Y(TD) = 5,01 + 0,05; Y (TDM) = 5,8 + 0,28.



**Figuras 17 e 18:** Avaliação sobre a glicemia (mg/dL) e a insulina plasmática (ng/ml) de ratos normais e diabéticos mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6, \* P < 0,05 vs S.

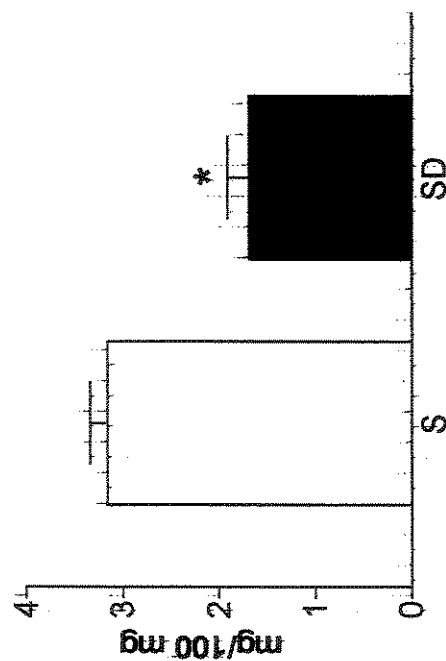


**Figuras 19 e 20:** Avaliação sobre a concentração de ácidos graxos livres (mMol/L) e triacilgliceróis (mg/dL) de ratos normais e diabéticos mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. Os valores correspondem às médias S.E.M.,  $n = 6$ ; \*  $p < 0,05$  vs S.

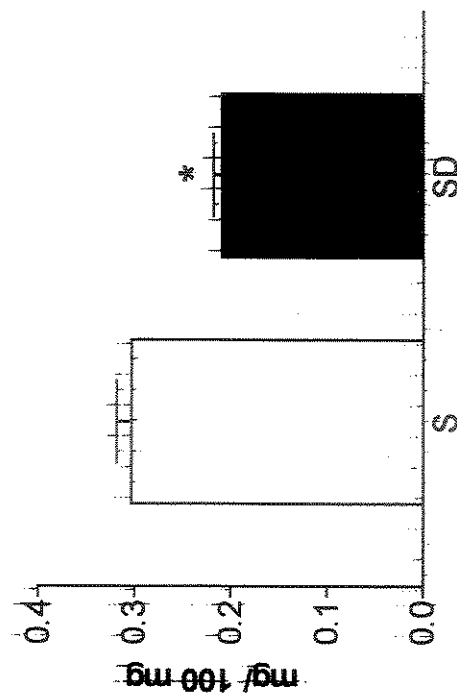


**Figuras 21 e 22:** Avaliação sobre a concentração de glicogênio no fígado e no músculo sóleo (mg/100 mg) de ratos normais e diabéticos mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. Os valores correspondem às médias S.E.M.,  $n = 6$ , \*  $p < 0,05$  vs \$.

### Glicogênio Hepático

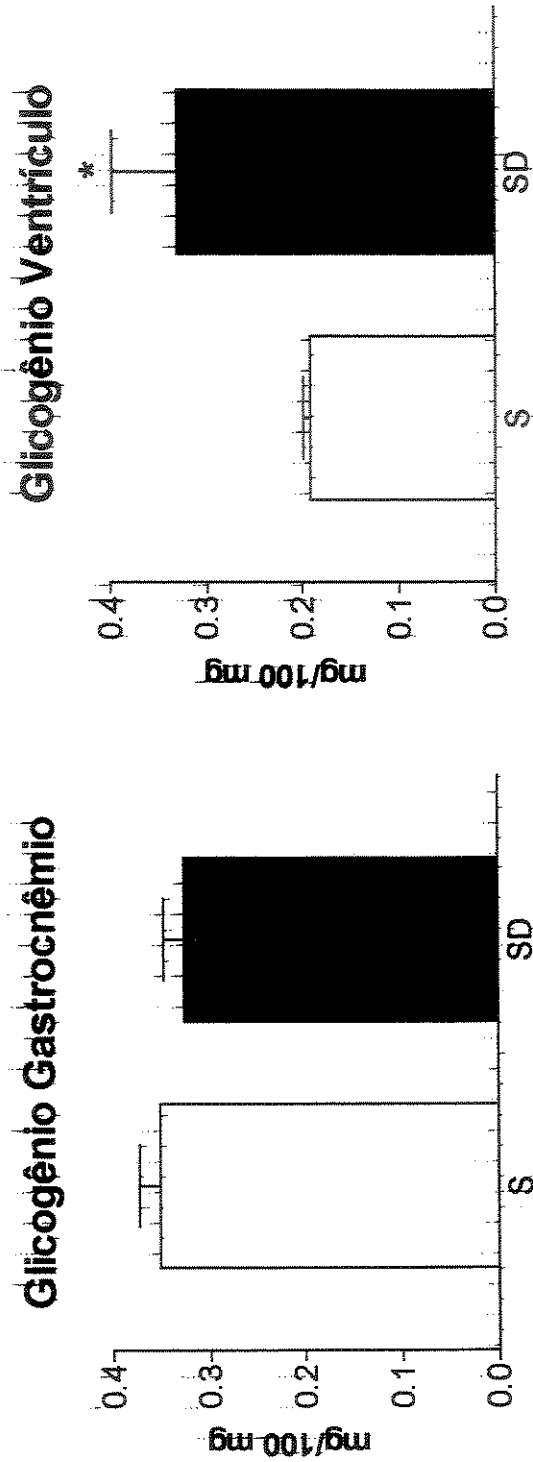


### Glicogênio Sóleo



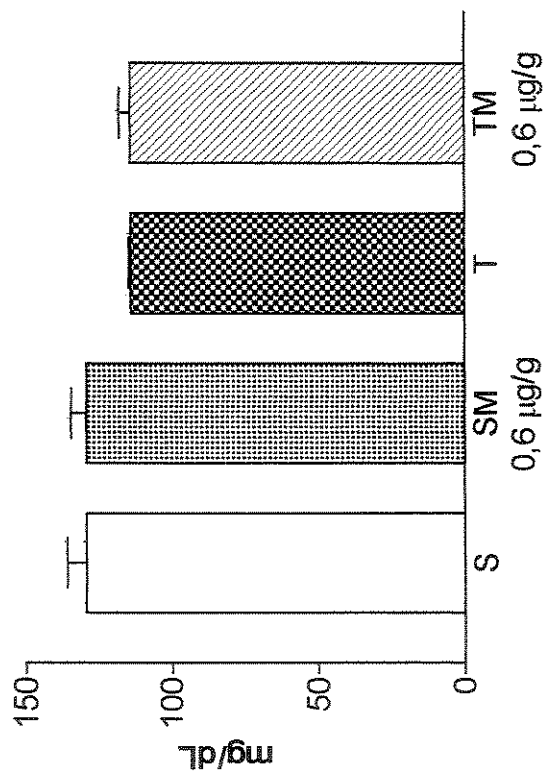


**Figuras 23 e 24:** Avaliação sobre a concentração de glicogênio no músculo gastrocnêmio e ventrículo (mg/100 mg) de ratos normais e diabéticos mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. Os valores correspondem às médias S.E.M.,  $n = 6$ ; \*  $p < 0,05$  vs S.

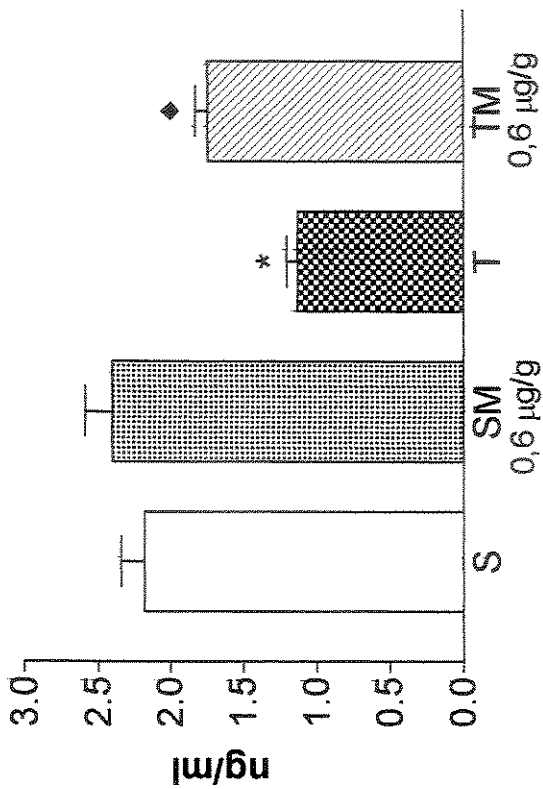


**Figuras 25 e 26:** Efeitos do tratamento com metformina (5,6 µg/ml) sobre a glicemia (mg/dL) e a insulina plasmática (ng/ml) de ratos normais mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. As concentrações de metformina/g de peso corporal estão abaixo das respectivas colunas. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6 para os grupos S e SM, n = 4 para o grupo T, n = 5 para o grupo TM. \* P < 0,05 vs S; ♦ P < 0,05 vs T.

### Glicemia

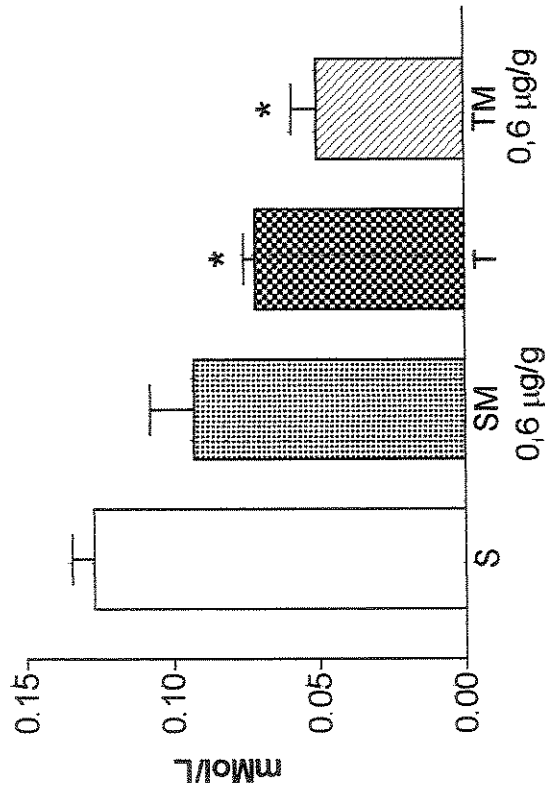


### Insulina Plasmática

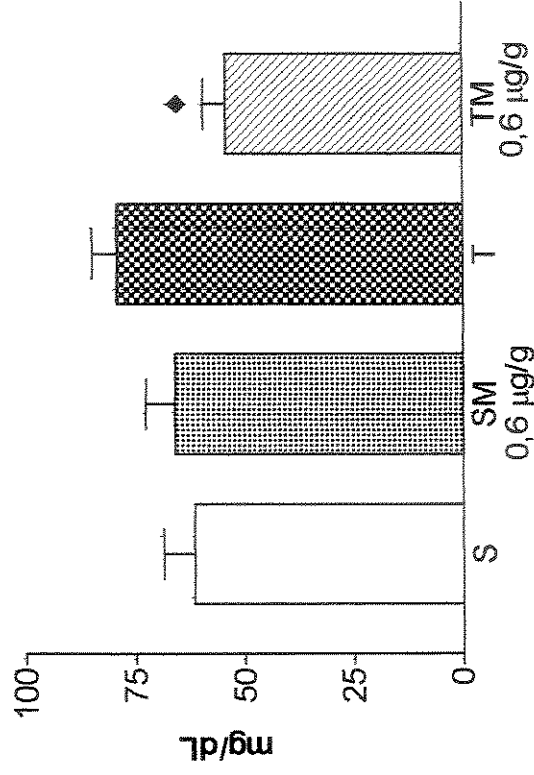


**Figuras 27 e 28:** Efeitos do tratamento com metformina (5,6 µg/ml) sobre os ácidos graxos livres (mMol/L) e triacilgliceróis (mg/dL) de ratos normais mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. As concentrações de metformina/g de peso corporal estão abaixo das respectivas colunas. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6 para os grupos S e SM, n = 4 para o grupo T, n = 5 para o grupo TM. \* P < 0,05 vs S; ♦ P < 0,05 vs T.

### Ácidos Graxos Livres

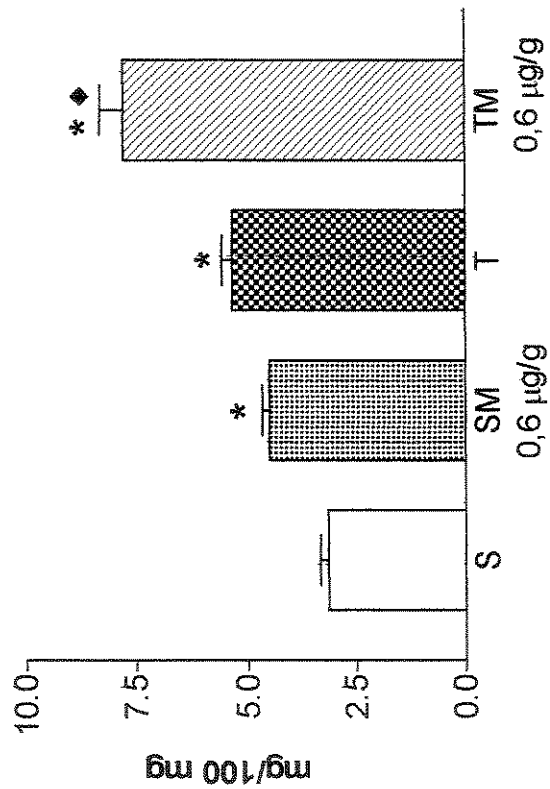


### Triacilgliceróis

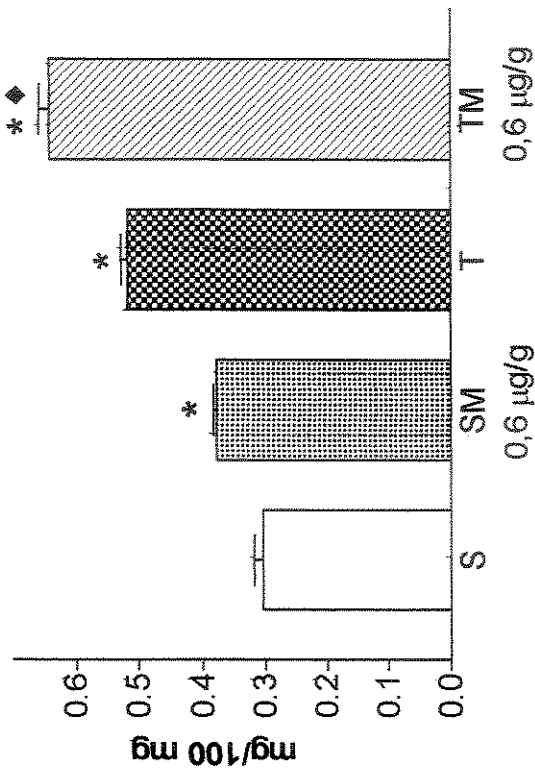


**Figuras 29 e 30:** Efeitos do tratamento com metformina (5,6 µg/ml) sobre a concentração de glicogênio do fígado e músculo sóleo (mg/100 mg) de ratos normais mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. As concentrações de metformina/g de peso corporal estão abaixo das respectivas colunas. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6 para os grupos S e SM, n = 4 para o grupo T, n = 5 para o grupo TM. \* P < 0,05 vs S; ♦ P < 0,05 vs T.

### Glicogênio Hepático

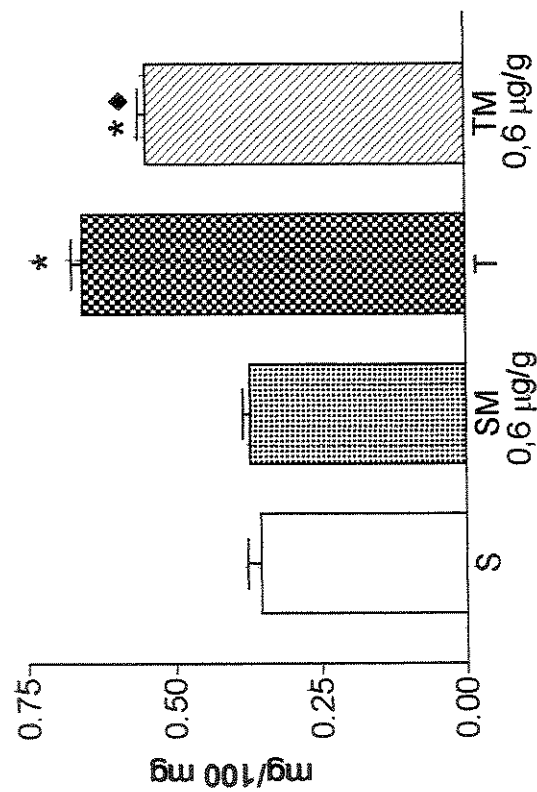


### Glicogênio Sóleo

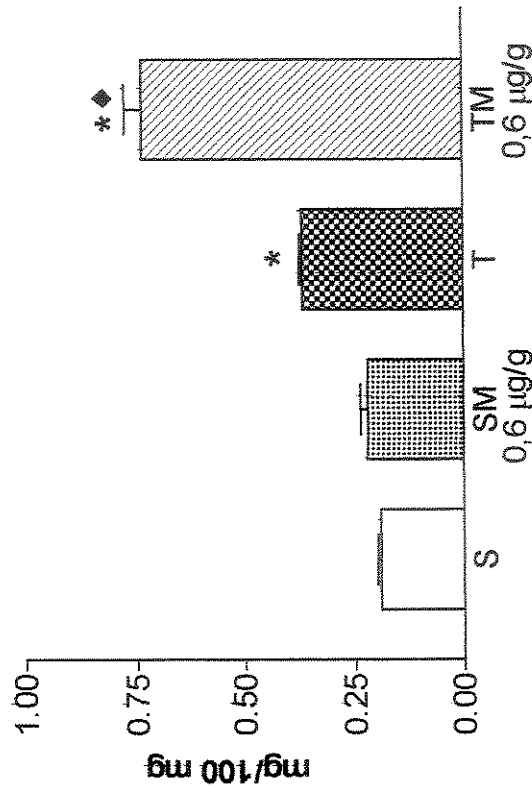


**Figuras 31 e 32:** Efeitos do tratamento com metformina (5,6 µg/ml) sobre a concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio e ventrículo (mg/100 mg) de ratos normais mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. As concentrações de metformina/g de peso corporal estão abaixo das respectivas colunas. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6 para os grupos S e SM, n = 4 para o grupo T, n = 5 para o grupo TM. \* P < 0,05 vs S; ♦ P < 0,05 vs T.

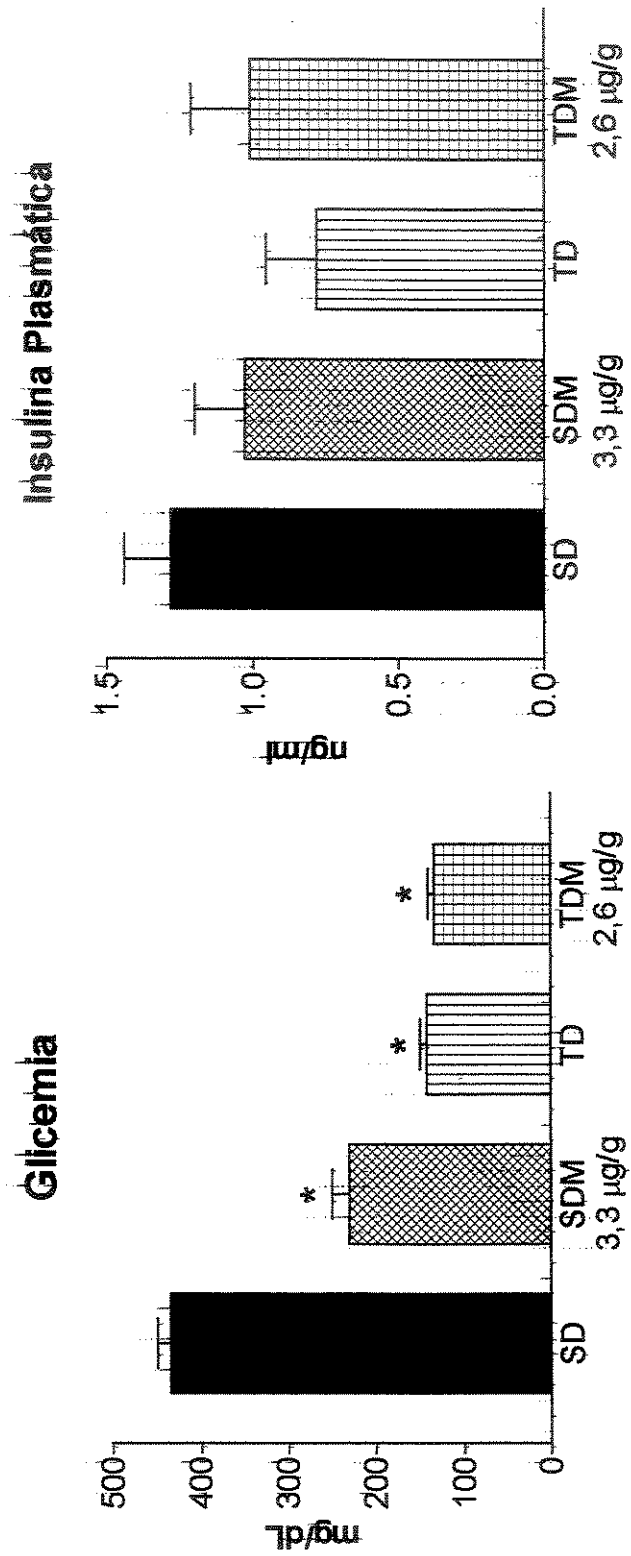
### Glicogênio Gastrocnêmio



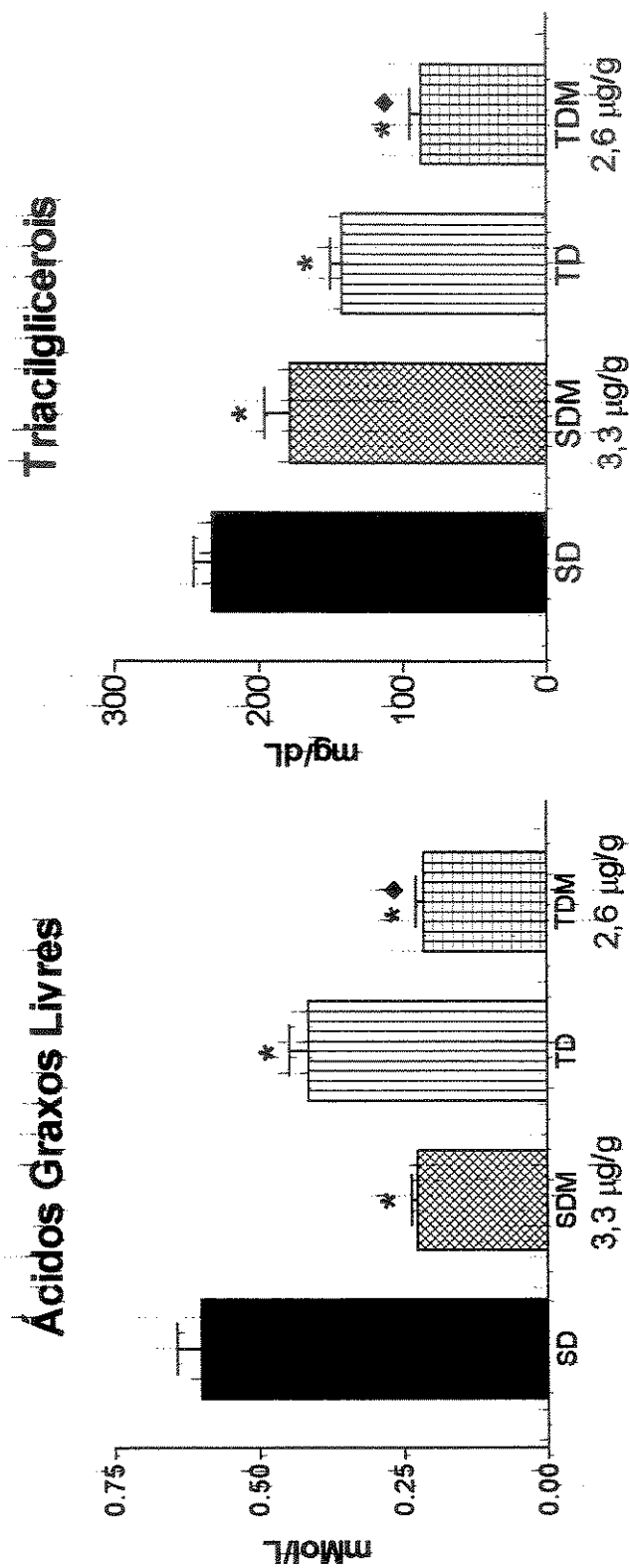
### Glicogênio Ventrículo



**Figuras 33 e 34:** Efeitos do tratamento com metformina (5,6 µg/ml) sobre a glicemia (mg/dL) e a insulina plasmática (ng/ml) de ratos diabéticos mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. As concentrações de metformina/g de peso corporal estão abaixo das respectivas colunas. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6 para os grupos SD, TD e TDM, n = 8 para o grupo SDM. \* P < 0,05 vs SD; ♦ P < 0,05 vs TD.

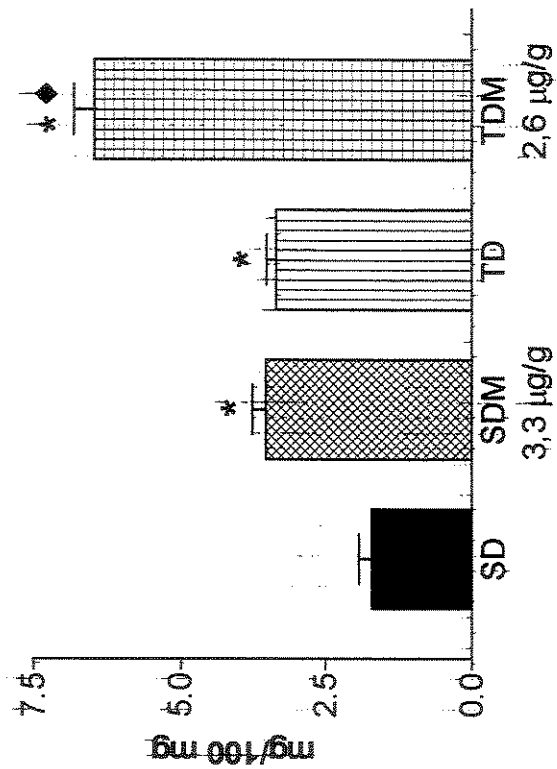


**Figuras 35 e 36:** Efeitos do tratamento com metformina (5,6 µg/ml) sobre os ácidos graxos livres (mMol/L) e triacilgliceróis (mg/dL) de ratos diabéticos mantidos em gálibas coletivas durante o período experimental. As concentrações de metformina/g de peso corporal estão abaixo das respectivas colunas. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6 para os grupos SD, TD e TDM, n = 8 para o grupo SDM, \* P < 0,05 vs \$D; ♦ P < 0,05 vs TD.

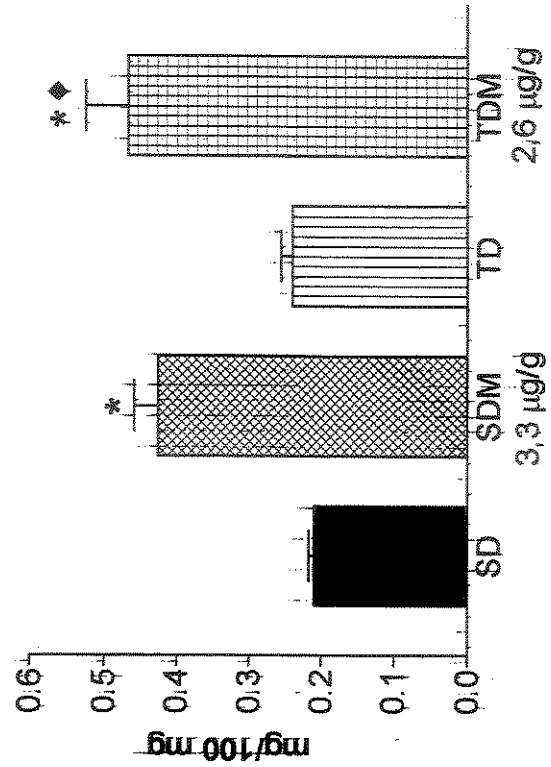


**Figuras 37 e 38:** Efeitos do tratamento com metformina (5,6 µg/ml) sobre a concentração de glicogênio do fígado e músculo sóleo (mg/100 mg) de ratos diabéticos mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. As concentrações de metformina/g de peso corporal estão abaixo das respectivas colunas. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6 para os grupos SD, TD e TDM, n = 8 para o grupo SDM. \* P < 0,05 vs S; ◆ P < 0,05 vs T.

### Glicogênio Hepático



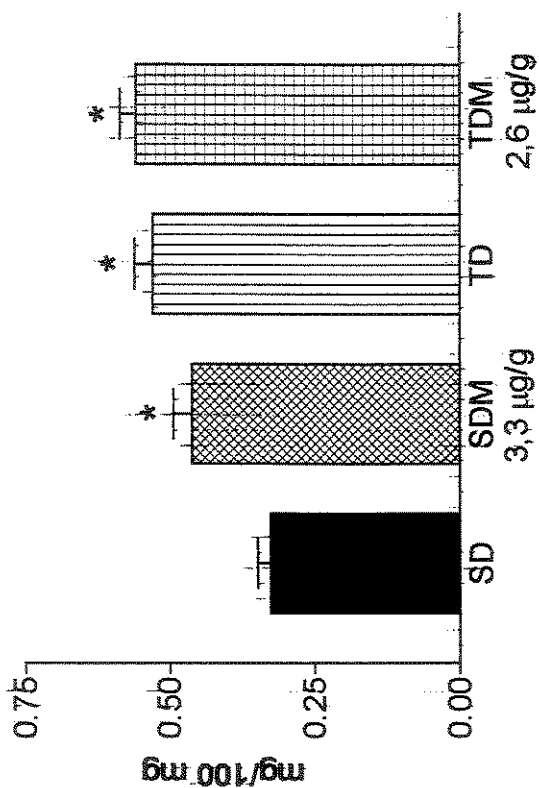
### Glicogênio Sóleo



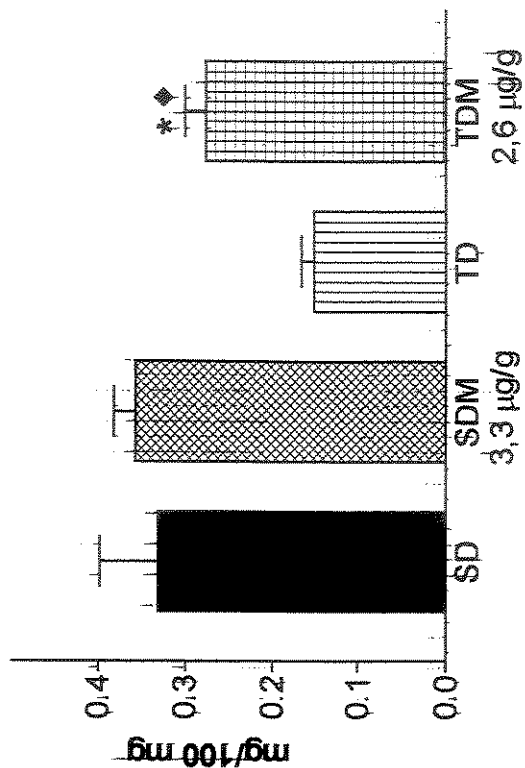


**Figuras 39 e 40:** Efeitos do tratamento com metformina (5,6 µg/ml) sobre a concentração de glicogênio do músculo gastrocnêmio e ventrículo (mg/100 mg) de ratos diabéticos mantidos em gaiolas coletivas durante o período experimental. As concentrações de metformina/g de peso corporal estão abaixo das respectivas colunas. Os valores correspondem às médias S.E.M., n = 6 para os grupos SD, TD e TDM, n = 8 para o grupo SDM. \* P < 0,05 vs S; ♦ P < 0,05 vs T.

### Glicogênio Gastrocnêmio



### Glicogênio Ventrículo



**Tabela 1)** Evolução ponderal de ratos mantidos em gaiola individual. Os valores representam as médias  $\pm$  S.E.M, n = 4 para os grupos S, SM, SD, SDM, T e TD; n = 7 para o grupo TDM. \* p < 0,05 vs SD; # p < 0,05 vs S.

<b>GRUPOS</b>	<b>1º DIA</b>	<b>24 HORAS APÓS ALOXANA</b>	<b>1º DIA DA FASE EXPERIMENTAL</b>	<b>SEMANA FINAL</b>
<b>S</b>	290,3 $\pm$ 3,01	-	310 $\pm$ 2,04	330,6 $\pm$ 3,29
<b>SM</b>	296,3 $\pm$ 7,07	-	297,5 $\pm$ 6,9	338,4 $\pm$ 5,22
<b>T</b>	297,6 $\pm$ 6,62	-	304,8 $\pm$ 7,17	343,1 $\pm$ 1,39
<b>TM</b>	292,8 $\pm$ 7,83	-	302,8 $\pm$ 10,4	346,8 $\pm$ 2,32
<b>SD</b>	307,3 $\pm$ 4,87	266,8 $\pm$ 5,62	268 $\pm$ 10,03	268,7 $\pm$ 1,68 #
<b>SDM</b>	292,5 $\pm$ 7,89	266,3 $\pm$ 5,96	256,5 $\pm$ 11,35	264,1 $\pm$ 1,26 #
<b>TD</b>	275,3 $\pm$ 7,39	247 $\pm$ 10,4	239 $\pm$ 4,71	257,3 $\pm$ 1,53 #
<b>TDM</b>	278 $\pm$ 3,65	254,7 $\pm$ 4,0	242 $\pm$ 4,13	278,8 $\pm$ 2,48 *#

**Tabela 2)** Evolução ponderal de ratos mantidos em gaiola coletiva. Os valores representam as médias  $\pm$  S.E.M,  $n = 6$  para os grupos S, SM, T e TD;  $n = 3$  para o grupo SD;  $n = 4$  para o grupo SDM \*  $p < 0,05$  vs SD; #  $p < 0,05$  vs S.

GRUPOS	1º DIA	24 HORAS APÓS ALOXANA	1º DIA DA FASE EXPERIMENTAL	SEMANA FINAL
S	290 $\pm$ 8,06		290 $\pm$ 8,06	347,4 $\pm$ 1,0
SM	288,2 $\pm$ 8,63		294,8 $\pm$ 15,2	349,6 $\pm$ 1,06
T	280,5 $\pm$ 7,35		251,2 $\pm$ 1,2	322,1 $\pm$ 3,95
TM	275,8 $\pm$ 8,4		274 $\pm$ 9,7	333,2 $\pm$ 2,32
SD	304,5 $\pm$ 2,22	269 $\pm$ 4,58	281,67 $\pm$ 12,3	304,4 $\pm$ 0,44 #
SDM	299,5 $\pm$ 8,33	258,3 $\pm$ 6,57	266 $\pm$ 17,1	289,9 $\pm$ 2,31 #
TD	286,7 $\pm$ 4,72	244 $\pm$ 12,8	280 $\pm$ 12,42	283,5 $\pm$ 1,94 #
TDM	277,2 $\pm$ 4,91	237,3 $\pm$ 7,6	287,5 $\pm$ 32,8	296,6 $\pm$ 0,73 #

**Tabela 3)** Consumo hídrico de ratos mantidos em gaiola individual. Os valores representam as médias  $\pm$  S.E.M,  $n = 4$  para os grupos S, SM, SD, SDM, T e TD;  $n = 7$  para o grupo TDM. \*  $p < 0,05$  vs SD; #  $p < 0,05$  vs S.

GRUPOS	1º DIA	24 HORAS APÓS ALOXANA	1º DIA DA FASE EXPERIMENTAL	SEMANA FINAL
S	31 $\pm$ 2,65		29 $\pm$ 3,3	35,15 $\pm$ 0,46
SM	36,5 $\pm$ 2,5		36,5 $\pm$ 2,6	37,5 $\pm$ 1,42
T	38,4 $\pm$ 1,47		37,2 $\pm$ 2,33	36,9 $\pm$ 1,06
TM	34,4 $\pm$ 2,31		36 $\pm$ 2,1	37,64 $\pm$ 0,45
SD	32 $\pm$ 1,41	48 $\pm$ 3,46	91 $\pm$ 12,7	175,6 $\pm$ 3,35 #
SDM	33 $\pm$ 1,0	61,5 $\pm$ 10,7	115,7 $\pm$ 10,3	158,4 $\pm$ 1,82 #
TD	37,25 $\pm$ 1,7	48,75 $\pm$ 1,88	134,2 $\pm$ 2,84	148,3 $\pm$ 3,07 #
TDM	35 $\pm$ 1,29	45,29 $\pm$ 2,72	125 $\pm$ 7,3	127,7 $\pm$ 2,65 * #

**Tabela 4)** Consumo hídrico de ratos mantidos em gaiola coletiva. Os valores representam as médias  $\pm$  S.E.M, n = 6 para os grupos S, SM, T e TD; n = 3 para o grupo SD; n = 4 para o grupo SDM \* p < 0,05 vs SD; # p < 0,05 vs S.

GRUPOS	1º DIA	24 HORAS APÓS ALOXANA (média de consumo)	1º DIA DA FASE EXPERIMENTAL	SEMANA FINAL
S	38		37	36,6 $\pm$ 0,84
SM	36		38	34,17 $\pm$ 1,4
T	36		38	36,67 $\pm$ 0,67
TM	38		35	37,33 $\pm$ 0,67
SD	40	52	90	112,6 $\pm$ 6,94 #
SDM	38	55	105	158 $\pm$ 30,27 #
TD	41	50	102	146,6 $\pm$ 6,37 #
TDM	39	48	94	133 $\pm$ 13,65 #

**Tabela 5)** Consumo alimentar de ratos mantidos em gaiola individual. Os valores representam as médias  $\pm$  S.E.M,  $n = 4$  para os grupos S, SM, SD, SDM, T e TD;  $n = 7$  para o grupo TDM. \*  $p < 0,05$  vs SD; #  $p < 0,05$  vs S.

<b>GRUPOS</b>	<b>1° DIA</b>	<b>APÓS ALOXANA</b>	<b>1° DIA DA FASE EXPERIMENTAL</b>	<b>SEMANA FINAL</b>
<b>S</b>	19,43 $\pm$ 1,91		23,25 $\pm$ 1,55	25,39 $\pm$ 0,36
<b>SM</b>	21,98 $\pm$ 1,87		22,95 $\pm$ 0,75	31,18 $\pm$ 0,94
<b>T</b>	25,46 $\pm$ 1,03		24,6 $\pm$ 0,7	25,72 $\pm$ 1,37
<b>TM</b>	23,84 $\pm$ 1,88		31,86 $\pm$ 2,79	29,25 $\pm$ 1,34
<b>SD</b>	18,13 $\pm$ 2,04	14,68 $\pm$ 4,45	25,45 $\pm$ 1,4	40,71 $\pm$ 0,54 #
<b>SDM</b>	19,7 $\pm$ 2,83	17,23 $\pm$ 4,00	27,4 $\pm$ 3,24	41,25 $\pm$ 1,23 #
<b>TD</b>	21,3 $\pm$ 3,9	14,85 $\pm$ 2,94	22,15 $\pm$ 1,8	35,23 $\pm$ 0,71 #
<b>TDM</b>	24,2 $\pm$ 2,13	24,29 $\pm$ 1,79	29,9 $\pm$ 1,9	37,67 $\pm$ 0,92 #

**Capítulo**  
**5**

**DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Evolução ponderal, ganho de peso, consumo hídrico e alimentar

Nossos dados mostram que houve um grande aumento no consumo de água e ração (figuras 2 a 5) em ratos diabéticos, confirmando resultados de inúmeros autores que trataram deste tema (por exemplo vide PLAZA et al., 1992).

PLAZA et al, 1992, relataram que o ritmo circadiano pode estar alterado por indução do diabetes. Estes autores mostram que ratos de hábitos predominantemente noturnos (83% quanto à ingestão alimentar e 68% quanto à ingestão hídrica) quando tornados diabéticos perdem a ritmicidade, alterando a proporção de ingestão hídrica e alimentar (55% e 59,5% respectivamente). Autores, como GROBLESKI et al (1981) e PETERSON et al (1980) atribuem esta mudança ao desbalanço hídrico devido à grande perda de água na urina.

Nossos resultados mostram que o tratamento com metformina e/ou o treinamento tendem a diminuir o consumo hídrico de ratos diabéticos (figura 11). Computando somente os dados da semana final de tratamento, esta tendência mostrou-se significativa no grupo Treinado Diabetes Metformina. Esta diminuição parece ser devida ao melhor estado metabólico destes ratos, como iremos demonstrar durante esta discussão. Confirmando esta melhoria, ratos tratados sedentários ou treinados, apresentaram maior ganho de peso no decorrer do experimento (figuras 9 e 10).

Apesar da possibilidade do treinamento aumentar o consumo hídrico e alimentar, nossos resultados mostraram que não houve diferenças significativas quanto a estes parâmetros em ratos normais. Nesta discussão, as alterações que serão demonstradas quanto ao estado metabólico são, provavelmente, decorrentes do treinamento e/ou do tratamento com metformina.



## 5.2 Parâmetros metabólicos

O diabetes promove alterações metabólicas envolvendo o transporte, armazenamento e degradação de várias fontes energéticas. Aqui trataremos apenas de algumas alterações promovidas no metabolismo de carboidratos e lipídeos.

Glicogênio é uma importante reserva energética que pode ser rapidamente mobilizada para manter o metabolismo celular. Fígado, músculos esqueléticos e tecido adiposo desempenham função central no controle do armazenamento e conversão de energia sendo que o metabolismo destes tecidos pode ser afetado pela baixa secreção ou pela resistência à insulina. A consequência final para estas células é a redução na atividade da glicogênio sintetase e o aumento da quebra de glicogênio (VESTERGAARD et al, 1991; DeFRONZO et al, 1992; LAWRENCE Jr et al, 1997) ou o aumento da degradação dos triglicerídeos e a saída resultante de glicerol e ácidos graxos livres para o plasma.

A destruição das ilhotas de Langerhans causadas pela aloxana resultou em alterações metabólicas que provocaram a diminuição de peso e o aumento do consumo hídrico e de ração, além do aumento da excreção urinária e fecal.

Nossos resultados demonstraram que houve grande redução da insulina plasmática decorrente da destruição das células secretoras de insulina. Em consequência houve grande aumento da glicemia (figuras 18 e 17) e diminuição da concentração de glicogênio no fígado e no sóleo (figuras 20 e 21). Estas mudanças ocorrem devido: à diminuição do transporte de glicose para as células sensíveis à insulina (sóleo); à deficiência na ativação da sintetase do glicogênio, especialmente no fígado e em músculos esqueléticos. Entretanto, no ventrículo houve aumento do conteúdo de glicogênio (figura 22) para compensar o grande aumento da atividade enzimática da glicogênio fosforilase, característico no diabético (HIGUCHI et al, 1995).

Estes eventos também levaram ao aumento de ácidos graxos livres e triglicerídeos (figuras 19 e 20), em concordância com a literatura (DeFRONZO et al 1992; SHEPHARD & ASTRAND, 1992). O aumento da oxidação de ácidos graxos e corpos cetônicos em diabéticos afeta o metabolismo de glicose no músculo esquelético

vermelho (sóleo) inibindo a sua utilização e oxidação. No fígado, o aumento da oxidação de ácidos graxos também inibe a oxidação de glicose, além de estimular a gliconeogênese, aumentando assim, a saída de glicose para o plasma (RANDLE, 1998).

Em revisão recente, RANDLE (1998) realçou que o aumento da oxidação de ácidos graxos afeta negativamente a secreção de insulina estimulada por glicose através de quatro efeitos: 1) dessensibilização do transporte de glicose estimulado por insulina; 2) inibição da fosforilação de glicose pela hexoquinase, mediada pela glicose-6-fosfato; 3) inibição da fosfofrutoquinase devido ao acúmulo de citrato e o conseqüente retardo da glicólise; 4) inibição da desidrogenase pirúvica e, portanto, da oxidação da glicose. Há evidências de que a elevação de ácidos graxos não esterificados do plasma (por mais de 4 horas) pode resultar na inibição da síntese de glicogênio, tal como observamos no fígado e sóleo de diabéticos (fig. 21 e 22).

Utilizando vários tipos de tratamento procura-se reverter ou minorar o quadro de deficiência metabólica apresentado pelos diabéticos.

Uma das formas utilizadas é a prática de exercício moderado ajustado às condições físicas do indivíduo. O exercício melhora o metabolismo oxidativo induzindo aumento do número de mitocôndrias nos músculos e aumenta o armazenamento de glicogênio em condições basais (STANLEY & CONNET, 1991; SHEPARD & ASTRAND, 1992; HOLLOSZY & KORT, 1996). Por si só, o exercício pode aumentar o transporte de glicose nas células musculares, entretanto, não de maneira tão eficiente quanto à regulação feita em presença da insulina (RODNICK et al, 1992; KLIP & PAQUET, 1990). À semelhança da insulina, o exercício aumenta a síntese de GLUT4 e a sua translocação para a membrana (GARVEY, 1992).

Este efeito do exercício pode ser aditivo aos proporcionados pela insulina, porém utilizando vias de sinalização diferentes. SHERWOOD et al (1999) sugeriu que a MAP quinase pode estar envolvida na via de sinalização do transporte de glicose durante a atividade contrátil muscular ao contrário da insulina, que atua pela via de receptores tirosina quinase. Durante o exercício, ocorre aumento da proteína quinase C

que é responsável pela ativação da MAP quinase a qual desencadeará uma cadeia de sinalização, fazendo com que ocorra a translocação de GLUT-4 para a membrana.

Segundo ROY & MARETTE (1996), o GLUT4 é transportado para a membrana e também é incorporado aos túbulos transversos durante exercícios agudos. Dessa forma, os túbulos transversos desempenham duplo papel nestes músculos: 1) participando da ativação da transmissão da despolarização da membrana para o retículo sarcoplasmático liberando  $Ca^{2+}$  e 2) facilitando o acesso e a distribuição de glicose às células musculares.

Nossos resultados confirmaram os benefícios do exercício, mostrando que o exercício físico moderado e regular diminuiu a glicemia (figura 33) e aumentou o glicogênio no fígado (figura 37) e no gastrocnêmio (fig. 39), sem diminuir a insulina plasmática. Este efeito decorre de adaptações teciduais que resultam em aumento da sensibilidade à insulina, promovendo maior captação de glicose (principalmente pelos músculos esqueléticos) e, ao final, diminuindo a glicemia (DELA, 1996). A diminuição da glicemia também pode estar relacionada à diminuição da liberação de glicose pelo fígado, proporcionadas pelo exercício (BERGER et al, 1975; HOLNESS et al, 1997). O aumento da concentração de glicogênio foi possível devido ao aumento da entrada de glicose na célula muscular, que fica mais ativa durante o exercício. Dessa forma, há aumento da atividade das enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase necessárias para a regulação da glicólise e o conseqüente aumento da atividade e concentração da glicogênio sintetase nos músculos (BROOKS, 1998; KOVAL et al, 1998; ROY & MARETTE, 1996).

Apesar dos efeitos benéficos do exercício sobre os diabéticos, a resposta dos ratos diabéticos ao treinamento diferiu consideravelmente entre os músculos gastrocnêmio (figura 39) e sóleo (figura 38). Em ambos, o treinamento aumentou o conteúdo de glicogênio em relação aos diabéticos sedentários, porém em proporções diferentes, sendo maior no gastrocnêmio do que no sóleo. Esta diferença pode ser decorrente dos efeitos inibitórios da oxidação dos ácidos graxos promovidos pelo diabetes no metabolismo de glicose no músculo esquelético vermelho (RANDLE, 1998) e pela predominância de fibras de contração lenta no músculo sóleo, as quais são mais

sensíveis à insulina do que o gastrocnêmio é (ROSSETI & GIACCARI, 1990; HOLNESS, 1996).

Além disso, o treinamento, por si só, diminuiu os níveis de ácidos graxos livres e triglicerídeos plasmáticos em ratos diabéticos, o que é altamente benéfico à saúde. Este aumento da utilização de lipídeos é proporcionado, principalmente, pelo aumento no número de translocadores de carnitina, responsáveis pela entrada de ácidos graxos na mitocôndria (BROOKS, 1998) e que está associada aos requerimentos de grande porção de energia, especialmente nos treinados (ROMIJN, 1993).

Outra forma de diminuir os efeitos deletérios do diabetes é utilizar medicamentos que estimulem, direta ou indiretamente, o transporte, o metabolismo e a incorporação de glicose aos estoques de glicogênio (LATHELLA et al, 1986; HERMANN et al, 1991; da SILVA & GONÇALVES, 1994, 1997, 2001; WIERNSPERGER et al, 1999). A metformina é uma biguanida anti-hiperglicemiante que não induz hipoglicemia, e que não aumenta a secreção de insulina (De FRONZO et al, 1991; BAILEY, 1992), o que é compatível com os nossos resultados (fig. 34). A literatura aponta (De FRONZO et al, 1991) que a principal causa da diminuição dos níveis de glicose durante o tratamento com metformina parece ser o aumento da ação da insulina sobre os tecidos periféricos e fígado, aumentando a captação de glicose. Secundariamente, a metformina diminui a liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo (ABBASI et al, 1998). Estes efeitos resultam na diminuição da liberação de glicose pelo fígado, devido à inibição da gliconeogênese, ao aumento da sensibilidade dos hepatócitos à insulina, além do estímulo à captação de glicose por tecidos sensíveis ou não à insulina (De FRONZO, 1988; BAILEY, 1992; STUMVOLL et al, 1995). Em virtude disso, a metformina tem sido utilizada para estimular o transporte de glicose em diabéticos tipo 2, resistentes à insulina (GALUSKA et al, 1991; HERMANN, 1996). Estes efeitos da metformina também ocorreram em ratos aloxanizados, baixando a glicemia de valores na faixa de 398 e 487 mg/dL (Grupo SD) para 172 a 296 (Grupo SDM). Também observamos mais recentemente que a metformina baixou a glicose sanguínea em ratos normais sedentários quando estressados pelo exercício e que, também diminuiu o nível de

depleção do glicogênio no gastrocnêmio, sóleo e fígado nestes ratos (da SILVA, 1998; GONÇALVES; et al, 2001; WIERNSPERGER et al, 1999).

O nosso modelo de diabetes (ratos aloxanizados) está mais próximo do diabetes tipo 1 do que do tipo 2. Esses ratos ainda apresentam uma pequena quantidade de insulina plasmática, conforme demonstrado por LUCIANO (1996) e nossos resultados (fig.34). Esta pequena quantidade pode favorecer a ação da metformina em animais diabéticos (SCHATZ, 1972) como demonstramos (figura 18).

Nossos resultados também mostram que a metformina não alterou a concentração de insulina plasmática, confirmando dados anteriores de diversos autores (v.g. DeFRONZO, 1988; BAILEY, 1992; STUMVOLL et al, 1995). Porém, induziu 47% ( $p < 0,001$ ) de redução da glicemia. Associado a esta redução, registramos aumento das reservas de glicogênio nos músculos e no fígado de ratos diabéticos por aloxana (figuras 38, 39, 37). Estes dados sugerem que na presença de metformina, houve aumento do transporte de glicose em músculos em virtude do aumento do efeito da insulina, resultando ao final no aumento da síntese de glicogênio. Estes dados concordam com os de BAILEY (1993), no qual a metformina aumentou a sensibilidade dos hepatócitos à insulina, e conseqüentemente, aumentou a absorção e reduziu a liberação de glicose pelo fígado. Tal como em músculos, também poderia ter havido aumento da atividade da glicogênio sintetase no fígado (GARVEY, 1992; LAWRENCE Jr et al 1997), levando à incorporação destas unidades ao glicogênio pré-formado.

São raras as informações relativas ao efeito da metformina sobre o perfil lipídico de diabéticos mas sabe-se que ela diminui a lipólise, corrigindo o desbalanço glicose-ácidos graxos (ciclo de Randle) que ocorre em diabéticos (PERRIELLO et al, 1994). Segundo RANDLE (1998), a concentração de ácidos graxos livres representam um dos melhores controles sobre o metabolismo oxidativo de glicose. Estes autores sugerem que a redução da saída de ácidos graxos livres do tecido adiposo e a resultante diminuição de sua concentração no plasma contribuiria para o efeito anti-hiperglicêmico da metformina. Nossos resultados podem ser interpretados desta maneira, pois, as concentrações de ácidos graxos livres foram diminuídas em 160%, e

as de triglicerídeos diminuíram em 30% (figuras 35 e 36). Entretanto ainda permaneceram acima dos valores obtidos no grupo Controle.

Quanto à diminuição dos níveis circulantes de triglicerídeos, parece estar associada ao aumento de sua utilização, diminuição da síntese e do aumento de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) (BAILEY, 1992; DeFRONZO & GOODMAN, 1995) além da diminuição da resistência à insulina (BODEN, 1997).

No decorrer desta discussão realçamos os efeitos benéficos do exercício e da metformina que observamos neste trabalho. A associação: tratamento com metformina e exercício físico foi realizada com o intuito de verificar se produziria melhora significativa do estado do diabético. No conjunto, a associação contribuiu para a melhoria dos parâmetros prejudicados pelo diabetes, predominando ora os efeitos do exercício baixando a glicemia, ora os efeitos da metformina que deram maior contribuição para a redução dos ácidos graxos livres e para aumentar o conteúdo de glicogênio no sóleo. Além disso, pode-se notar um efeito aditivo entre ambos os fatores quanto ao aumento de glicogênio no fígado e na diminuição dos triglicerídeos no plasma. Por outro lado, no ventrículo houve interação entre os tratamentos, de modo que a concentração de glicogênio foi intermediária entre os valores obtidos sob efeito de metformina e exercício regular (fig. 40).

Dessa forma, a associação metformina e treinamento permitiu para que houvesse um complemento dos efeitos benéficos proporcionados, tornando o diabético mais próximo de uma vida saudável.

**Capítulo**  
**6**

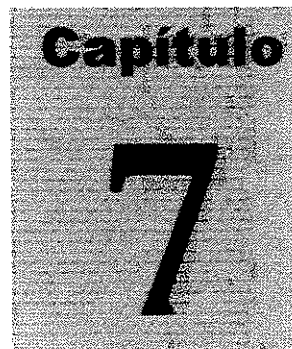
**CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

De modo geral, houve melhora dos parâmetros metabólicos de ratos diabéticos proporcionados pelo exercício ou pela metformina isoladamente, porém com predominância variada de seus benefícios. A associação treinamento e tratamento com metformina corrigiu os parâmetros metabólicos que isoladamente não foram possíveis, sem prejudicar os benefícios já proporcionados. Dessa forma, a associação treinamento e o tratamento com metformina durante quatro semanas contribuiu para abrandar a maioria dos efeitos deletérios do diabetes em ratos.





## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ABBASI, F.; CARANTONI, M.; CHEN, Y. D. I. & REAVEN, G. M.** Further evidence for a central role of adipose tissue in the antihyperglycemic effect of metformin. **Diabetes Care** 21 (8): 1301-1305, 1998.

**BAILEY, C. J.** Biguanides and NIDDM. **Diabetes Care** 15 (6): 755-772, 1992.

**BAILEY, C. J.** Metformin an update. **Gen Pharmacol** 24: 1299, 1993.

**BAILEY, C. J.** Metformin and intestinal glucose handling. **Diabetes Metab. Rev.**, 11:S23-S32, 1995.

**BAILEY, C. J. & TURNER, R. G.** Metformin. **N. Engl. J. Med.** 334: 574-9, 1996.

**BAILEY, C. J.** Insulin resistance and antidiabetic drugs. **Biochemical Pharmacology** 58: 1511-1520, 1999.

**BENNETT, J. C. & CECIL, P. F.** Tratado de medicina interna. Ed. Guanabara-Keegan, 20ª ed., vol II. 2647, 1997.

**BERG, K. E.** Diabetic's Guide to health and fitness - An authoritative approach to leading an active life. **Life Enhancement Publications**, 1986

**BERGER, M., HAGGS, S., RUDERMAN, N. B.** Glucose metabolism in perfused skeletal muscle interaction of insulin and exercise on glucose uptake. **Biochem. J.** v. 146, p. 231-238, 1975.

- BODEN, G.** Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, 46: 3-10, 1997.
- BROOKS, G. A. & FAHEY, T. D.** Exercise Physiology - Human Bioenergetics and Its Applications. Macmillan Publishing Company, 1985.
- BROOKS, G. A.** Mammalian fuel utilization during sustained exercise. **Biochemistry and Molecular Biology** 120(1) 89-107, 1998.
- CAMPBELL, P. J., MANDARINO, L. J. & GEIGH, J. E.** Quantification of the relative impairment in actions on hepatic production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, 37: 15-21, 1988.
- CARTEE, G. D.; DOUEN, A. G.; RAMLAL et al.** Stimulation of glucose transport in skeletal muscle by hipoxia. **J. Appl. Physiol.** 70(4): 1593-600, 1991.
- da SILVA, C. A. & GONÇALVES, A. A.** Metformin restores the hepatic stores in aloxan diabetic rats. In Thematic Module: Liver Metabolism, IX Ann Meet of Brazilian Federation of Exper. Biology Soc., 24 - 27/Aug/94, Caxambú, MG, Brazil, p. XCIII, Abstract.
- da SILVA, C. A. & GONÇALVES, A. A.** Partial recovery of erythrocyte glycogen in diabetic rats treated with phenobarbital. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 30 (5): 657 - 661, 1997.
- da SILVA, E. C.** Modificações das reservas metabólicas em ratos sedentários e treinados tratados com metformina. Monografia de Graduação da Faculdade de Educação Física da Universidade de Campinas (UNICAMP), 1998.

**DAWIS S. N. & GRANNER, D. K.** Insulin, oral hypoglycemic agents and pharmacology of the pancreas. In: **GOODMAN & GILMAN'S** The pharmacological basis of therapeutics. 9 ed, 1487-1517, Mc Graw Hill, 1996.

**DeFRONZO, R. A.** The tripartite:  $\beta$ -Cell, muscle, liver. **Diabetes**, 37:667-687, 1988.

**DeFRONZO, R. A.; BARZILAI, N.; SIMONSON, D.** Mechanism of metformin action in obese and lean non-insulin-dependent diabetic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 73:1294-1301, 1991.

**DeFRONZO, R. A.; BONADONNA, R. C. & FERRANNINI, E.** Pathogenesis of NIDDM. **Diabetes Care** 15(3): 318-368, 1992.

**DeFRONZO, R. A. & GOODMAN, A. M.** Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. **N. Engl. J. Med.** 333:541-9, 1995.

**DELA, F.** On the influence of physical training on glucose homeostasis. **Acta Physiologica Scandinavica** 635: 5-41, 1996.

**EMILIEN, G.; MALOTEAUX, J. M. & PONCHON, M.** Pharmacological management of diabetes - Recent progress and future perspective in daily drug treatment. **Pharmacology & Therapeutics** 81 (1): 37-51, 1999.

**FELIG, P., BAXTER, J. D., BRODUS A. E. & FROHMAN L. A.** Endocrinology and Metabolism. McGraw Hill Book Company, 2<sup>nd</sup> ed., New York, 1987.

**GALUSKA, D.; ZIERATH, J.; THORNE, A. SONNENFELD, T. and WALLBERG - HENRIKSSON, H.** Metformin increases insulin-stimulated glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. **Diab. and Metab.**, 17:159-163, 1981.

**GARVEY, W. T.** Glucose transport and NIDDM *Diab. Care*, 15, 396-417, 1992

**GONÇALVES, A. A.; da SILVA, E. C.; BRITO, I. J. L. da SILVA, C. A. & WIERNSPERGER, N.** Metabolic profile of exercised rats treated by metformin. Manuscript in preparation, 2001.

**GROBLESKI, T. A.; NUÑEZ, A. A. & GOLD, R. M.** Circadian rhythms in vasopressin deficient rats. *Brain Res. Bull.* 6: 125-130, 1981.

**HERBERT, V., LAV, K. S., GOTTLIER, C. W. & LEICHER, S. P.** Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol.*, 25: 1375-1384, 1965.

**HERMANN, L. S.** Metformin: A review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Diabete Metab.* 5: 233 - 45, 1979.

**HERMANN, L. S.; HJELLSTRÖM, T & NILSSON-EHLE** Effects of metformin and glibenclamide alone and in combination on serum lipids and lipoproteins in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diab. & Metab.* 17: 174, 1991.

**HERMANN, L. S.** In handbook of experimental pharmacology, Ed. by Springer Verlag, 119: 374-407, 1996.

**HIGUCHI, M.; MIYAGI, K.; NAKASONE, J. & SAKANASHI, M.** Role of high glycogen in underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine. *J. Cardio. Pharm.* 26: 899-907, 1995.

**HOLLOSZY, J. O. & KOHRT, W. M.** Regulation of Carbohydrate and Fat Metabolism During and After Exercise. *Annu Rev. Nutr.* 16:121-138, 1996.

- HOLNESS, M. J.; FRYER, L. G. D. & SUGDEN, M. C.** Endocrine and nutritional modulation of glucose disposal and storage in muscle. *Bioch. Soc. Trans.*, 25(1): 1-7, 1997.
- HOWLETT, H. C. S. & BAILEY, C. J.** A risk-benefit assessment of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Drug Safety*, 20(6): 489-503, 1999.
- KLIP, A. and PAQUET, M. R.** Glucose Transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 13:228, 1990
- KOVAL, J. A.; DeFRONZO, R. A.; O'DOHERTY, R. M.; PRINTZ, R.; ARDEHALI, H.; GRANNER, D. K. & MANDARINO, L. J.** Regulation of hexokinase II activity and expression in human muscle by moderate exercise. *Am. J. Physiol.* 274: E304-E308, 1998.
- KRISMAN, C. R. & BARRENGO, R.** A precursor of glycogen biosynthesis:  $\alpha$ -1,4-glucan-protein. *Eur. J. Biochem.*, 52:117, 1975.
- LAHTELA, J. T.; GACHALYI, B. and EKSYMA, S.** The effect of liver microsomal enzyme inducing and inhibiting drugs on insulin mediated glucose metabolism in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 21: 19-26, 1986.
- LALAU, J. D.; LACROIX, C.; CAGNY, B.; RIGAUD, B.; BLEICHNER, G.; CHAVEAU, P.; DULBECCO, P.; GUÉRIN, C.; HAEGY, J. M.; LORAIT, P.; MARCHAND, B.; RAVAUD, Y.; WEYNE, P. and FOURNIER, A.** Role of metformin accumulation in metformin-associated lactic acidosis. *Diab Care*, 18:779-784, 1995.

- LAWRENCE Jr, J. C.; SKURAT, A. V.; ROACH, P. J.; AZPIAZU, I. & MANCHESTER, J.** Glycogen synthase activation by insulin and effect of transgenic overexpression in skeletal muscle. *Biochem. Soc. Trans.*, 25: 1-7, 1997.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. & COX, M. M.** In Principles of Biochemistry. Worth Publishers, 2.ed. 1993.
- LO SIU, J. C. R., RUSSEAU, J. C. & TAYLOR, A. W.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.*, 28:234-236, 1970.
- LUCIANO, E.** Atividade física e metabolismo lipídico em ratos diabéticos experimentais. *Revista Bras. Ativ. Fis. Saúde* 1(4): 19-26, 1996.
- McGOWAN, M. W., ARTISS, J. D., STRANDBERGH, D. R. & ZAK, B.** A peroxidase-coupled method for the calorimetric determination of serum triglycerids. *Clin. Chem.* 29:538, 1983.
- OSTMAN-SMITH, I.** Adaptative changes in the sympathetic nervous system in some effector organs of the rat following long term exercise or cold acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. *Acta Physiol. Scand.* suppl. 47: 1, 1979.
- PATANÈ, G., PIRO, S., RABUAZZO, A. M., ANELLO, M. & VIGNERI, R.** Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: A direct metformin-effect pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes* 49: 735-740, 2000.
- PERRIELLO, G.; MISERICORDIA, P.; VOLPI, E.; SANTUCCI, A.; FERRANNINI, E.; VENTURA, M. M.; SANTEUSANIO, F.; BRUNETTI, P. & BOLLI, G. B.** Acute antihyperglycemic mechanisms of metformin in NIDDM. Evidence for suppression of lipid oxidation and hepatic glucose production. *Diabetes* 43: 920-928, 1994.

- PERSEGHIN, G. PRICE, T. B.; PETERSEN, K. F.; RODEN, M.; CLINE, G. W.; GEROW, K. ROTHMAN, D. L. & SHULMAN, G. I.** Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *N. Engl. J. Med.* 335: 1357-1362, 1996.
- PETERSON, G. M.; WATKINS, W. B. & MOORE-EDE, R. Y.;** The suprachiasmatic hypothalamic nuclei of the rat. VI. Vasopressin neurons and circadian rhythmicity. *Behav. Neural. Biol.* 29: 236-245, 1980.
- PLAZA, A. V.; GRANDA, T. G. & CACHERO, M. T. G.** Circadian rhythms of food and water intake and urine excretion in diabetic rats. *Physiol. Beh.* 54: 665-670, 1993.
- RANDLE, P. J.** Regulatory interaction between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diab Metab. Rev.* 14: 263-283, 1998.
- REGOUW, B. J. M., CORNELISSEM, P. J. H. C., HELDER, R. A. P., SPIJKERS, J. B. F. & WEEBER, Y. M. M.** Specific determination of the free fatty acid in plasma. *Clin Chem Acta* 31:187-95, 1971.
- RICCIO, A.; DEL PRATO, S.; KREUTZENBERG, S. V. and TIENGO, A.** Glucose and lipid metabolism in non insulin dependent diabetes. Effect of metformin. *Diab & Metab.* 17:180-184, 1991.
- RODNICK, K. J.; PIPER, R. C.; SLOT, J. W. & JAMES, D. E.** Interaction of insulin and exercise on glucose transport in muscle. *Diab Care*, 15: 1679-1689, 1992.
- ROMIJN, J. A.; COYLE, E. F.; SIDOSSIS, L. S.; GASTALDELLI, A.; HOROWITZ, J. F.; ENDERT, E. & WOLPE, R. R.** Regulation of endogenous fat and carbohydrate



- metabolism in relation to exercise intensity and duration. **Am. J. Physiol.** 28: E380-E391, 1993.
- ROSSETTI, L. & GIACCARI, A.** Relative contribution of glycogen synthesis and glycolysis to insulin mediated glucose uptake. A dose response euglycemic clamp study in normal and diabetic rats **J. Clin. Invest.** 85: 1785-1792, 1990.
- ROY, D. & MARETTE, A.** Exercise induces the translocation of GLUT4 to transverse tubules from an intracellular pool in rat skeletal muscle. **Bioch Biophys. Res. Com.** 223: 147-152, 1996.
- SCARPELLO, J. H. B.; HODGSON, E.; HOWLETT, H. G. S.** Effect of metformin on bile salt circulation and intestinal motility in type 2 diabetes mellitus. **Diabet. Med.** 15: 651-6, 1998.
- SGHATZ, H.; KATSILAMBROS, N.; NIERLE, G. and PFEIFFER, E. E.** The effect of biguanides on secretion and biosynthesis of insulin in isolated pancreatic islet of rats. **Diabetologia**, 8:402-407, 1972.
- SHEPHARD, R. J. & ASTRAND, P. O.** Endurance in sport. Blackwell Scientific Publications Ltd. 1 ed. London, 1992
- SHERWOOD, D. J.; DUFRESNE, S. D.; MARKUNS, J. F.; CHEATHAN, B.; MOLLER, D. E.; ARONSON, D. & GOODYEAR, L. J.** Differential regulation of MAP kinase, p70<sup>S6K</sup> and Akt by contraction and insulin in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** 276(5): E870-E878, 1999.
- SMYTHE, C. & COHEN, P.** The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. **Eur. J. Biochem.** 200:625, 1991.

- STANLEY, W. C., CONNETT, R. J.** Regulation of muscle carbohydrate metabolism during exercise. *The FASEB J.* 5:2155-2159, 1991.
- STUMVOLL, M.; NURJHAN, N.; PERRIELO, G.; DAILEY, G. & GERICH, J. E.** Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 31: 550-554, 1995.
- TODD, J. A.** Genetic analysis of type I diabetes using whole genome approaches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8560-8565, 1995.
- TRINDER, R.** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6: 24, 1969.
- VAN DIJK, G.; BALKAN, B.; LINDFELDT, J.; BOWS, G.; SCHEWINK, A. J. W.; AHRÉN, B. & STEFFENS, A. B.** Contribution of liver nerves, glucagon and adrenaline to glycaemic response to exercise in rats. *Acta. Physiol. Scand.* 150: 305, 1994.
- VESTERGAARD, H.; BJORBAEK, C.; HANSEN, T.; LARSEN, F. S.; GRANNER, D. K. & PEDERSEN, O.** Impaired activity and gene expression of hexokinase II in muscle from non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J. Clin. Invest.* 96: 2639-2645, 1995.
- WIERNSPERGER, N.; da SILVA, E. C.; BRITO, I. J. L. da SILVA, C. A. & GONÇALVES A. A.** Metformin protects glycogen stores in liver and skeletal muscles against exercise induced depletion in rats. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of European Ass. Study Diabetes, sep. 29—oct. 2, 1999.

**VRANIC, M. & BERGER, M.** Exercise and diabetes mellitus. **Diabetes**, 28: 147-163, 1979.

**ZIERLER, K.** Whole body glucose metabolism. **Endocrinology and Metabolism** 276(3): E409- E426, 1999.