

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Julia Laura Fernandes Abrantes**

**“Investigação dos efeitos do treinamento físico  
sobre o estresse oxidativo em ilhotas  
pancreáticas de ratos tratados com  
dexametasona”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Julia Laura Fernandes Abrantes*  
*por Roberto Bosqueiro*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biologia para obtenção do Título  
de Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**Ab84i** Abrantes, Julia Laura Fernandes  
Investigação dos efeitos do treinamento físico sobre o estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas de ratos tratados com dexametasona / Julia Laura Fernandes Abrantes. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: José Roberto Bosqueiro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Diabetes. 2. Estresse oxidativo. 3. Langerhans, Ilhotas de. 4. Treinamento físico. 5. Dexametasona. I. Bosqueiro, José Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Effects of exercise training on oxidative stress in pancreatic islets from dexamethasone-treated rats.

**Palavras-chave em inglês:** Diabetes; Oxidative stress; Islands of Langerhans; Exercise training; Dexamethasone.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** José Roberto Bosqueiro, Marcio Alberto Torsoni, Leonardo dos Reis Silveira.

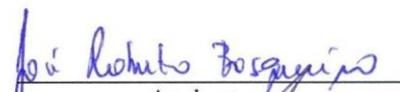
**Data da defesa:** 25/02/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

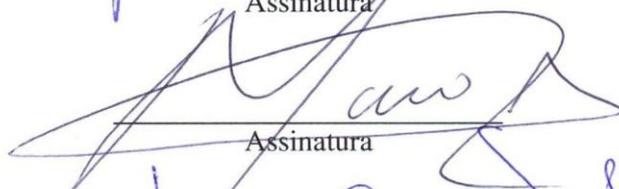
Campinas, 25 de fevereiro de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

  
Assinatura

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

  
Assinatura

Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Cláudio César Zoppi

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*Dedico este trabalho aos meus pais Sandra e Joaquim, ao meu irmão Guilherme e ao meu namorado Halley. Obrigada pelo carinho, pelo incentivo, pela paciência e pelo amor incondicional em todos os momentos!*

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço primeiramente a Deus, por dar-me vida e saúde, por guiar meus passos e por dar-me forças para lutar, sempre.
- ❖ À minha família e ao meu namorado, minhas razões de viver, pelo apoio, pela compreensão, pela incrível paciência e pelo imenso amor e carinho, capazes de tornar especiais todos os dias de minha vida!
- ❖ Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro, pela oportunidade de estágio desde a graduação, pela orientação e pela confiança em meu trabalho.
- ❖ Ao prof. Dr. Kléber Luiz de Araújo e Souza, pelos ensinamentos técnicos e pela orientação, essenciais durante o desenvolvimento do trabalho.
- ❖ Ao prof. Valdecir Farias Ximenes da bioquímica da UNESP Bauru por ceder, gentilmente, os equipamentos do seu laboratório.
- ❖ À Profa. Sandra Lia do Amaral, pelos ensinamentos e por permitir o uso da esteira ergométrica para treinamento dos ratos utilizados no trabalho.
- ❖ Ao Cláudio Zoppi, pela ajuda na finalização da dissertação.
- ❖ Ao Bruno Viscelli e a Sheila, por me ajudarem inúmeras vezes com o treinamento dos animais e com a parte experimental do projeto.
- ❖ Aos amigos Paula, Antônio, Rodrigo, Daisy, Denise e Willian, pela companhia, pelas festinhas e almoços na república e por tornar meus dias em Campinas mais felizes.
- ❖ À minha querida amiga Flávia, pela lealdade, pela companhia diária em Campinas, pelos cafezinhos e risadas e pela contribuição direta para a realização do trabalho.

- ❖ Em especial, agradeço ao Alex, pela amizade e companheirismo, pela disposição em ensinar sempre, pela paciência, confiança e pela imensa contribuição na minha formação como professora e pesquisadora. Lek, muito obrigada por tudo!
- ❖ À FAPESP pelo apoio financeiro concedido.
- ❖ E a todos que fizeram parte deste trabalho direta ou indiretamente.

**- RESUMO -**

## RESUMO

Quando em excesso, a administração de glicocorticóides pode induzir hiperglicemia, fator que tem sido associado ao aumento do estresse oxidativo em diversos tecidos. No pâncreas endócrino, o estresse oxidativo tem sido relacionado à perda de função e massa de células  $\beta$  pancreáticas, contribuindo para o desenvolvimento do diabetes tipo 2. Por melhorar a sensibilidade à insulina e a capacidade antioxidante em diversos tecidos, o treinamento físico moderado poderia ser uma importante ferramenta na prevenção do estresse oxidativo em pâncreas endócrino. Para testar essa hipótese, o presente trabalho investigou o efeito do treinamento físico de intensidade moderada, realizado previamente a administração de dexametasona (DEX – 1mg/kg de *p.c.*, durante 5 dias), sobre vários parâmetros metabólicos e sobre o estado redox de ilhotas pancreáticas de ratos. Quatro grupos experimentais foram utilizados: sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com DEX (TD). O tratamento com DEX induziu hiperglicemia (níveis glicêmicos:  $90.8 \pm 3.9$ ,  $299.2 \pm 24.3$ ,  $84.3 \pm 2.9$ ,  $229.9 \pm 19.2$  mg/dL para SC, SD, TC, TD, respectivamente;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ ), hipertrigliceridemia (níveis de triglicerídeos:  $94.2 \pm 4.3$ ,  $416.6 \pm 54.3$ ,  $92.7 \pm 6.0$ ,  $322.5 \pm 48.7$  mg/dL para SC, SD, TC, TD, respectivamente;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ ) e hiperinsulinemia (níveis insulinêmicos:  $1.10 \pm 0.2$ ,  $23.01 \pm 0.8$ ,  $1.21 \pm 0.2$ ,  $21.66 \pm 0.6$  ng/mL para SC, SD, TC, TD, respectivamente;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ ) de jejum em ratos SD e TD e resistência à insulina (RI) apenas em ratos SD (Taxa de decaimento da glicose - Kitt:  $3 \pm 0.2$ ,  $1.8 \pm 0.1$ ,  $3.6 \pm 0.2$ ,  $3.2 \pm 0.4$  para SC, SD, TC, TD, respectivamente;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ ). Além disso, reduziu o conteúdo total de insulina (CT:  $191.6 \pm 21.5$ ,  $97.1 \pm 17.1$ ,  $370.3 \pm 46.5$ ,  $185.6 \pm 16.3$  ng/ilhota para SC, SD, TC, TD, respectivamente;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ ) e aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em ilhotas pancreáticas de ratos SD e TD vs respectivos controles (EROs:  $2.8$  mM

*de glicose*:  $41.3 \pm 2.6$ ,  $54 \pm 1.3$ ,  $23.4 \pm 1.5$ ,  $38.9 \pm 4$  UF/ug proteína; *22 mM de glicose*:  $33.3 \pm 1.7$ ,  $38.4 \pm 0.5$ ,  $10.1 \pm 1.6$ ,  $28 \pm 1.2$  UF/ug proteína para SC, SD, TC, TD, respectivamente;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ ). Já o treinamento físico foi capaz de prevenir a RI e reduzir em 23% os níveis glicêmicos de jejum dos ratos TD vs SD. Foi observado, ainda, aumento no CT e na secreção de insulina estimulada por glicose (11.1mM) em ilhotas isoladas de ratos TC e TD (Secreção em 11.1 mM de glicose:  $1.4 \pm 0.2$ ,  $4.2 \pm 0.2$ ,  $3.3 \pm 0.2$ ,  $5.6 \pm 0.5$  ng/mL por ilhota por hora, para SC, SD, TC, TD, respectivamente;  $n = 12$ ;  $P < 0.05$ ). Além disso, o treinamento físico induziu aumento no nível protéico da enzima antioxidante catalase (CAT:  $100 \pm 14.1$ ,  $113.8 \pm 14.2$ ,  $151.6 \pm 10.2$ ,  $183.2 \pm 11.2$ , expresso como % SC, para SC, SD, TC, TD, respectivamente;  $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ), bem como redução nos níveis de EROs em ilhotas de ratos TC e TD. Baseados nesses dados, nós sugerimos que o treinamento físico deva contribuir para melhora na homeostase glicêmica, além de aumentar a resistência de ilhotas pancreáticas ao estresse oxidativo.

**- ABSTRACT -**

## ABSTRACT

When in excess, glucocorticoid administration can induce hyperglycemia, which has been associated to increased oxidative stress in numerous tissues. In endocrine pancreas, the oxidative stress has been related to the loss of pancreatic  $\beta$ -cell function and mass, contributing to the development of type 2 diabetes. By improving the insulin sensitivity and the antioxidative capability in several tissues, moderate exercise training could be an important tool in the prevention of oxidative stress. To test this hypothesis, the present study aimed to investigate the effect of a moderate exercise training plan, executed previous to dexamethasone challenge (DEX – 1mg/kg per *b.w.*, for 5 days), on numerous metabolical parameters, as well as on the redox state of the pancreatic islets in rats. For this, four experimental groups were designed: sedentary control (SC), sedentary treated with DEX (SD); trained control (TC) and trained treated with DEX (TD). DEX treatment induced fasting hyperglycemia (blood glucose levels:  $90.8 \pm 3.9$ ,  $299.2 \pm 24.3$ ,  $84.3 \pm 2.9$ ,  $229.9 \pm 19.2$  mg/dL for SC, SD, TC, TD, respectively;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ ), hypertriglyceridemia (blood triglyceride levels:  $94.2 \pm 4.3$ ,  $416.6 \pm 54.3$ ,  $92.7 \pm 6.0$ ,  $322.5 \pm 48.7$  mg/dL for SC, SD, TC, TD, respectively;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ ) and hyperinsulinemia (blood insulin levels:  $1.10 \pm 0.2$ ,  $23.01 \pm 0.8$ ,  $1.21 \pm 0.2$ ,  $21.66 \pm 0.6$  ng/mL for SC, SD, TC, TD, respectively;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ ) in SD and TD rats and insulin resistance (IR) only in SD rats (Rate for glucose disappearance - *Kitt*:  $3 \pm 0.2$ ,  $1.8 \pm 0.1$ ,  $3.6 \pm 0.2$ ,  $3.2 \pm 0.4$  for SC, SD, TC, TD, respectively;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ ). Additionally, it reduced total insulin content (CT:  $191.6 \pm 21.5$ ,  $97.1 \pm 17.1$ ,  $370.3 \pm 46.5$ ,  $185.6 \pm 16.3$  ng/islet for SC, SD, TC, TD, respectively;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ ) and increased reactive oxygen species levels (ROS) in pancreatic islets from SD and TD rats vs respective controls (ROS: 2.8 mM of glucose:  $41.3 \pm 2.6$ ,  $54 \pm 1.3$ ,  $23.4 \pm 1.5$ ,  $38.9 \pm 4$  UF/ug proteína; 22 mM of glucose:  $33.3 \pm 1.7$ ,  $38.4 \pm$

0.5,  $10.1 \pm 1.6$ ,  $28 \pm 1.2$  UF/ug protein for SC, SD, TC, TD, respectively;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ ). Of note, the exercise training was able to prevent IR and to reduce by 23% the fasting blood glucose levels in TD vs. SD rats. Exercise training also induced an augmentation in CT and in insulin response to stimulating glucose concentration (11.1mM) in isolated islets from TC and TD rats (Insulin secretion in 11.1 mM of glucose:  $1.4 \pm 0.2$ ,  $4.2 \pm 0.2$ ,  $3.3 \pm 0.2$ ,  $5.6 \pm 0.5$  ng/mL per islet per hour, for SC, SD, TC, TD, respectively;  $n = 12$ ;  $P < 0.05$ ). Still, exercise training induced an increase in the catalase protein levels, an antioxidant enzyme (CAT:  $100 \pm 14.1$ ,  $113.8 \pm 14.2$ ,  $151.6 \pm 10.2$ ,  $183.2 \pm 11.2$ , expressed as % SC, for SC, SD, TC, TD, respectively;  $n = 6$ ;  $P < 0.05$ ), as well as reduction in ROS levels in TC and TD islets. Based on these data, we suggest that the moderate exercise training may improve glucose homeostasis and prevent oxidative stress in pancreatic islets.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXOS.....	96

**- LISTA DE ABREVIATURAS -**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ABTS** – 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolína sulfonato]

**ACTH** – hormônio adrenocorticotrópico

**ADP** – adenosina difosfato

**AGL** – ácido graxo livre

**AMPc** – adenosina monofosfato cíclico

**AMPK** – proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

**ANOVA** – análise de variância

**APS** – molécula adaptadora contendo domínios PH e SH2

**ATP** – adenosina trifosfato

**CAT** – catalase

**CRH** – hormônio liberador de corticotropina

**Cu/ZnSOD** – cobre/zinco superóxido dismutase

**DAG** - diacilglicerol

**DEPC** – dimetil pirocarbonato

**DEX** – dexametasona

**DCFH** – 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

**DCFH-DA** – 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

**DNA** – ácido desoxirribonucléico

**dNTP** – desoxirribonucleotídeo fosfatado

**DTT** – ditioneitol

**EPM** – erro padrão da média

**ERO** – espécie reativa de oxigênio

**FADH<sub>2</sub>** – flavina adenida dinucleotídeo

**G6Pase** – glicose-6-fosfatase

**GDP** – guanosina difosfato

**GLUT-2** – transportador de glicose 2

**GLUT-4** – transportador de glicose 4

**GPx** – glutaciona peroxidase

**GR** – receptor de glicocorticóide

**GRE** – elemento responsivo ao glicocorticóide

**GSH** – glutaciona

**GSK3** - glicogênio sintase quinase 3

**GTP** – guanosina trifosfato

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio

**HPA** – eixo hipotálamo – hipófise – adrenal

**HRP** – horseradish peroxidase

**HUVEC** - células endoteliais de veia umbilical humana

**IGF-1** – fator de crescimento semelhante a insulina 1

**ipITT** – teste de tolerância à insulina intraperitoneal

**IP3** – inositol 1-4-5-trifosfato

**IR** – receptor de insulina

**IRS** – substrato do receptor de insulina

**IRS1** – substrato do receptor de insulina 1

**IRS2** – substrato do receptor de insulina 2

**JAK2** – proteína janus quinase 2

**JNK** – Jun-N-terminal quinase

**K<sub>it</sub>** – constante de decaimento da glicose

**MAPK** – proteína quinase ativada por mitógeno

**MnSOD** – manganês superóxido dismutase

**mRNA** – RNA mensageiro

**NADH** – nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NADPH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NEFA** – ácidos graxos não esterificados

**NF-κB** – fator nuclear kappa B

**NO** – óxido nítrico

**NOX-2** – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase 2

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - radical ânion superóxido

**OH** – radical hidroxila

**P70<sup>s6k</sup>** – proteína 70 S6 quinase

**PCR** – reação em cadeia da polimerase

**PDE3B** – fosfodiesterase 3B

**PDK-1** – proteína quinase fosfoinositol-dependente 1

**PEPCK** – fosfoenolpiruvato carboxiquinase

**PI3K** – fosfatidilinositol 3 quinase

**PIP2** – fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

**PIP3** – fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

**PKA** – proteína quinase A

**PKB** – proteína quinase B

**PKC** – proteína quinase C

**PLC** – fosfolipase C

**PP1** – proteína fosfatase 1

**RNA** – ácido ribonucléico

**RIA** – radioimunoensaio

**RINm5F** – insulínoma de rato m5F

**RT-PCR** – reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

**SC** – sedentário controle

**SD** – sedentário tratado com dexametasona

**SDS** – dodecil sulfato de sódio

**SOD** – superóxido dismutase

**TAC** – capacidade antioxidante total

**TC** – treinado controle

**TCA** – ciclo do ácido tricarbóxico

**TD** – treinado tratado com dexametasona

**TEM (1/2 ou 3)** – teste de esforço máximo (1/2 ou 3)

**TG** – triglicerídeos

**- LISTA DE FIGURAS -**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão geral dos processos celulares envolvidos com a secreção de insulina pelas células $\beta$ pancreáticas.....	4
<b>Figura 2.</b> Transdução do sinal na ação insulínica.....	7
<b>Figura 3.</b> Fluxo de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial e produção de $O_2^-$ .....	14
<b>Figura 4.</b> Principais vias responsáveis pela produção intracelular de EROs e enzimas envolvidas em sua degradação.....	16
<b>Figura 5.</b> Delineamento dos grupos experimentais utilizados.....	26
<b>Figura 6.</b> Modelo do protocolo diário de treinamento físico utilizado.....	27
<b>Figura 7.</b> Mecanismo geral de ação da sonda fluorescente DCFH-DA, utilizada para determinação de EROs em meio intracelular.....	32
<b>Figura 8.</b> Desempenho físico de ratos sedentários e treinados ao longo das 8 semanas do protocolo experimental.....	40

<b>Figura 9.</b> Peso corpóreo de ratos sedentários e treinados ao longo das 8 semanas do protocolo experimental.....	42
<b>Figura 10.</b> Treinamento físico melhora a sensibilidade periférica à insulina em ratos tratados com DEX.....	44
<b>Figura 11.</b> Níveis de secreção de insulina frente ao estímulo por glicose em experimento de incubação estática com ilhotas pancreáticas isoladas dos quatro grupos experimentais.....	46
<b>Figura 12.</b> Conteúdo total de insulina em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	47
<b>Figura 13.</b> Níveis intracelulares de EROs em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	49
<b>Figura 14.</b> Expressão gênica da enzima antioxidante mitocondrial MnSOD em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	50
<b>Figura 15.</b> Expressão gênica da enzima antioxidante citosólica Cu/ZnSOD em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	51
<b>Figura 16.</b> Expressão protéica da Cu/ZnSOD (SOD-1) em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	52

<b>Figura 17.</b> Expressão gênica da enzima antioxidante catalase em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	53
<b>Figura 18.</b> Expressão protéica da catalase em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	54
<b>Figura 19.</b> Expressão gênica da enzima antioxidante GPx em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	55
<b>Figura 20.</b> Expressão protéica da GPx em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.....	56
<b>Figura 21.</b> Capacidade antioxidante total sérica para os quatro grupos experimentais.....	57

**- LISTA DE TABELAS -**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Seqüência dos primers utilizados (Applied Biosystems).....	35
<b>Tabela 2.</b> Peso Corpóreo dos quatro grupos experimentais no início e término do tratamento com salina ou dexametasona.....	42
<b>Tabela 3.</b> Glicose Sanguínea e Parâmetros Séricos obtidos no estado de jejum para os grupos Sedentário e Treinado.....	43

# **- INTRODUÇÃO -**

## INTRODUÇÃO

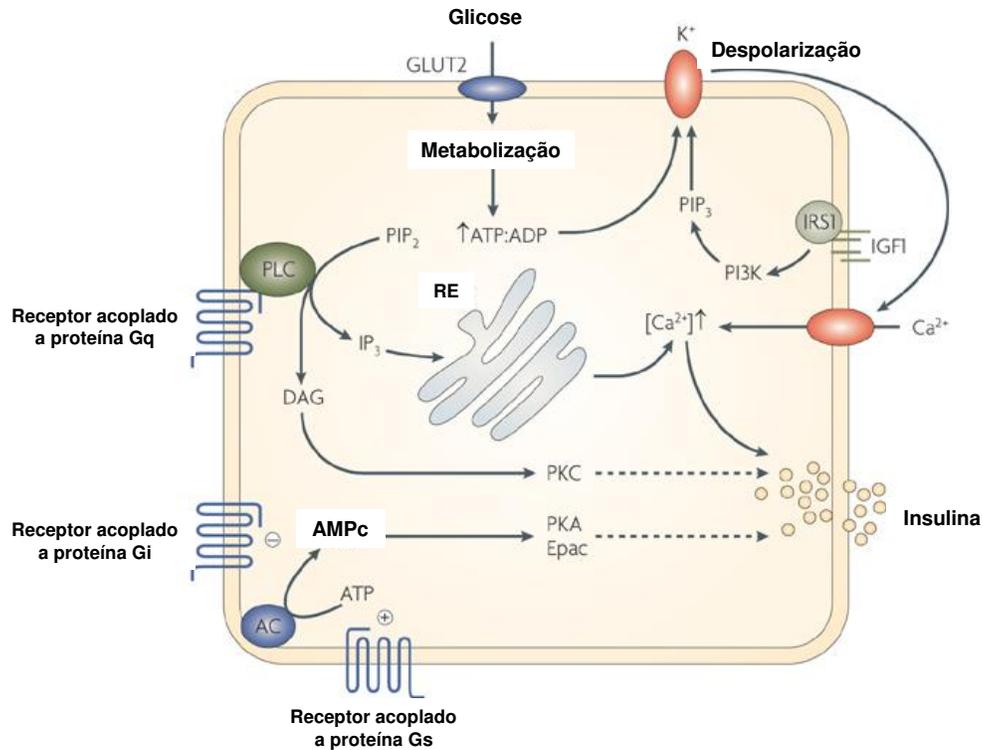
### 1) Mecanismos gerais de secreção e ação da insulina

A manutenção de níveis adequados de nutrientes circulantes, em especial da glicose, é fundamental para a sobrevivência do organismo. No estado alimentado a insulina, hormônio secretado pelas células  $\beta$  pancreáticas, é o principal regulador desta manutenção enquanto que durante o jejum esta manutenção depende da ação de vários hormônios contra-regulatórios, como o glucagon e o cortisol. A secreção de insulina pode ser modulada, direta ou indiretamente, por hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos. Esse controle multifatorial permite que as células  $\beta$  secretem insulina em quantidade e tempo adequados, regulando adequadamente os níveis de nutrientes no sangue em diferentes situações fisiológicas, tais como: jejum, refeição, exercício, gravidez, lactação, crescimento e velhice.

O estímulo para a secreção de insulina (**FIGURA 1**) ocorre, principalmente, por substratos energéticos metabolizáveis pelas células  $\beta$ , sendo a glicose o agente estimulador mais importante. Esta é transportada para o interior da célula  $\beta$  por uma proteína integral de membrana, o GLUT-2, sendo a seguir fosforilada a glicose-6-fosfato pela enzima glicocinase. O piruvato derivado da glicólise é direcionado para a mitocôndria onde ocorre, então, um aumento na produção de ATP. O aumento da razão ATP/ADP no citosol da célula  $\beta$  induz o fechamento de canais de  $K^+$  sensíveis às concentrações de ATP (canais  $K_{ATP}$ ) presentes na membrana plasmática. O acúmulo relativo deste cátion na célula provoca despolarização da membrana e conseqüente ativação de permeabilidade ao  $Ca^{2+}$ .

Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  penetram na célula por gradiente eletroquímico através de canais voltagem-dependente específicos (canais L). A elevação dos níveis intracelulares deste íon ativa a maquinaria secretória, ocorrendo migração dos grânulos de insulina para a membrana plasmática e posterior extrusão de seu conteúdo (revisado por BOSCHERO et al., 1996).

Além disso, o estímulo para a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pode ocorrer por ativação de isoformas da fosfolipase C (PLC), com consequente hidrólise de fosfolípidos de membrana, como o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), e formação de inositol 1-4-5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> ativa os canais de cálcio localizados na membrana do retículo endoplasmático promovendo saída deste íon, o que contribui para o aumento de sua concentração no citosol. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) e esta fosforila proteínas envolvidas no processo de translocação e exocitose dos grânulos de insulina. O aumento nas concentrações intracelulares de AMP cíclico (AMPc) por atividade da enzima adenilil ciclase pode, ainda, ativar a proteína quinase A (PKA). O  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico age de várias maneiras para aumentar a taxa de exocitose dos grânulos de insulina, sendo requerido para a ativação da PKC e PKA, que por sua vez fosforilam proteínas específicas para a iniciação do processo exocitótico, além de proteínas quinases importantes para o processo de translocação dos grânulos de insulina dos estoques intracelulares para periferia da célula (revisado por AHRÉN, 2009).



**FIGURA 1. Visão geral dos processos celulares envolvidos com a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas.** A glicose, transportada para o interior das células  $\beta$  pelo GLUT-2 é metabolizada gerando ATP, o que aumenta a razão ATP:ADP inibindo a permeabilidade ao  $K^+$  pelo fechamento dos canais  $K_{ATP}$ . O acúmulo intracelular de  $K^+$  leva a despolarização da membrana plasmática e abertura de canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes, levando ao influxo e aumento nas concentrações intracelulares deste cátion. O  $Ca^{2+}$  é requerido para a ativação da PKC e PKA, que por sua vez fosforilam proteínas importantes para a translocação e exocitose dos grânulos de insulina (ilustrado pelas setas pontilhadas). O  $Ca^{2+}$  é, ainda, um cofator para a ativação da enzima PLC que hidrolisa fosfolípidos de membrana, como o PIP<sub>2</sub>, em DAG e IP<sub>3</sub>. DAG ativa PKC e IP<sub>3</sub> libera  $Ca^{2+}$  do retículo endoplasmático (RE). Outra via de sinalização é a ativação da adenilil ciclase, que resulta em aumento nos níveis intracelulares de AMPc, que por sua vez ativa PKA. Outra via é induzida pelo substrato do receptor de insulina 1 (IRS1), que resulta em ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), formando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), que atua sobre os canais de  $K^+$ . Vários receptores acoplados a proteína G influenciam essas vias dependendo da proteína G que é ativada (Gq, Gi ou Gs). Assim, Gq ativa PLC, enquanto Gi inibe e Gs estimula a formação de AMPc. IGF1 - fator de crescimento semelhante a insulina 1 (Adaptado de AHRÉN, 2009).

Após secretada a insulina segue pela corrente sanguínea até seus tecidos-alvo, iniciando suas ações através da ligação a um receptor específico presente na membrana plasmática, uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina quinase intrínseca, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , que atua como uma enzima

alostérica na qual a subunidade  $\alpha$  inibe a atividade tirosina quinase da subunidade  $\beta$  (**FIGURA 2**). A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, o que aumenta a atividade quinase do receptor (revisado por CARVALHEIRA et al., 2002).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em resíduos de tirosina. Entre esses substratos encontram-se os pertencentes a família dos substratos do receptor de insulina (proteínas IRS) e outros como Shc, Gab-1, p60<sup>dok</sup>, Cbl, JAK2 e APS. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para diversas moléculas, destacando-se a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (revisado por CARVALHEIRA et al., 2002). A PI3K, proteína originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85), apresenta importante papel na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulado por insulina. O produto gerado pela PI3K, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), pode regular a atividade da proteína quinase fosfoinositol-dependente 1 (PDK-1), uma serina/treonina quinase que fosforila e ativa outra serina/treonina quinase conhecida por Akt ou proteína quinase B (PKB). A Akt possui um domínio capaz de interagir diretamente com PIP3, o que promove o direcionamento da proteína para a membrana celular, bem como sua atividade catalítica. Seus efeitos são dependentes da ativação de várias quinases intracelulares envolvidas na transmissão do sinal insulínico até a captação de glicose, a síntese de glicogênio e a síntese protéica. Além de fosforilar a Akt, há evidências de que a PDK-1 seja capaz de, em resposta à insulina, fosforilar isoformas atípicas da PKC ( $\zeta$  e  $\lambda$ ) envolvidas na síntese protéica e no transporte de vesículas contendo o transportador de glicose GLUT-4 para a membrana plasmática (**FIGURA 2**), em células

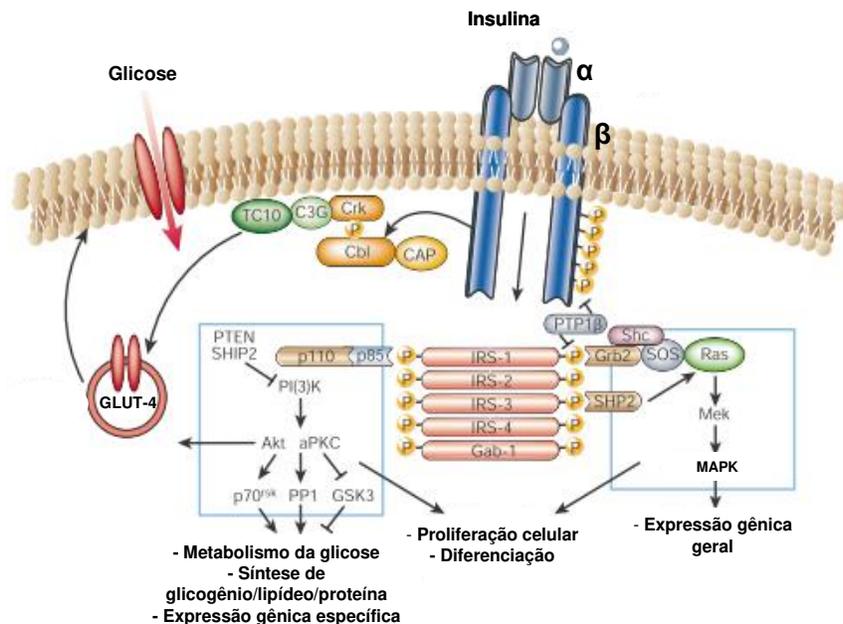
musculares e adipócitos, para promover a captação de glicose (revisado por ZECCHIN et al., 2004).

Entre as ações da insulina, destaca-se seu efeito inibitório sobre a produção e liberação de glicose pelo fígado através do bloqueio dos processos de gliconeogênese e glicogenólise. O acúmulo de glicogênio é estimulado pela insulina através do aumento do transporte de glicose no músculo e síntese de glicogênio em fígado e músculo. Este último efeito é obtido por ativação da enzima glicogênio sintase, através de sua desfosforilação. Após estímulo com insulina a Akt fosforila e inativa a glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio sintase aumentando sua atividade. A insulina também ativa a proteína fosfatase 1 (PP1), por um processo dependente da PI3K, que desfosforila a glicogênio sintase diretamente (**FIGURA 2**). Na gliconeogênese, a insulina inibe diretamente a transcrição do gene que codifica a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave no controle desse processo. O hormônio também diminui a taxa de transcrição dos genes que codificam as enzimas frutose-1-6-bisfosfatase e a glicose-6-fosfatase (G6Pase), envolvidas com o processo gliconeogênico, além de aumentar a transcrição gênica de enzimas glicolíticas como a glicocinase e a piruvato quinase (revisado por SALTIEL & KAHN, 2001; revisado por CARVALHEIRA et al., 2002).

Semelhante aos efeitos sobre o metabolismo dos carboidratos, a insulina estimula o armazenamento e inibe a degradação de lipídeos. Em adipócitos, a insulina reduz a lipólise através da inibição da enzima lipase hormônio-sensível. Esta enzima é ativada pela PKA, que por sua vez tem sua atividade reduzida pela insulina, através da ativação da fosfodiesterase AMPc específica (PDE3B), que reduz os níveis de AMPc nos adipócitos. A insulina é capaz, ainda, de aumentar a síntese e bloquear a degradação de proteínas através

da ativação da mTOR. A mTOR controla a translação de proteínas diretamente através da fosforilação da proteína 70 S6 quinase (p70<sup>rsk</sup>) (**FIGURA 2**), que ativa a síntese ribossomal de proteínas através da fosforilação da proteína S6 (revisado por SALTIEL & KAHN, 2001; revisado por CARVALHEIRA et al., 2002).

Além de ações sobre o metabolismo, a insulina atua de forma semelhante a outros fatores de crescimento, estimulando a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (**FIGURA 2**). Essa via é iniciada com a fosforilação das proteínas IRS e/ou Shc, que interagem com a proteína Grb2. A Grb2 está constitutivamente associada à SOS, proteína que troca GDP por GTP da Ras ativando-a. Uma vez ativada, Ras estimula a fosforilação em serina da cascata da MAPK que leva a proliferação e diferenciação celular (revisado por SALTIEL & KAHN, 2001; revisado por CARVALHEIRA et al., 2002).



**FIGURA 2. Transdução do sinal insulínico.** O receptor de insulina é uma tirosina quinase capaz de se autofosforilar após ligação da insulina, e catalisa a fosforilação de proteínas como os membros da família IRS, Shc e Cbl. Após fosforilação em tirosina essas proteínas promovem a ativação de vias de sinalização diversas, incluindo ativação da PI3K, Ras e a cascata da MAP quinase, e Cbl/CAP com ativação de TC10. Estas vias agem para regular a translocação de vesículas, a síntese protéica, a ativação e inativação de enzimas, e a expressão gênica, regulando o metabolismo da glicose, lipídios e proteínas (Adaptado de SALTIEL & KAHN, 2001).

## **2) Glicocorticóides, resistência periférica à insulina e diabetes**

Os hormônios glicocorticóides são produzidos por células do córtex da glândula adrenal sob regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Os glicocorticóides são essenciais à vida, desempenhando papéis chave na regulação da homeostase fluida e eletrolítica, da pressão sanguínea, do sistema imune, do metabolismo e da resposta fisiológica ao estresse. A secreção de glicocorticóides segue um ritmo circadiano regulado pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo, com os níveis plasmáticos de cortisol alcançando um pico no início das atividades (por exemplo, no início da manhã em humanos) e em resposta ao estresse. A secreção dos glicocorticóides é auto-regulada por mecanismo de feedback negativo onde os glicocorticóides regulam a secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) aos níveis do hipotálamo e hipófise (ou pituitária) (revisado por REYNOLDS & WALKER, 2003).

Ao nível celular, os glicocorticóides exercem seus efeitos através da ligação a um receptor intracelular específico, o receptor de glicocorticóide (GR), que existe como duas isoformas. O GR é membro de uma superfamília de receptores nucleares para fatores de transcrição. Após ligar-se ao glicocorticóide no citosol, o GR é liberado de um complexo inativo formado com proteínas de choque térmico e transloca-se para o núcleo onde atua como regulador transcricional para genes-alvo específicos que contenham elementos responsivos aos glicocorticóides (GREs), podendo essa regulação ser positiva ou negativa no sentido de estimular ou inibir a transcrição gênica, respectivamente. Além de sua atividade como regulador transcricional para genes específicos, grande parte da ação do GR está na sua capacidade de interação direta proteína-proteína com outros reguladores transcpcionais podendo, dessa forma, controlar um grupo distinto de genes-alvo (revisado

por VEGIOPOULOS & HERZIG, 2007). Entre os genes mais conhecidos regulados pelo GR estão aqueles envolvidos com a gliconeogênese hepática, diferenciação de adipócitos e inflamação (revisado por WANG, 2005).

As ações metabólicas dos glicocorticóides são antagonicas as da insulina, possuindo diferentes efeitos sobre os tecidos hepático, muscular e adiposo. No fígado, os glicocorticóides induzem a via gliconeogênica através da ativação do GR, que estimula a expressão da PEPCK e G6Pase, as principais enzimas gliconeogênicas. Isto resulta em aumento da liberação hepática de glicose e hiperglicemia. Nos tecidos muscular e adiposo, os glicocorticóides antagonizam a captação e utilização de glicose induzidas pela insulina. Além disso, favorecem a lipólise no tecido adiposo através da ativação da enzima lipase hormônio-sensível e estimulam a proteólise no tecido muscular esquelético (revisado por CARVALHO & SAAD, 1998; revisado por WANG, 2005).

Resistência à insulina e hiperinsulinemia são características frequentemente associadas com um grupo de fatores de risco como obesidade, dislipidemia, hipertensão e redução na tolerância à glicose. Esse grupo de anormalidades metabólicas, definido pela primeira vez como Síndrome X por Reaven em 1988 é, atualmente, referida como Síndrome Metabólica. Pela definição atual, a Síndrome Metabólica é caracterizada por uma coleção de anormalidades metabólicas como resistência periférica à insulina, obesidade, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão. Nem todas as desordens características da Síndrome Metabólica devem, necessariamente, ser observadas no mesmo indivíduo. A maioria das pessoas com essa síndrome exibe resistência à insulina, que por sua vez pode levar a intolerância à glicose e a hiperglicemia diabética. Embora os mecanismos responsáveis pela patogênese da Síndrome Metabólica não estejam totalmente claros,

obesidade, resistência à insulina e outros fatores independentes com origem vascular e imunológica parecem estar envolvidos (revisado por WANG, 2005).

Diversas observações clínicas têm associado o excesso de glicocorticóides com o surgimento de Síndrome Metabólica. Na Síndrome de Cushing, o aumento na secreção de glicocorticóides que ocorre principalmente pela presença de adenomas hipofisários leva a obesidade central, hipertensão, hiperlipidemia e intolerância à glicose. Além disso, a administração clínica de glicocorticóides sintéticos para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas tem sido associada com efeitos metabólicos adversos como hipertensão, obesidade, hiperlipidemia e resistência periférica à insulina (revisado por WANG, 2005). Devido às características diabetogênicas dos glicocorticóides a administração de formas sintéticas pode, dependendo da dose e/ou do tempo de tratamento, induzir resistência periférica à insulina ou levar ao diabetes tipo 2 (JEONG et al., 2001).

Apesar da insulina apresentar efeitos pleiotrópicos o termo “resistência à insulina” refere-se a ação do hormônio sobre a homeostase da glicose, sendo definido como uma resposta fisiológica subnormal a uma concentração definida de insulina (revisado por CARVALHO & SAAD, 1998). Defeitos na ação da insulina normalmente precedem o surgimento de hiperglicemia severa sendo compensados, inicialmente, por aumento na secreção de insulina que, por sua vez, permite a manutenção dos níveis glicêmicos normais. Essa compensação deve ser alcançada pelo aumento da secreção de insulina por células  $\beta$  pancreáticas individuais ou, como notado em roedores, por aumento na massa de células  $\beta$ . O aumento na massa de células  $\beta$  pode ser alcançado por hipertrofia dessas células, por replicação de células  $\beta$  pré-existentes (hiperplasia), por neogênese a partir de células precursoras presentes no epitélio do ducto pancreático, ou por alterações na taxa de sobrevivência das células  $\beta$ . Os fatores extracelulares e intracelulares exatos responsáveis

por esta compensação não são totalmente conhecidos, mas está claro que o diabetes surge quando a superprodução de insulina falha em compensar os defeitos na ação desta. Em humanos, a obesidade é uma condição frequentemente associada com o quadro de resistência à insulina, entretanto a maioria das pessoas obesas não desenvolve diabetes porque a hiperinsulinemia consegue compensar de forma adequada a ação deficiente da insulina nos tecidos periféricos. O diabetes apenas ocorre quando essa compensação é inadequada ou quando a função das células  $\beta$  deteriora (revisado por BURKS & WHITE, 2001).

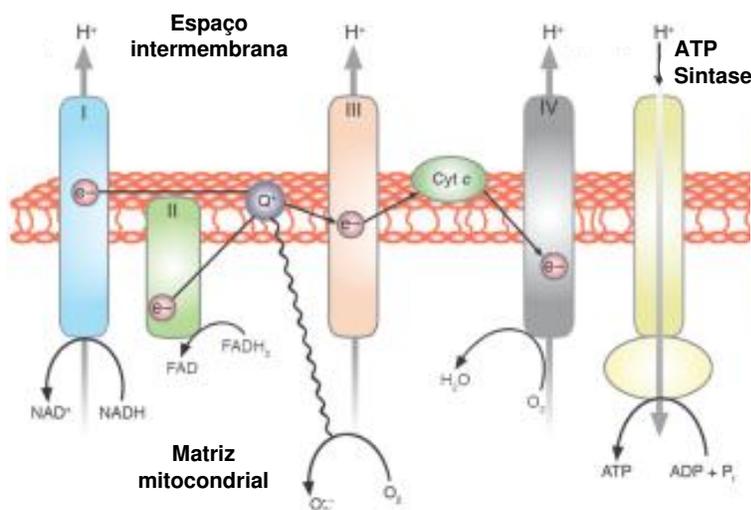
### **3) Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e Estresse oxidativo**

Espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser classificadas em 2 grupos, radicais e não- radicais. O grupo dos radicais contém componentes como o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), peroxil ( $\cdot ROO$ ) e radicais alcoxil ( $\cdot RO$ ). Essas espécies são ditas radicais por conterem pelo menos um elétron não-emparelhado ao redor do núcleo, resultando em alta reatividade pela tendência em doar ou obter outro elétron a fim de alcançar estabilidade. O grupo de componentes não- radicais contém uma grande variedade de substâncias, algumas das quais são extremamente reativas embora não sejam radicais por definição. Entre esses componentes produzidos em elevadas concentrações em células vivas estão o ácido hipocloroso (HClO), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), peróxidos orgânicos, aldeídos e o oxigênio singlete ( $\Delta GO_2$ ) (revisado por KOHEN & NYSKA, 2002). Os diversos tipos celulares que compõem um organismo são constantemente expostos a uma grande variedade de EROs de origem endógena ou exógena (KOHEN & GATI, 2000). O metabolismo mitocondrial é o principal responsável pela produção intracelular de EROs.

Na mitocôndria, durante o processo de fosforilação oxidativa, o aumento no fluxo de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial permite o aumento na produção de ATP. O processo é iniciado com o transporte do piruvato, derivado da glicólise, para o interior da mitocôndria onde é oxidado no ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido tricarboxílico - TCA) para produzir os equivalentes redutores NADH e FADH<sub>2</sub>. O fluxo de elétrons através da cadeia respiratória é conduzido por 4 complexos enzimáticos associados a membrana mitocondrial interna, além do Citocromo C e Coenzima Q (**FIGURA 3**). O NADH, produzido no ciclo de Krebs doa elétrons ao Complexo I. O Complexo I transfere seus elétrons para a Coenzima Q, que também pode ser reduzida por elétrons doados por FADH<sub>2</sub> desidrogenases, como a Succinato-Ubiquinona redutase (Complexo II). Os elétrons são então transportados da Coenzima Q para o Complexo III, Citocromo C, Complexo IV e finalmente transferidos para o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), que é reduzido por 4 elétrons para formar H<sub>2</sub>O. Durante o metabolismo normal, moléculas de oxigênio reduzidas de forma incompleta, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo o radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), podem ser produzidas. Normalmente, apenas 0,1% do oxigênio total consumido escapa da cadeia respiratória para gerar EROs (revisado por ROLO & PALMEIRA, 2006).

A transferência de elétrons através dos complexos I, III e IV gera um gradiente de prótons no espaço intermembrana mitocondrial. A energia derivada desse gradiente eletroquímico é usada pela ATP Sintase para a síntese de ATP (**FIGURA 3**). A amplitude do gradiente eletroquímico de prótons, que é conhecido como controle respiratório, regula a taxa total de transporte de elétrons pela cadeia respiratória. Em condições hiperglicêmicas, quando o metabolismo glicolítico e mitocondrial é aumentado contribuindo para o aumento na produção dos equivalentes redutores NADH e FADH<sub>2</sub>, a diferença de potencial

eletroquímica gerada pelo gradiente de prótons torna-se elevada, e o transporte de elétrons do Complexo III é parcialmente inibido resultando em acúmulo de elétrons na Coenzima Q e sua doação para o  $O_2$ , levando ao aumento na geração de  $O_2^-$  (**FIGURA 3**) (revisado por BROWNLEE, 2003). Por esse motivo, níveis glicêmicos cronicamente elevados podem resultar em acentuada produção de EROs em inúmeros tecidos (EVANS et al., 2002).



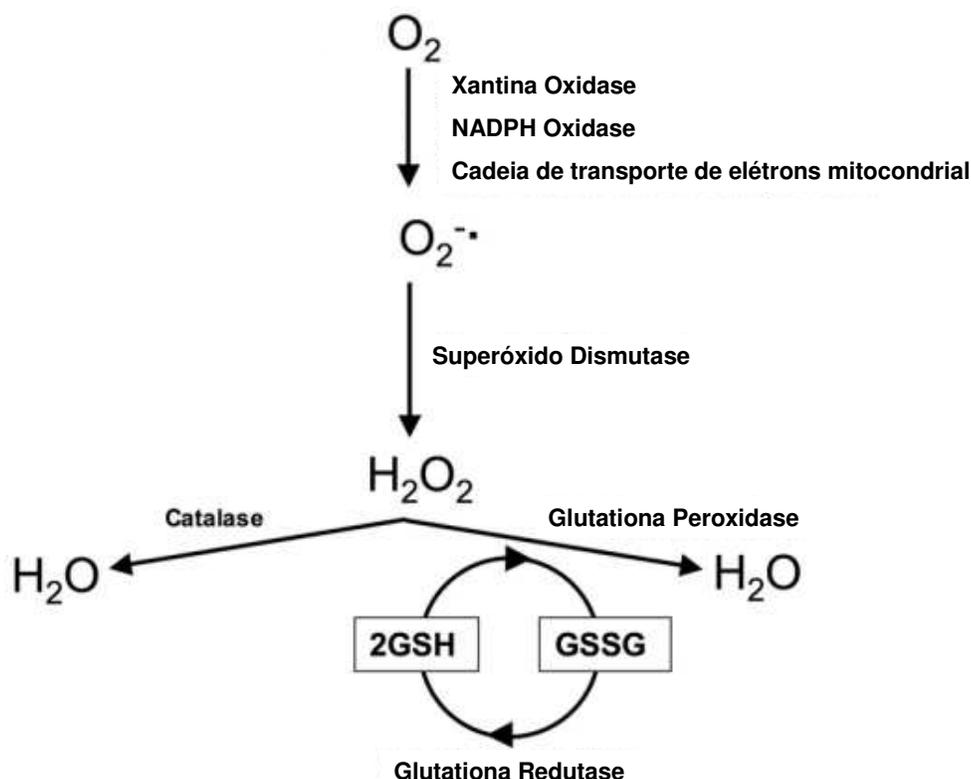
**FIGURA 3. Fluxo de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial e produção de  $O_2^-$ .** Quatro complexos enzimáticos participam do fluxo de elétrons, além do Citocromo C e Coenzima Q. O equivalente redutor NADH doa elétrons ao Complexo I que, a seguir, transfere seus elétrons para a Coenzima Q, que também pode ser reduzida por elétrons doados pelo Complexo II. Da Coenzima Q os elétrons são transportados para o Complexo III, Citocromo C, Complexo IV e finalmente transferidos para o  $O_2$ , que é reduzido por 4 elétrons para formar  $H_2O$ . A energia derivada do gradiente de prótons gerado no espaço intermembrana é usada pela ATP Sintase para a síntese de ATP. Em condições hiperglicêmicas, o potencial eletroquímico gerado pelo gradiente de prótons é aumentado, inibindo o transporte de elétrons do Complexo III, sendo esses elétrons doados para o  $O_2$ , levando ao aumento na geração de  $O_2^-$  (Adaptado de BROWNLEE, 2003).

A contínua exposição a EROs resulta em dano oxidativo cumulativo a importantes componentes celulares, podendo levar a alterações estruturais e/ou funcionais desses componentes (GRACY et al., 1999). Proteínas, lipídeos de membrana e desoxiribonucleotídeos são os alvos biológicos mais vulneráveis ao dano oxidativo. Por

esse motivo, o organismo deve controlar continuamente a presença de agentes pró-oxidantes e antioxidantes, sendo esse balanço conhecido como potencial redox (HRBAC & KOHEN, 2000; revisado por KOHEN & NYSKA, 2002). Qualquer alteração deste balanço em qualquer direção pode ser prejudicial para células específicas e para o organismo como um todo. O aumento das concentrações de agentes pró-oxidantes em detrimento dos antioxidantes é definido como estresse oxidativo.

Entre os vários mecanismos de defesa do organismo contra EROs, o sistema antioxidante recebe grande destaque devido a sua atuação em remover diretamente os agentes pró-oxidantes, assegurando máxima proteção aos alvos biológicos. O sistema antioxidante é formado por 2 grupos de substâncias: 1) enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) e 2) componentes antioxidantes não-enzimáticos, alguns produzidos pelo próprio organismo e outros obtidos através da dieta, como as vitaminas C e E,  $\beta$ -caroteno, ácido úrico, albumina, bilirrubina, entre outros. As enzimas antioxidantes atuam em uma cascata de reações que se inicia com a atividade da SOD, que é capaz de aumentar a dismutação dos  $O_2^-$ . O produto final da reação de dismutação – peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) – pode ser removido por atividade da enzima CAT ou por outras peroxidases, incluindo a GPx (CUZZOCREA et al., 2001). A catalase é uma enzima de elevado  $K_m$  e pode, por esse motivo, remover  $H_2O_2$  presente em altas concentrações. Em contraste com a catalase, a peroxidase é efetiva na remoção de  $H_2O_2$  quando este está presente em baixas concentrações (LARDINOIS, 1995). A glutatona é um antioxidante de baixo peso molecular, cuja forma reduzida (GSH) está presente em elevadas concentrações em humanos, animais, plantas e bactérias aeróbias. Ela pode atuar como substrato para a enzima peroxidase (formando a GPx), que participa da decomposição de  $H_2O_2$ , ou pode ainda atuar diretamente na destruição de EROs (KOHEN

& NYSKA, 2002). As principais vias responsáveis pela produção intracelular de EROs e as enzimas envolvidas em sua degradação são mostradas na **FIGURA 4**.



**FIGURA 4.** Principais vias responsáveis pela produção intracelular de EROs e enzimas envolvidas em sua degradação. O  $O_2^{\cdot-}$  pode ser gerado no meio intracelular por enzimas especializadas, como a Xantina ou NADPH Oxidases, ou como um sub-produto do metabolismo celular, particularmente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A enzima SOD converte o  $O_2^{\cdot-}$  formado a  $H_2O_2$  que, por sua vez, deve ser rapidamente removido do sistema. Esta remoção é feita, geralmente, por ação da CAT ou peroxidases, como a GPx que usa GSH como doador de elétrons (Adaptado de AITKEN & ROMAN, 2008).

Muitas patologias já foram descritas na literatura onde EROs foram importantes para a iniciação da doença ou foram produzidos durante o seu curso, como é o caso de muitos tipos de cânceres, aterosclerose e outras patologias cardiovasculares, inflamações crônicas, doenças do trato intestinal, doenças degenerativas cerebrais, patologias

isquêmicas e pós-isquêmicas e diabetes (KOHEN & NYSKA, 2002). Estudos recentes tem mostrado que o aumento da produção de EROs em quadros crônicos de hiperglicemia, é responsável pela ativação de vias de sinalização estresse-sensíveis como fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e as serina/treonina-quinases p38 MAPK e JNK que, por sua vez, contribuem para a gênese de várias formas de resistência à insulina e disfunção de células  $\beta$  pancreáticas, características observadas no diabetes tipo 2 (EVANS et al., 2002; EVANS et al., 2005).

A ativação dessas serina/treonina-quinases pelo estresse oxidativo é responsável pela fosforilação do receptor de insulina (IR) e/ou dos substratos do receptor de insulina (IRS) em resíduos de serina ou treonina reduzindo, dessa forma, a extensão de sua fosforilação em resíduos de tirosina o que compromete a ação da insulina. Os IRS fosforilados em serina/treonina apresentam redução da capacidade de se associarem ao IR e outras moléculas alvo da via de sinalização da insulina, especialmente a PI3K, resultando em deficiência da ação da insulina, incluindo diminuição da ativação da Akt e do transporte de glicose (EVANS et al., 2002). Vários trabalhos confirmam essa hipótese, demonstrando que o aumento nos níveis intracelulares de EROs estimula a fosforilação em treonina da JNK, uma quinase previamente ligada à resistência à insulina por promover a fosforilação de proteínas IRS em resíduos de serina (HIROSUMI et al., 2002; KANETO et al., 2004). Além desse efeito sobre os tecidos-alvo da insulina, outros experimentos mostram ainda que a ativação da JNK por estresse oxidativo está envolvida com a redução da expressão do gene da insulina, e a supressão da via da JNK parece proteger as células  $\beta$  pancreáticas contra o estresse oxidativo e consequente perda de função dessas células (KANETO et al., 2002). Células  $\beta$  pancreáticas são extremamente vulneráveis ao estresse oxidativo por possuírem quantidades bastante reduzidas das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT (LENZEN et al., 1996; TIEDGE et al., 1997).

#### **4) Efeitos do treinamento físico em condições normais e patológicas**

O exercício físico aeróbio crônico, também chamado de treinamento físico, tem sido indicado nos últimos anos com finalidade preventiva e/ou terapêutica para inúmeras condições patológicas (DORN et al., 2001) como o diabetes, hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia (SHOJI & FORJAZ, 2000; RYDER et al. 2001; PESCATELLO et al., 2004; AMARAL & MICHELINI, 2005). Além de agir centralmente, diminuindo a atividade nervosa simpática e atuando na liberação de diversos hormônios, o treinamento físico possui vários efeitos periféricos. Na musculatura esquelética, o exercício crônico promove aumento no número e tamanho das mitocôndrias (CEJUDO et al., 2005; HUNTER et al., 2005), hipertrofia muscular (GALVÃO et al., 2005), além de promover um aumento na densidade de vasos (AMARAL et al., 2001) melhorando, assim, o metabolismo oxidativo nesse tecido. Por esse motivo, o exercício é uma condição freqüentemente associada ao aumento da geração de EROs, principalmente devido ao dramático aumento do consumo de O<sub>2</sub> pelos tecidos ativos (COOPER et al, 2002; CAZZOLA et al., 2003; ZOPPI et al., 2003). Entretanto, a melhor estratégia para se estimular o aumento da concentração de antioxidantes endógenos pode ser o próprio estresse oxidativo e, nesse sentido, as EROs produzidas durante o exercício poderiam ativar vias de sinalização intracelulares responsáveis pelo aumento da expressão de enzimas antioxidantes (DEKKERS et al., 1996).

Tem sido proposto que a magnitude da melhora no sistema de defesa antioxidante depende das cargas de treinamento físico (MARGARITIS et al., 1997) e que as adaptações observadas em resposta ao treinamento seriam tecido-específicas, o que sugere um mecanismo regulatório complexo (LEEUWENBURGH et al., 1997). O exercício físico do

tipo crônico e moderado tem mostrado resultar em adaptações da capacidade antioxidante em músculo esquelético, protegendo essas células contra os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo e prevenindo danos celulares subsequentes (DI MEO & VENDITTI, 2001; COOPER et al., 2002). Outros estudos também demonstram o efeito modulatório do exercício físico aeróbio sobre as defesas antioxidantes em músculo esquelético de ratos, contribuindo para o aumento nas atividades da SOD, GPX, e CAT (MEYDANI et al., 1992; JENKINS, 1993; POWERS et al., 1994; LEEUWENBURGH et al., 1997; HOLLANDER et al., 2000).

Além de modular a capacidade antioxidante em músculo esquelético, o treinamento físico é bem conhecido por proporcionar aumento da sensibilidade periférica à insulina e diminuição da hiperglicemia em quadros patológicos onde esses fatores encontram-se alterados atuando, principalmente, através de melhora na utilização da glicose em músculo e diminuindo os depósitos corporais de gordura (SATO et al. 2003; HAWLEY, 2004). Uma recente pesquisa sugere, ainda, que o treinamento físico de intensidade moderada tenha efeito protetor sobre o pâncreas endócrino de ratos com diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina, através da diminuição do estresse oxidativo e preservação da integridade das células  $\beta$  pancreáticas. Nesse mesmo estudo observou-se diminuição nos níveis de peroxidação lipídica e aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT em homogenado de pâncreas obtido de ratos diabéticos treinados em comparação com ratos diabéticos sedentários. Aumento da granulação de insulina e manutenção parcial do número de células  $\beta$  pancreáticas também foram características observadas no pâncreas dos ratos diabéticos em que o exercício foi aplicado (COSKUN et al., 2004). Choi e colaboradores (2006) demonstraram, ainda, que o treinamento físico foi capaz de aumentar a massa e função das células  $\beta$  pancreáticas em ratos diabéticos, atuando especificamente no aumento

da taxa proliferativa e supressão da apoptose das mesmas. Nesse estudo, o treinamento físico foi ainda responsável pelo aumento na sensibilidade periférica a insulina, prevenindo a hiperglicemia nos animais utilizados.

## **5) Hipótese de trabalho**

Dados prévios de nosso grupo demonstraram a ocorrência de resistência periférica à insulina e intolerância à glicose em ratos tratados com DEX (1mg/kg de peso corpóreo durante 5 dias consecutivos). Além disso, foi possível observar nesse modelo hiperglicemia de jejum moderada e aumento nos níveis séricos de AGLs, acompanhado de hiperinsulinemia compensatória ao quadro de resistência à insulina instalada pelo tratamento com o glicocorticóide (RAFACHO et al., 2007; RAFACHO et al., 2008; ANGELINI et al., 2009; RAFACHO 2009). Outros resultados do grupo demonstraram, ainda, aumento nos níveis intracelulares de EROs em células de insulinoma RINm5F após incubação dessas células com DEX por 3 dias, indicando um provável efeito direto do glicocorticóide no aumento do estresse oxidativo em células secretoras de insulina. Neste mesmo trabalho, o estresse oxidativo induzido pela DEX foi responsável pelo aumento na taxa apoptótica das células RINm5F (ROMA et al., 2009).

Como descrito ao longo da introdução, diversos estudos têm associado o estresse oxidativo com o surgimento de resistência periférica à insulina, bem como com a deterioração da função das células  $\beta$  pancreáticas durante a progressão para o diabetes. A hiperglicemia crônica, observada em modelos de resistência periférica à insulina e diabetes, tem sido frequentemente associada ao aumento nos níveis intracelulares de EROs em tecidos diversos, em especial em células  $\beta$  pancreáticas. Células  $\beta$  pancreáticas são

extremamente vulneráveis ao estresse oxidativo, pois apresentam quantidades extremamente baixas de enzimas antioxidantes, em especial da enzima catalase. O treinamento físico de intensidade moderada é uma intervenção que tem mostrado ter papel positivo sobre a homeostase glicêmica e sobre a capacidade antioxidante, principalmente em músculo esquelético mas também em outros tecidos como, por exemplo, sobre o pâncreas de ratos com diabetes tipo 1. Sendo assim, seria esta intervenção capaz de aumentar a capacidade antioxidante e, dessa forma, prevenir o estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas de ratos submetidos ao tratamento com DEX? Diante desta pergunta, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do treinamento físico de intensidade moderada, realizado previamente à indução de resistência periférica à insulina por administração de DEX em ratos, sobre parâmetros metabólicos sabidamente alterados pelo tratamento com o glicocorticóide, sobre o perfil de secreção de insulina, além de parâmetros relacionados ao estado redox das ilhotas pancreáticas desses ratos.

## **- OBJETIVOS -**

## OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do treinamento físico de intensidade moderada, realizado previamente à indução de resistência periférica à insulina por administração de dexametasona em ratos, sobre parâmetros metabólicos reconhecidamente alterados pelo tratamento com glicocorticóides, sobre o perfil de secreção de insulina e sobre parâmetros relacionados ao perfil oxidativo das ilhotas pancreáticas desse modelo. Especificamente, foram analisados os seguintes parâmetros:

- 1) Peso corpóreo ao longo das 8 semanas de treinamento físico e após os 5 dias de tratamento com DEX;
- 2) Níveis glicêmicos, insulinêmicos e de triglicerídeos (TG) sérico em jejum;
- 3) Grau de sensibilidade periférica a insulina por ipITT;
- 4) Conteúdo total de insulina por ilhota;
- 5) Capacidade de secreção de insulina frente ao estímulo por glicose (2.8 e 11.1mM) em ilhotas pancreáticas isoladas;
- 6) Produção de EROs em ilhotas pancreáticas através da técnica de oxidação de DCFH-DA;
- 7) Expressão gênica das enzimas Cu/ZnSOD, MnSOD, GPx e CAT em ilhotas pancreáticas por Real Time RT-PCR;
- 8) Níveis protéicos da SOD-1 (Cu/ZnSOD), GPx-1 e CAT em ilhotas pancreáticas por Western Blot;
- 9) Capacidade antioxidante total sérica (TAC).

## **- MATERIAIS E MÉTODOS -**

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Animais*

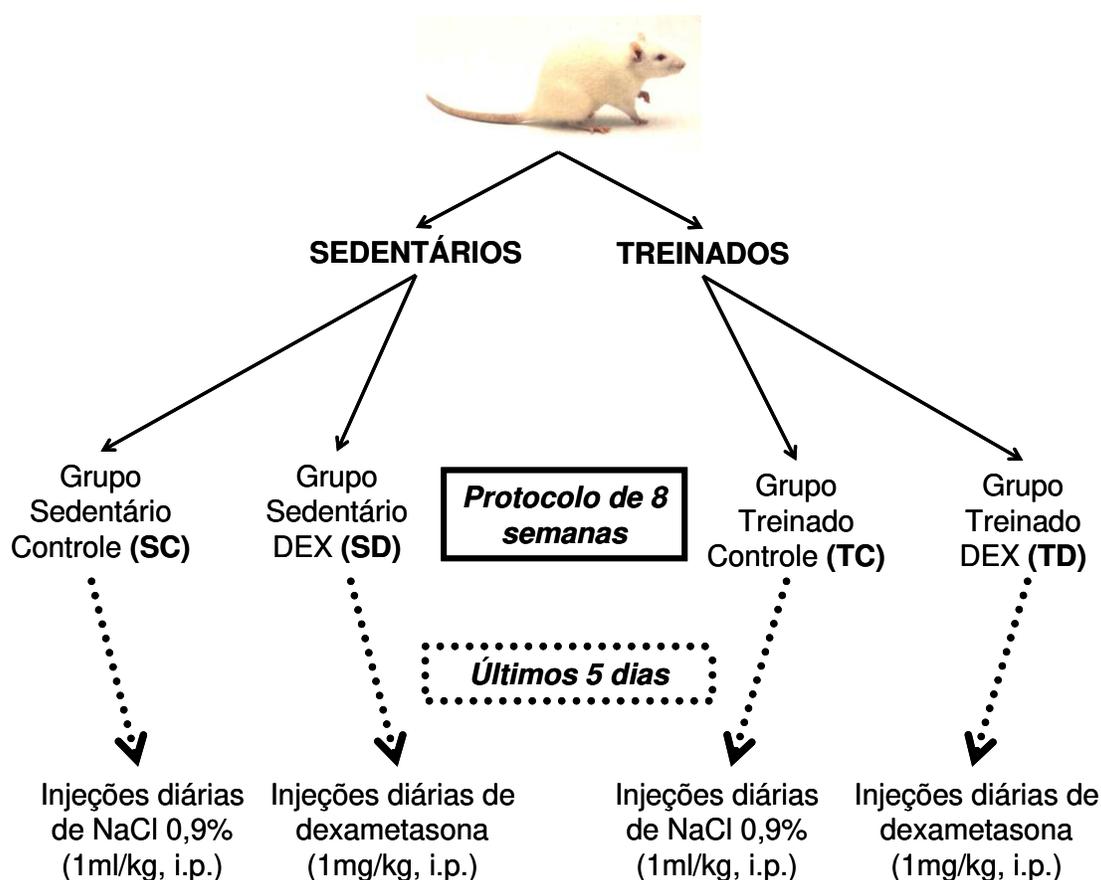
Foram utilizados ratos Wistar machos de 7-8 semanas de idade (200-250g, jovens), provenientes do Biotério da UNESP no Campus de Botucatu. Durante todo o protocolo, os animais foram mantidos em gaiolas com até cinco animais, no biotério da Faculdade de Ciências do Campus da UNESP de Bauru, com ciclo claro/escuro de 12:12 horas e temperatura controlada (22°C). Ração e água foram fornecidas *at libitum*. Os ratos foram pesados semanalmente do início ao fim do período experimental. Terminado o protocolo experimental, os ratos foram eutanaziados por exposição à CO<sub>2</sub>, seguido por decaptação. A eutanazia dos animais foi realizada sempre 24 horas após a última sessão de treinamento físico. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências, Bauru, SP.

### *Avaliação da Capacidade Física Máxima dos Animais*

A capacidade física foi avaliada de forma indireta por meio de teste de esforço máximo (TEM) em esteira ergométrica. Após um período inicial (10 dias), os ratos foram adaptados e selecionados segundo sua habilidade em andar/correr na esteira ergométrica adaptada para ratos (10 raias suspensas de acrílico, Inbramed, Millennium). Após esta pré-seleção, foi realizado um teste de esforço máximo (TEM-1), utilizando um protocolo escalonado previamente validado e publicado por Silva et al. (1997), com incrementos de 5 m/min a cada 4 min. A carga máxima foi determinada quando o animal deixou de correr espontaneamente.

### *Delineamento dos Grupos Experimentais*

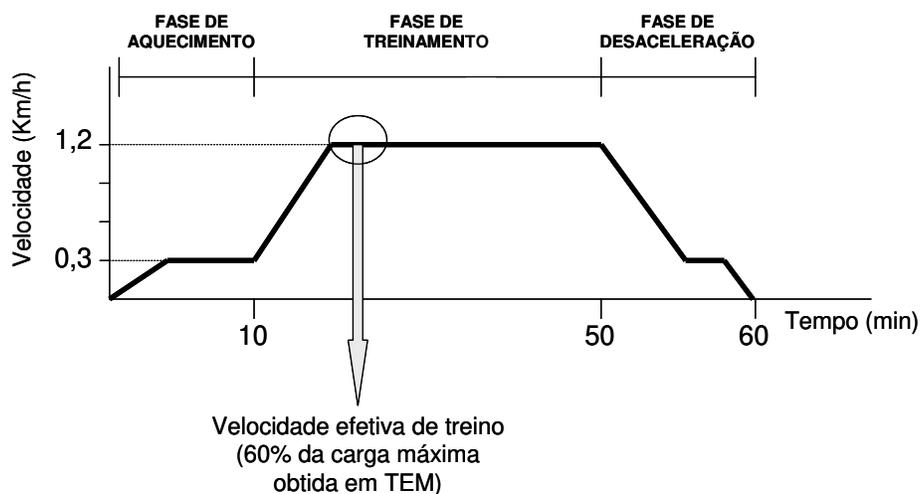
Após a avaliação inicial da capacidade física os ratos foram pesados e divididos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais (SC, SD, TC e TD) segundo os procedimentos específicos destinados a cada grupo, como mostrado na **FIGURA 5**:



**FIGURA 5. Delineamento dos grupos experimentais utilizados.** Após o TEM-1 os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: SC, SD, TC e TD. Os quatro grupos foram submetidos a protocolo experimental de 8 semanas, sendo os grupos sedentários mantidos em repouso, e os grupos treinados submetidos ao treinamento físico durante todo o período. Durante os 5 últimos dias do protocolo experimental os grupos controles (SC e TC) foram submetidos a injeções intraperitoneais diárias de solução fisiológica (NaCl 0.9%), correspondendo a 1ml/kg de peso corpóreo, e os grupos tratados com DEX foram submetidos a injeções intraperitoneais diárias de fosfato de dexametasona (DECADRON<sup>®</sup>) na concentração de 1mg/kg de peso corpóreo, previamente diluída em solução fisiológica (NaCl 0.9%). As injeções foram aplicadas sempre no mesmo período do dia, entre as 7:00 e 8:00 horas da manhã.

### ***Protocolo de Treinamento Físico***

O treinamento físico foi realizado em esteira ergométrica durante uma hora por dia, 5 dias por semana, por 8 semanas, com intensidade de 60 % da velocidade máxima atingida no teste de esforço. Para confecção do protocolo inicial de treinamento físico, utilizou-se uma média das cargas máximas obtidas no TEM-1 para 10 ratos, uma vez que o protocolo de treinamento físico foi conduzido para 10 ratos de forma concomitante. Na primeira semana de treinamento a velocidade e o tempo de treino foram aumentados gradualmente a cada dia, sendo que na segunda semana de treinamento os animais já estavam realizando o treino na intensidade desejada. O protocolo diário de treinamento físico foi realizado como mostrado na figura a seguir (**FIGURA 6**):



**FIGURA 6. Modelo do protocolo diário de treinamento físico utilizado.** O treinamento físico foi realizado diariamente durante 1 hora, sendo esse período dividido em 3 fases: **1) Fase de Aquecimento:** período inicial de aquecimento de 10 minutos em baixa velocidade (0,3Km/h); **2) Fase de Treinamento:** aumento gradual da velocidade de treino, a partir da velocidade utilizada para o aquecimento, até ser atingida a velocidade efetiva de treino (equivalente a 60% da carga máxima obtida em TEM), que predomina durante os 40 minutos da fase de treinamento. Como exemplo na figura tem-se a velocidade efetiva de treino de 1,2Km/h (lembrando que essa figura mostra um protocolo hipotético, apenas confeccionado com finalidade didática. Para cada grupo de ratos foram confeccionados protocolos distintos de treinamento baseados na carga máxima obtida em TEM para cada grupo); **3) Fase de Desaceleração:** redução gradual na velocidade de treino, durante cerca de 10 minutos, até parar.

Após quatro semanas de treinamento físico foi aplicado um novo TEM para readequação da carga de treino (TEM-2). Ao término das 8 semanas de protocolo experimental, foi aplicado um novo teste de esforço máximo (TEM-3) para se avaliar o efeito do treinamento físico antes do início do tratamento com solução fisiológica ou DEX. Os ratos sedentários realizaram os TEMs no mesmo dia que os treinados e permaneceram sedentários durante todo o restante do período experimental.

### ***Dosagem dos níveis glicêmicos***

A glicemia foi dosada pelo sistema de fitas (monitor digital) “one touch” (Johnson & Johnson) a partir de sangue retirado da cauda.

### ***Teste de Tolerância à Insulina intraperitoneal (ipITT)***

Cinco ratos de cada grupo, alimentados, foram anestesiados com anestésico tiopental sódico (THIOPENTAX<sup>®</sup>, 60mg/kg peso corpóreo, i.p.). Depois de ser verificado a ausência de reflexos pelo pinçamento entre os dedos da pata posterior, os ratos tiveram a extremidade da cauda seccionada para a coleta de sangue no tempo 0. Insulina humana recombinante (BIOHULIN<sup>®</sup>) equivalente a 2U/kg de peso corpóreo foi injetada intraperitonealmente logo após verificação da glicemia no tempo 0. A constante de decaimento de glicose (*K*<sub>itt</sub>) foi calculada a partir do “slope” da linha de regressão obtida com valores de glicose log-transformadas entre 0 e 30 minutos depois da administração da insulina.

### ***Isolamento das Ilhotas Pancreáticas***

Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> seguido por decaptação. A excisão do pâncreas e o isolamento das ilhotas foram realizados de acordo com Lacy & Kostianovski (1967). Em resumo, após laparotomia, foi injetada solução contendo colagenase (10mL de solução de Hank's contendo 8 mg de colagenase) por animal, pelo ducto biliar, que atinge o pâncreas por fluxo contrário via ductos pancreáticos. O pâncreas foi então incubado a 37°C durante aproximadamente 25 minutos com posterior agitação manual e lavagens. As ilhotas, livres do tecido acinoso, foram coletadas sob lupa (Carlzeiss-Jena Citoval 2) por aspiração, com auxílio de pipeta pasteur estirada e siliconizada.

### ***Secreção Estática de insulina***

Grupos de cinco ilhotas foram pré-incubadas por 60 minutos a 37°C em solução de Krebs contendo albumina (3mg/ml), 2.8mM de glicose e gaseadas com carbogênio (5% CO<sub>2</sub>) para manutenção do pH em 7,4. Após o período de pré-incubação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta pasteur sob lupa e as ilhotas foram, então, incubadas novamente durante 60 minutos a 37°C em solução de Krebs contendo glicose nas concentrações de 2.8mM e 11.1mM. Após a incubação as placas contendo as ilhotas foram colocadas em geladeira por 10 minutos para que o mecanismo secretório fosse interrompido, e logo depois o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de insulina por radioimunoensaio.

### ***Dosagem de insulina por radioimunoensaio (RIA)***

Os níveis séricos de insulina e os níveis de insulina secretados durante os experimentos *in vitro* foram determinados por RIA. Para isso, transferiu-se para tubos de ensaio 0.1 mL das amostras desconhecidas (em duplicata) e 0.2 mL de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:200) e insulina marcada com  $^{125}\text{I}$  (traçador) em tampão fosfato pH 7.4, acrescido de NaCl 0.9 % e albumina 0.5 %. Em seguida foram preparados os seguintes controles:

- a) 3 tubos (Totais) que receberam somente 0.2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada  $^{125}\text{I}$  para averiguação da radiação máxima.
- b) 3 tubos (Ligação não específica) que receberam 0.2 mL do tampão fosfato com insulina marcada  $^{125}\text{I}$  e 0.1 ml de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.
- c) 3 tubos (Referência) que receberam 0.2 mL de tampão fosfato contendo insulina marcada com  $^{125}\text{I}$  e anticorpo anti-insulina e 0.1 ml de tampão fosfato, constituindo assim o zero de insulina da curva padrão.

Em seguida foi preparado, também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0.02; 0.039; 0.078; 0.16; 0.31; 0.63; 1.25; 2.5; e 5.0 ng/mL. Cada tubo dessa série recebeu também 0.2 ml de tampão fosfato contendo insulina marcada  $^{125}\text{I}$  e anticorpo anti-insulina. No final da preparação dos tubos (amostras, controle e curva padrão), todos foram agitados em vortex e estocados a 4 °C, durante 48 h.

Após o período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0.2 ml de uma solução contendo 2.5% de carvão

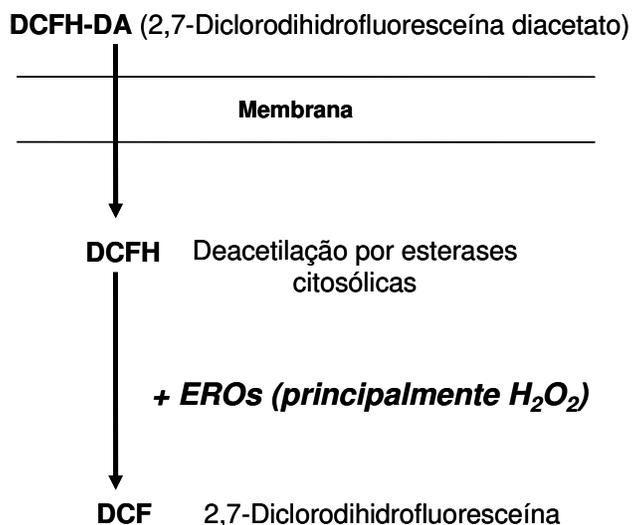
(Norit A), 0.5% de albumina e 0.25% de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 min e a seguir centrifugados durante 20 min (2800 rpm) a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. Os 3 tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com base nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida foi elaborada uma curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados para o experimento *in vitro* foram expressos em ng/mL.ilhota.h. A análise do conteúdo total de insulina foi obtida através da homogeneização de grupos de 10 ilhotas em solução álcool-ácido, posterior determinação dos níveis de insulina do homogenado por radioimunoensaio e divisão do valor final encontrado (em ng/mL) por 10, para se obter o conteúdo total de insulina presente em cada ilhota. O resultado final obtido para o conteúdo total de insulina por ilhota foi expresso como % do grupo controle (grupo SC). Os níveis séricos de insulina foram expressos em ng/mL de insulina.

#### ***Determinação da produção intracelular de EROs por oxidação de DCFH-DA***

Após o processo de isolamento e coleta das ilhotas pancreáticas de 10 ratos de cada grupo experimental, 30 ilhotas intactas foram colocadas por poço em uma placa negra de 96 poços e pré-incubadas em tampão Krebs-Hepes contendo 2.8mM de glicose por 45 minutos a 37°C, a fim de eliminar o estresse causado pelo processo de coleta/digestão do pâncreas e isolamento das ilhotas. Após esse período inicial, a solução de pré-incubação foi retirada sob lupa com auxílio de uma pipeta pasteur estirada e, posteriormente, as ilhotas foram novamente incubadas com 200µl de tampão Krebs-Hepes contendo 2.8 ou 22mM de

glicose e 10 $\mu$ M de DCFH-DA (2',7' Dichlorofluorescein diacetate, Código: 35845, 1g, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), por 30 minutos a 37°C. Após esse período de incubação a fluorescência resultante gerada pelo DCF foi imediatamente analisada em leitor de microplaca (Fusion, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) a 460/530 nm de excitação/emissão. Após o protocolo experimental as ilhotas de cada poço foram lavadas com tampão Krebs-Hepes e homogeneizadas com sonicador (Sonic Dismembrator Model 100, Fisher Scientific) no mesmo tampão, para posterior determinação do conteúdo de proteínas por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando um kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) com albumina como padrão. A fluorescência obtida foi subtraída da fluorescência relativa ao “background” (obtido a partir de um poço sem a presença de ilhotas pancreáticas, ou seja, contendo apenas as soluções utilizadas durante o experimento – 2.8 ou 22mM de glicose + 10 $\mu$ M de DCFH-DA). A fluorescência resultante foi, então, corrigida pelo conteúdo total de proteína presente em cada poço e expressa em Unidades de Fluorescência (UF)/  $\mu$ g de proteína.

A seguir, a **FIGURA 7** mostra o mecanismo geral de ação da sonda fluorescente DCFH-DA, utilizada para a determinação de EROs em meio intracelular:



**FIGURA 7. Mecanismo de ação da sonda DCFH-DA, utilizada para determinação de EROs em meio intracelular.** DCFH-DA consegue difundir-se para o meio intracelular graças a presença de um grupo diacetato apolar na molécula. No citosol o grupo diacetato é hidrolisado por esterases citosólicas, tornando a molécula DCFH disponível para reação com EROs formados no meio intracelular.  $H_2O_2$  pode ser considerado como a ERO de maior afinidade pela sonda. Após oxidado, a fluorescência do DCF formado pode ser detectada por métodos fluorimétricos (Adaptado de SILVEIRA, 2004).

#### ***Dosagem da Capacidade Antioxidante Total (TAC) Sérica***

Após eutanazia dos animais e decaptação, o sangue foi coletado em tubos de vidro e mantido em repouso durante 30 min a 25°C. Posteriormente foi centrifugado a 2.000 x g por 15 minutos a 4°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) para coleta do soro, que foi armazenado a -80°C para ser utilizado, posteriormente, nas dosagens de Capacidade Antioxidante Total (TAC). A dosagem da TAC foi feita utilizando kit colorimétrico comercial (Antioxidant Assay Kit, Cayman, Catalog N° 709001). Antioxidantes solúveis em água e lipídeos não são separados nesse protocolo utilizado, assim as atividades antioxidantes combinadas de todos os constituintes do soro, incluindo vitaminas, proteínas, lipídeos, glutathiona, ácido úrico, etc., foram avaliadas. O método para dosagem de TAC pelo kit empregado baseia-se na habilidade dos antioxidantes das amostras em inibir a oxidação de 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato] (ABTS<sup>®</sup>) a ABTS<sup>®+</sup> pela

metmioglobina. Trolox, um análogo de tocoferol solúvel em água, é usado como padrão. A leitura foi feita em ELISA (Biotek), na temperatura de 25°C e absorvância de 405nm. A concentração final de TAC nas amostras de soro analisadas foi expressa em mM.

#### ***Dosagem dos níveis séricos de triglicédeos (TG)***

Foi realizada utilizando Kit colorimétrico comercial (Triglicérides 120, DOLES, goiânia, GO, Brasil) segundo instruções do fabricante. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 510nm. A concentração final de TG nas amostras de soro analisadas foi expressa em mg/dL.

#### ***Extração de RNA Total***

Para a extração de RNA total de ilhotas foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o tecido foi inicialmente rompido com sonicador e homogeneizado com o reagente Trizol até completa solubilização. Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, acrescida de 0.2 mL de clorofórmio por mL de Trizol para desproteinização. O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 x g, 15 min, 4°C), e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 75% e 100%, respectivamente, e dissolvido com H<sub>2</sub>O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm em aparelho quantificador (*GeneQuant*, Pharmacia Biotech). A integridade do RNA obtido foi verificada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1.2%, corado com brometo de etídeo.

## ***Real time RT-PCR***

### Obtenção de cDNA a partir de RNA total

A reação da transcriptase reversa foi realizada em termociclador às temperaturas específicas, em 20 µL de uma mistura contendo 2.0 µg de RNA total, 10mM de dNTP mix, 40 U/µL de inibidor de RNase, 0.1M de DTT, 5X first-strand buffer, 0.5 µg/mL de oligo dT e 200 U da enzima Super Script II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen - Life Technologies).

### PCR

**TABELA 1.** *Seqüência dos primers utilizados (Applied Biosystems)*

<b>Gene</b>	<b>S ou AS<sup>a</sup></b>	<b>Seqüência do primer (5' - 3')</b>
$\beta$ -actina	S	AGAGGGAAATCGTGCGTGACA
	AS	CGATAGTGATGACCTGACCGTCA
Cu/ZnSOD	S	TGAAGAGAGGCATGTTGGAGA
	AS	TCATCTTGTTTCTCGTGGACC
MnSOD	S	CCTCCCTGACCTGCCTTACGAC
	AS	TTCAGATTGTTACGTTAGGTCG
CAT	S	GATGAAGCAGTGGAAGGAGC
	AS	TGCCATCTCGTCGGTGAAA
GPx-1	S	CCCTCAAGTATGTCCGACCC
	AS	GCAGGAAGGTAAAGAGCGGG

<sup>a</sup> S, primer sense; AS, primer anti-sense

As condições utilizadas para o PCR foram: 95°C por 10min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 10s e 60°C por 45s. As curvas foram analisadas utilizando-se o Sequence Detector System 1.7 (Applied Biosystems). Os resultados foram normalizados pela expressão do mRNA do controle interno  $\beta$ -actina e apresentados como % do grupo controle (grupo SC).

### ***Procedimento de Western blott***

Aproximadamente 1000 ilhotas foram coletadas para cada grupo experimental e então homogeneizadas com sonicador (Sonic Dismembrator Model 100, Fisher Scientific) em coquetel anti-protease a 4°C. Após 20 minutos de centrifugação em 11.000 rpm e 4°C, o conteúdo de proteínas foi determinado por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando um kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) com Albumina como padrão. Alíquotas de proteína total foram fervidas a 100 °C por 5 minutos em 30% do volume em tampão Laemmli (fosfato de Na 1M pH 7.0, 10% SDS, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram fracionadas no sistema de eletroforese (Mini Protean II - Bio-Rad) em gel de poliacrilamida 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) na presença de 20% de metanol e 0.02% de SDS em voltagem constante de 120 Volts. A membrana foi, então, saturada com solução bloqueadora contendo leite desnatado a 5% em solução basal (10mM Trisma base, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) “overnight”. Em seguida a membrana foi lavada com solução basal a temperatura ambiente. As proteínas foram detectadas na membrana após incubação por 3h a 4 °C com anticorpo primário específico para cada proteína (CAT: Mouse Monoclonal Anti-Catalase, Código: C0979, Sigma-

Aldrich; **SOD-1**: Rabbit Polyclonal Anti-Superoxide Dismutase 1 (Cu/ZnSOD), Código: ab13498, Abcam; **GPx-1**: Rabbit Polyclonal Glutathione Peroxidase 1, Código: ab59546, Abcam;  **$\alpha$ -Tubulina**: Mouse Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin (TU-02), Código: sc-8035, Santa Cruz Biotechnology) em solução basal contendo albumina 3%, seguida de lavagem e incubação por 1:30 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase-HRP em solução basal contendo leite desnatado 1% a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas e incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce) e expostas ao filme autoradiográfico (Kodak T-Mat G/RA). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria. Os valores resultantes foram corrigidos pelo valor obtido para o controle interno ( $\alpha$ -tubulina) correspondente a cada banda. Os valores finais foram expressos como % do grupo controle (grupo SC).

### ***Análise estatística dos resultados***

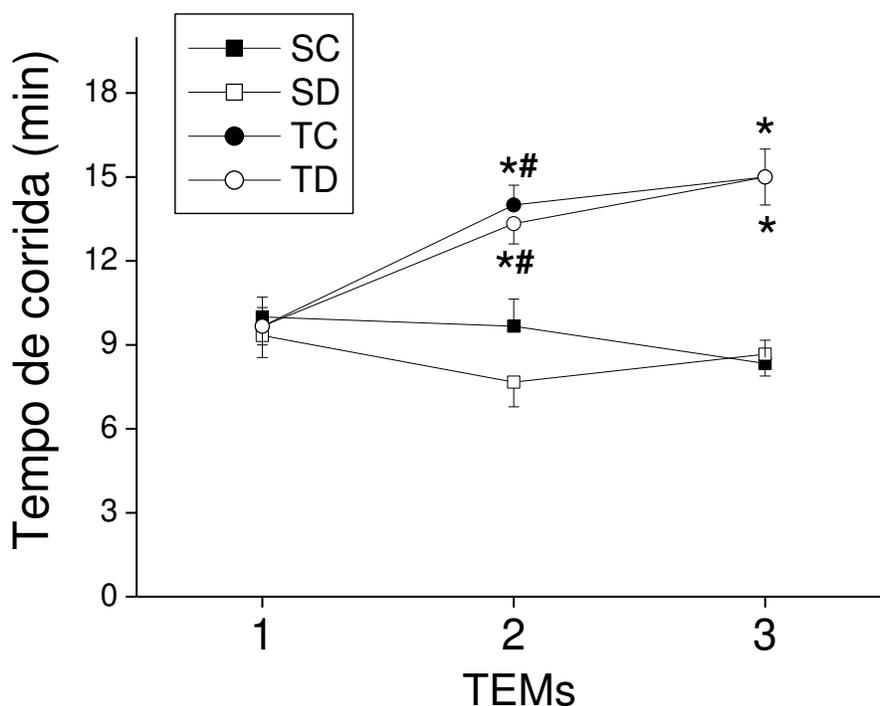
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada utilizando-se teste “t” de Student ou ANOVA seguida de *post test* Tukey. Foi adotado o nível de significância  $P < 0.05$ .

## **- RESULTADOS –**

## RESULTADOS

### Treinamento físico melhora o desempenho físico de ratos treinados ao longo do protocolo experimental de 8 semanas

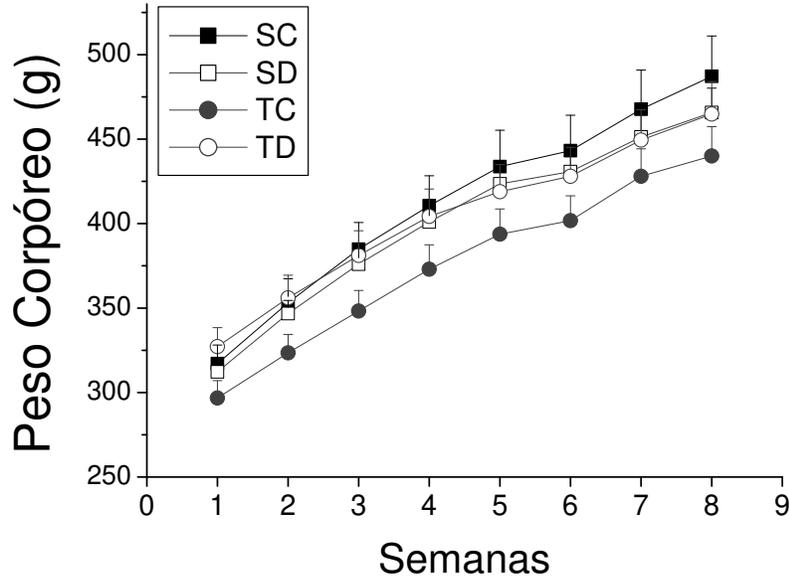
Após separação aleatória dos ratos nos grupos SC, SD, TC e TD, realizou-se o TEM-1 para determinação da carga máxima de treino e posterior confecção do protocolo inicial de treinamento físico para os grupos treinados. Como destaca a **FIGURA 8**, não foi observada diferença no desempenho físico entre os grupos no TEM-1, o que pôde ser inferido a partir da análise do tempo total de permanência dos ratos na esteira durante o teste. Já no TEM-2, realizado após quatro semanas do início do protocolo de treinamento físico para readequação da carga de treino, foi possível observar melhora no desempenho físico dos ratos treinados em relação aos ratos que permaneceram sedentários durante o período (aumento de 1.4- e 1.7-vezes no tempo total de corrida durante o teste para TC e TD vs SC e SD, respectivamente), além de melhora no desempenho físico desses mesmos ratos em relação ao seu desempenho inicial no TEM-1 (aumento de 1.4- e 1.3-vezes para TC e TD, respectivamente), comprovando assim a efetividade do treinamento físico ( $n = 9$ ,  $P < 0.05$ ). No TEM-3, realizado no final do protocolo experimental (após 8 semanas de treinamento físico), foi possível observar melhora no desempenho físico dos ratos treinados em relação aos ratos que permaneceram sedentários durante o período (aumento de 1.8- e 1.7-vezes no tempo total de corrida durante o teste para TC e TD vs SC e SD, respectivamente;  $n = 9$ ,  $P < 0.05$ ) e apenas leve tendência a melhora foi no desempenho físico dos ratos treinados em relação ao seu desempenho no TEM-2 (diferença não significativa).



**FIGURA 8. Desempenho físico dos ratos sedentários e treinados ao longo das 8 semanas do protocolo experimental.** No TEM-1, realizado antes do início do protocolo experimental, não foi observada diferença no desempenho físico entre os grupos. Após quatro semanas do início do protocolo de treinamento físico (TEM-2) ocorreu melhora no desempenho físico dos ratos treinados em relação aos ratos sedentários (aumento de 1.4- e 1.7-vezes no tempo total de corrida durante o teste para TC e TD vs SC e SD, respectivamente) e em relação ao desempenho do mesmo grupo no TEM-1 (aumento de 1.4- e 1.3-vezes para TC e TD, respectivamente). No TEM-3 foi observada apenas leve tendência à melhora no desempenho físico dos ratos treinados em relação ao seu desempenho no TEM-2 (diferença não significativa) ( $n = 9$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* Diferença significativa vs grupo sedentário correspondente para o mesmo TEM,  $P < 0,05$ , teste “t” de Student. # Diferença significativa vs TEM-1 para o mesmo grupo treinado,  $P < 0.05$ , ANOVA seguido de *post test* Tukey.

### **Peso corpóreo é reduzido após 5 dias de tratamento com dexametasona**

Para avaliar o crescimento ao longo do protocolo de treinamento físico, os ratos pertencentes aos grupos SC, SD, TC e TD foram pesados individualmente uma vez por semana, durante as 8 semanas do protocolo experimental. Como mostra a **FIGURA 9**, não houve diferença significativa no peso corpóreo entre os quatro grupos ao longo das 8 semanas, sendo o incremento no peso corpóreo entre a 1<sup>o</sup> e a 8<sup>o</sup> semana do protocolo experimental de 1.5-, 1.4-, 1.4- e 1.4-vezes para os grupos SC, SD, TC e TD, respectivamente ( $n = 8$ ,  $P > 0.05$ ). Entretanto, como mostra a **TABELA 2**, houve redução significativa de peso corpóreo nos grupos tratados com DEX após o término do tratamento com a droga em relação ao peso desses mesmos animais no início do tratamento (redução de 12 e 14% para SD e TD, respectivamente;  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ).



**FIGURA 9.** *Peso corpóreo dos ratos sedentários e treinados ao longo das 8 semanas do protocolo experimental.* Não houve alteração significativa no peso corpóreo entre os grupos ao longo do protocolo experimental. (n = 8,  $P > 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM.

**TABELA 2.** *Peso Corpóreo dos quatro grupos experimentais no início e término do tratamento com salina ou dexametasona*

	Peso Corpóreo (g)	
	Início do Tratamento	Término do Tratamento
<b>SC</b>	494.9 $\pm$ 24.2	503.7 $\pm$ 25.2
<b>SD</b>	466.2 $\pm$ 14.0	409 $\pm$ 13.2*
<b>TC</b>	442.5 $\pm$ 17.3	452 $\pm$ 18.1
<b>TD</b>	491.6 $\pm$ 21.3	421.4 $\pm$ 16.2*

Valores expressos como média  $\pm$  EPM

\* Diferença significativa vs Início do Tratamento para o mesmo grupo experimental.

$P < 0.05$ ; n = 8. Teste "t" de Student.

## Treinamento físico ameniza hiperglicemia de jejum induzida pelo tratamento com dexametasona

Como mostrado na **TABELA 3**, o tratamento com DEX provocou aumento significativo nos níveis glicêmicos (aumento de 3.2- e 2.7-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente; n = 10;  $P < 0.05$ ), insulinêmicos (aumento de 20- e 18-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente; n = 5;  $P < 0.05$ ) e de triglicerídeos (aumento de 4.4- e 3.4-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente; n = 5;  $P < 0.05$ ) de jejum. O treinamento físico foi capaz de amenizar o quadro hiperglicêmico provocado pelo tratamento com o glicocorticóide, tendo em vista a redução de 23% nos níveis glicêmicos de jejum para o grupo TD em relação ao grupo SD (n = 10,  $P < 0.05$ ). Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis séricos de insulina e TG de jejum em ratos TD vs SD.

**TABELA 3.** *Glicose Sanguínea e Parâmetros Séricos obtidos no estado de jejum para os grupos sedentários e treinados*

	<b>Glicose (mg/dL)</b>	<b>TG (mg/dL)</b>	<b>Insulina (ng/mL)</b>
<b>SC</b>	90.8 ± 3.9	94.2 ± 4.3	1.10 ± 0.2
<b>SD</b>	299.2 ± 24.3 <sup>*</sup>	416.6 ± 54.3 <sup>*</sup>	23.01 ± 0.8 <sup>*</sup>
<b>TC</b>	84.3 ± 2.9	92.7 ± 6.0	1.21 ± 0.2
<b>TD</b>	229.9 ± 19.2 <sup>*#</sup>	322.5 ± 48.7 <sup>*</sup>	21.66 ± 0.6 <sup>*</sup>

Valores expressos como média ± EPM

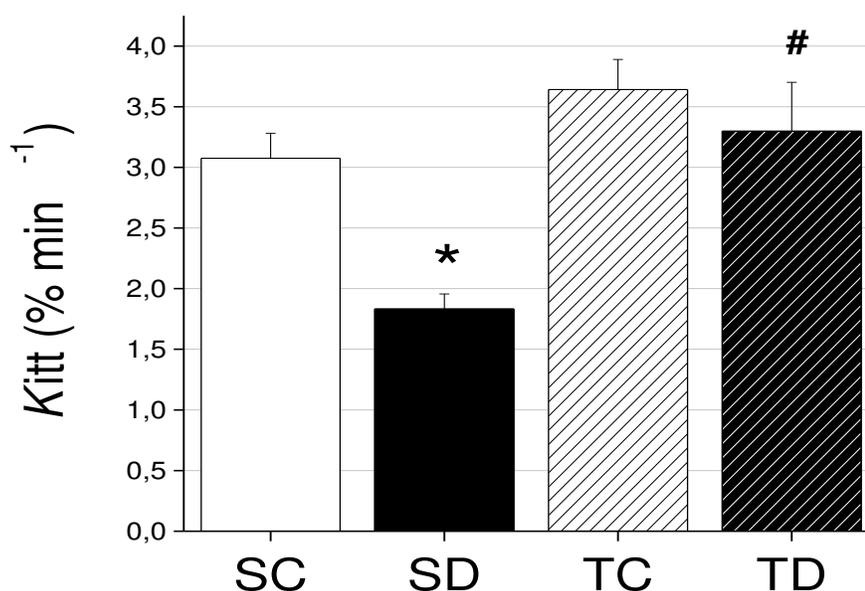
\*Diferença significativa vs respectivo controle (Efeito da Dexametasona);

# Diferença significativa vs respectivo controle (Efeito do Exercício).

$P < 0.05$ . Para glicose, n = 10; Para insulina e TG, n = 5. ANOVA seguido de *post test* Tukey.

## Treinamento físico melhora a sensibilidade periférica a insulina em ratos tratados com dexametasona

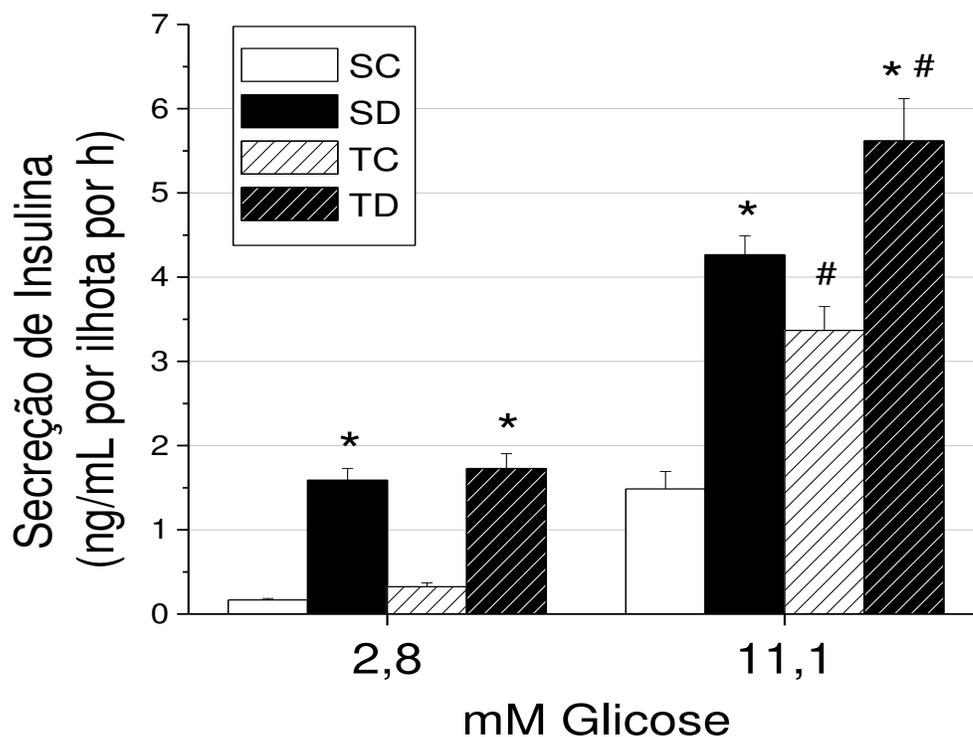
Durante teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT), o cálculo da constante de desaparecimento da glicose ( $K_{itt}$ ) (FIGURA 10) demonstrou a presença de resistência à insulina no grupo SD em relação ao grupo SC, visto a redução de 40% no  $K_{itt}$  para este grupo ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). Entretanto, neste mesmo experimento ficou evidente o papel positivo do treinamento físico, que impediu a perda da sensibilidade periférica à insulina em animais tratados com DEX, uma vez que o  $K_{itt}$  para o grupo TD não exibiu redução semelhante a observada para o grupo SD ( $n = 5$ ,  $P > 0.05$ ).



**FIGURA 10.** *Treinamento físico impediu a perda da sensibilidade periférica à insulina em ratos tratados com DEX.* O  $K_{itt}$  revelou presença de resistência periférica à insulina no grupo SD vs SC, visto redução de 40% no  $K_{itt}$  para este grupo. Já o treinamento físico foi capaz de impedir a perda da sensibilidade à insulina em ratos TD ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa vs respectivo controle (efeito da dexametasona); # diferença significativa vs respectivo controle (efeito do exercício). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

## **Treinamento físico promove aumento na secreção de insulina frente ao estímulo por glicose**

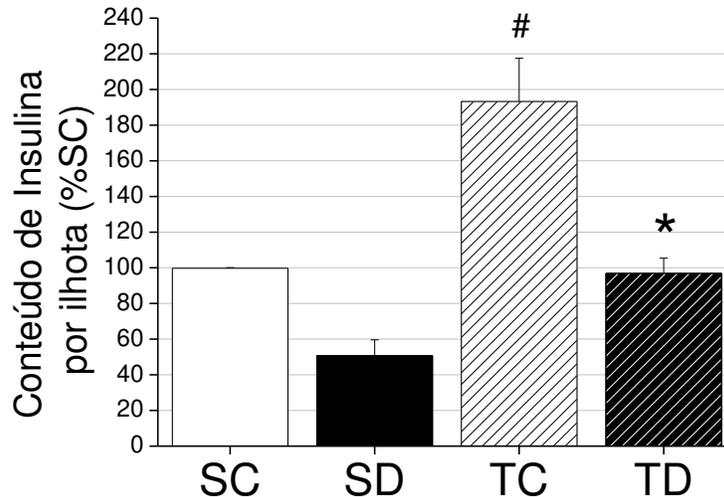
A **FIGURA 11** apresenta a resposta secretória insulínica de ilhotas pancreáticas isoladas e incubadas em concentrações basal (2.8mM) e estimulatória (11.1mM) de glicose, para os quatro grupos experimentais. Em concentração basal de glicose (2.8mM) ilhotas de ratos tratados com DEX exibiram níveis aumentados de secreção de insulina (aumento de 15- e 5.6-vezes em SD e TD *vs* SC e TC, respectivamente;  $n = 12$ ,  $P < 0.05$ ). Em concentração estimulatória de glicose (11.1mM), além da resposta secretória ter sido maior nos grupos tratados com DEX em relação aos seus respectivos controles (aumento de 3- e 1.6-vezes em SD e TD *vs* SC e TC, respectivamente;  $n = 12$ ,  $P < 0.05$ ), o treinamento físico também foi capaz de promover aumento significativo na secreção de insulina (aumento de 2.3- e 1.3-vezes em TC e TD *vs* SC e SD, respectivamente;  $n = 12$ ,  $P < 0.05$ ).



**FIGURA 11.** Níveis de secreção de insulina frente ao estímulo por glicose em experimento de incubação estática com ilhotas pancreáticas isoladas dos quatro grupos experimentais. Em 2.8mM de glicose ilhotas de ratos tratados com DEX exibiram níveis aumentados de secreção de insulina (aumento de 15 - e 5.6-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente). Em 11.1mM de glicose, além da resposta secretória ter sido maior nos grupos tratados com DEX vs respectivos controles (aumento de 3- e 1.6-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente), o treinamento físico também foi capaz de promover aumento significativo na secreção de insulina (aumento de 2.3- e 1.3-vezes em TC e TD vs SC e SD, respectivamente;  $n = 12$ ,  $P < 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa vs respectivo controle (efeito da dexametasona); # diferença significativa vs respectivo controle (efeito do exercício). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

## O conteúdo total de insulina em ilhotas pancreáticas de ratos é aumentado pelo treinamento físico e reduzido pelo tratamento com dexametasona

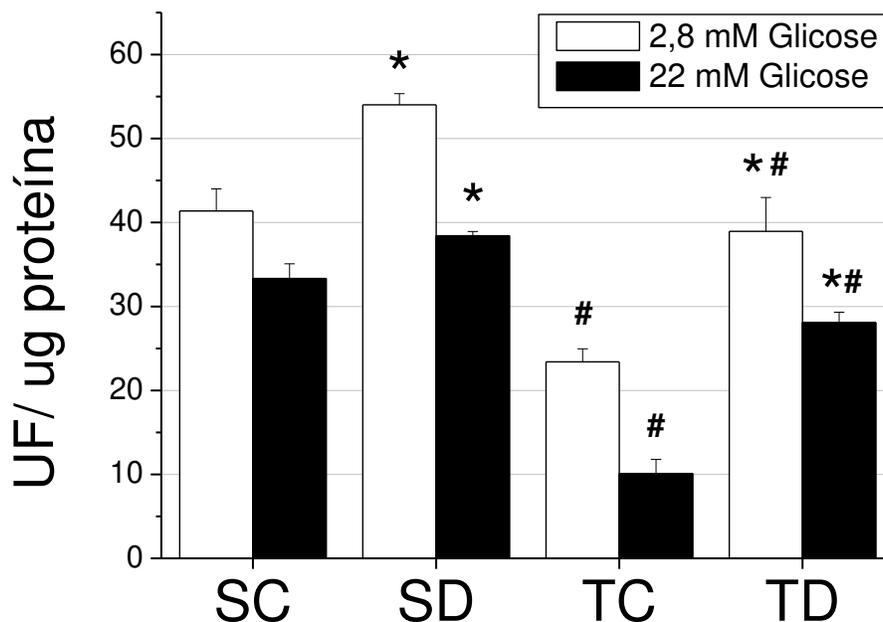
A **FIGURA 12** apresenta o conteúdo total de insulina em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais. O tratamento com DEX promoveu redução no conteúdo total de insulina por ilhota em relação aos valores observados para as ilhotas dos grupos controles (redução de 50% para SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ ), sendo essa diferença não significativa para o grupo SD vs SC. O treinamento físico, por sua vez, promoveu aumento significativo de 93% no conteúdo total de insulina em ilhotas de ratos TC comparado ao valor observado para ratos SC ( $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ). Foi possível notar, ainda, tendência a recuperação nos níveis totais de insulina em ilhotas do grupo TD em relação ao grupo SD (diferença não significativa;  $n = 10$ ,  $P > 0.05$ ).



**FIGURA 12.** Conteúdo total de insulina em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais. Ilhotas de ratos tratados com DEX exibiram redução em seu conteúdo total de insulina (redução de 50% para SD e TD vs SC e TC, respectivamente), sendo essa diferença não significativa para o grupo SD vs SC. O treinamento físico promoveu incremento de 93% no conteúdo total de insulina em ilhotas de ratos TC vs SC. Apenas tendência a recuperação nos níveis insulínicos foi observada em ilhotas TD vs SD ( $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa vs respectivo controle (efeito da dexametasona); # diferença significativa vs respectivo controle (efeito do exercício). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

## **Treinamento físico reduz os níveis intracelulares de EROs em ilhotas pancreáticas de ratos**

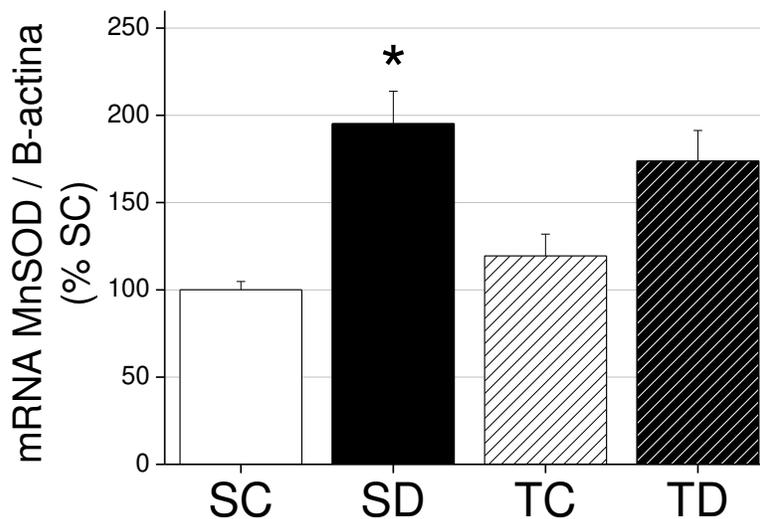
A **FIGURA 13** apresenta os níveis intracelulares de EROs em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais, após 30 minutos de incubação em solução contendo 2.8mM ou 22mM de glicose e DCFH-DA. Tanto em 2.8mM quanto em 22mM de glicose, os níveis intracelulares de EROs observados foram maiores nas ilhotas dos grupos tratados com DEX em relação aos grupos controles (em 2.8 mM de glicose: níveis 1.3- e 1.6-vezes maiores para SD e TD vs SC e TC, respectivamente; em 22 mM de glicose: níveis 1.1- e 2.7-vezes maiores para SD e TD vs SC e TC, respectivamente  $n = 10, P < 0.05$ ). Entretanto, o treinamento físico foi capaz de reduzir os níveis intracelulares de EROs, tanto em ilhotas de ratos TC quanto em ilhotas de ratos TD, em relação aos níveis observados para as ilhotas dos grupos SC e SD, respectivamente (em 2.8 mM de glicose: redução de 43% e 27% em TC e TD vs SC e SD, respectivamente; em 22 mM de glicose: redução de 69% e 27% em TC e TD vs SC e SD, respectivamente  $n = 10, P < 0.05$ ).



**FIGURA 13. Níveis intracelulares de EROs em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.** Os níveis intracelulares de EROs em ilhotas pancreáticas foram aumentados pelo tratamento com DEX. Em 2.8mM de glicose: ilhotas SD e TD exibiram níveis 1.3- e 1.6-vezes maiores em relação a SC e TC, respectivamente; em 22 mM de glicose: ilhotas SD e TD exibiram níveis 1.1- e 2.7-vezes maiores em relação a SC e TC, respectivamente. Já o treinamento físico promoveu redução nos níveis intracelulares de EROs em ilhotas pancreáticas. Em 2.8 mM de glicose: redução de 43% e 27% em TC e TD vs SC e SD, respectivamente; em 22 mM de glicose: redução de 69% e 27% em TC e TD vs SC e SD, respectivamente ( $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa vs respectivo controle (efeito da dexametasona); # diferença significativa vs respectivo controle (efeito do exercício). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

## Tratamento com dexametasona aumenta a expressão gênica da enzima MnSOD em ilhotas pancreáticas de ratos

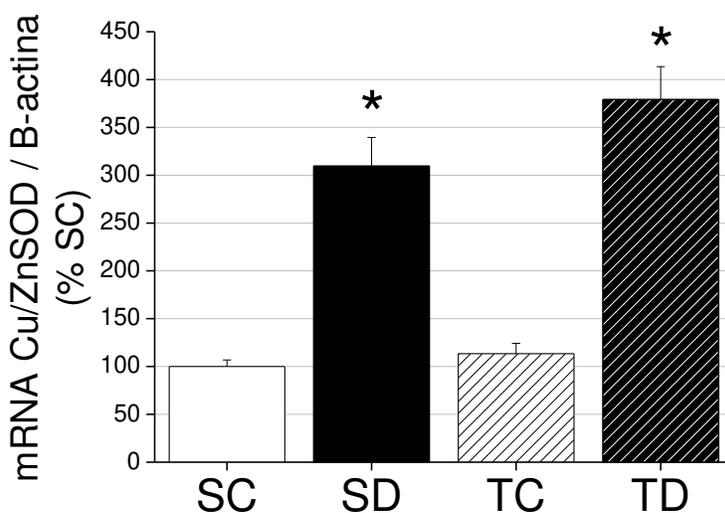
A expressão gênica da enzima antioxidante mitocondrial MnSOD apresentou aumento significativo de 1.9-vezes em ilhotas pancreáticas do grupo SD comparado com o grupo SC ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) (FIGURA 14). Também foi observada tendência a aumento na expressão gênica da MnSOD para o grupo TD em relação ao observado para o grupo TC (aumento de 1.4-vezes, porém sem diferença estatística;  $n = 4$ ,  $P > 0.05$ ).



**FIGURA 14.** *Expressão gênica da enzima antioxidante mitocondrial MnSOD em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.* Foi observado aumento significativo de 1.9-vezes na expressão gênica da MnSOD em ilhotas do grupo SD vs SC ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). Também foi observado aumento de 1.4-vezes na expressão gênica da MnSOD em ilhotas do grupo TD vs TC (sem diferença estatística;  $n = 4$ ,  $P > 0.05$ ). Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA do controle interno  $\beta$ -actina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa vs respectivo controle (efeito da dexametasona). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

## Tratamento com dexametasona aumenta a expressão gênica da enzima Cu/ZnSOD em ilhotas pancreáticas de ratos

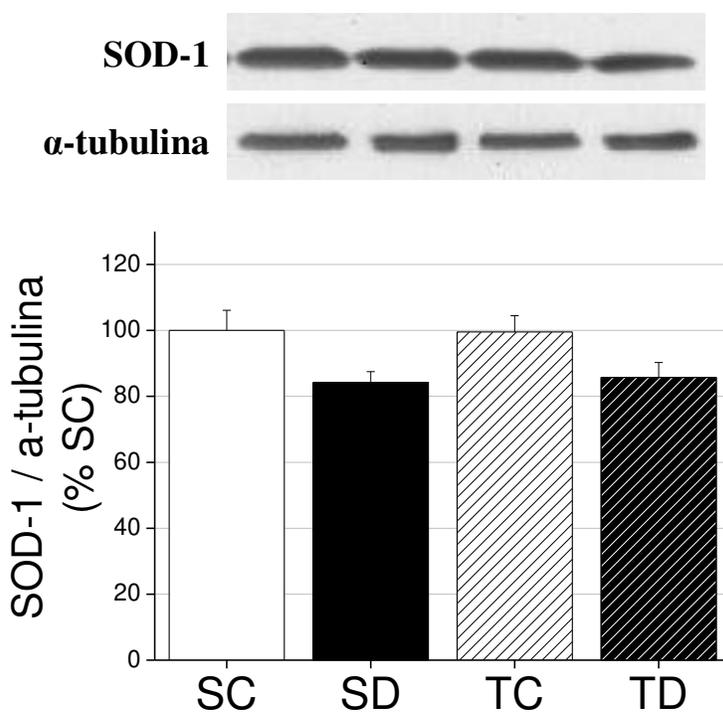
A expressão gênica da enzima antioxidante citosólica Cu/ZnSOD apresentou aumento significativo em ilhotas pancreáticas de ratos tratados com DEX em relação ao observado para ilhotas de animais controles (aumento de 3- e 3.7-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) (FIGURA 15).



**FIGURA 15.** *Expressão gênica da enzima antioxidante citosólica Cu/ZnSOD em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.* Foi observado aumento significativo de 3- e 3.7-vezes na expressão gênica da Cu/ZnSOD em ilhotas do grupo SD e TD vs SC e TC, respectivamente ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA do controle interno  $\beta$ -actina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa vs respectivo controle (efeito da dexametasona). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

**Nível protéico da enzima Cu/ZnSOD não é alterado pelo treinamento físico e tratamento com dexametasona em ilhotas pancreáticas de ratos**

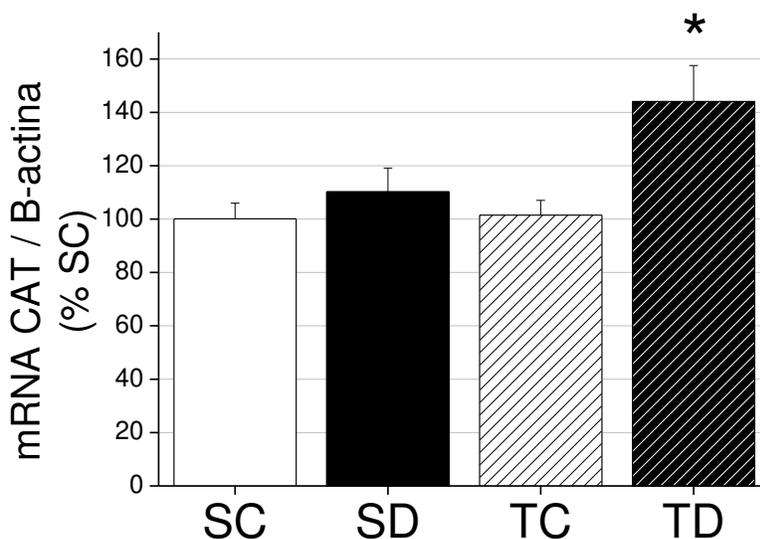
A **FIGURA 16** apresenta o nível protéico da Cu/ZnSOD (SOD-1) em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais. Não houve alteração significativa entre os grupos ( $n = 6$ ,  $P > 0.05$ ).



**FIGURA 16.** *Nível protéico da Cu/ZnSOD (SOD-1) em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.* Não houve alteração significativa entre os grupos. Os valores foram normalizados pelo nível protéico do controle interno  $\alpha$ -tubulina, que está apresentado sob o blot ( $n = 6$ ,  $P > 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA.

## Treinamento físico aumenta a expressão gênica da enzima Catalase em ilhotas pancreáticas de ratos TD

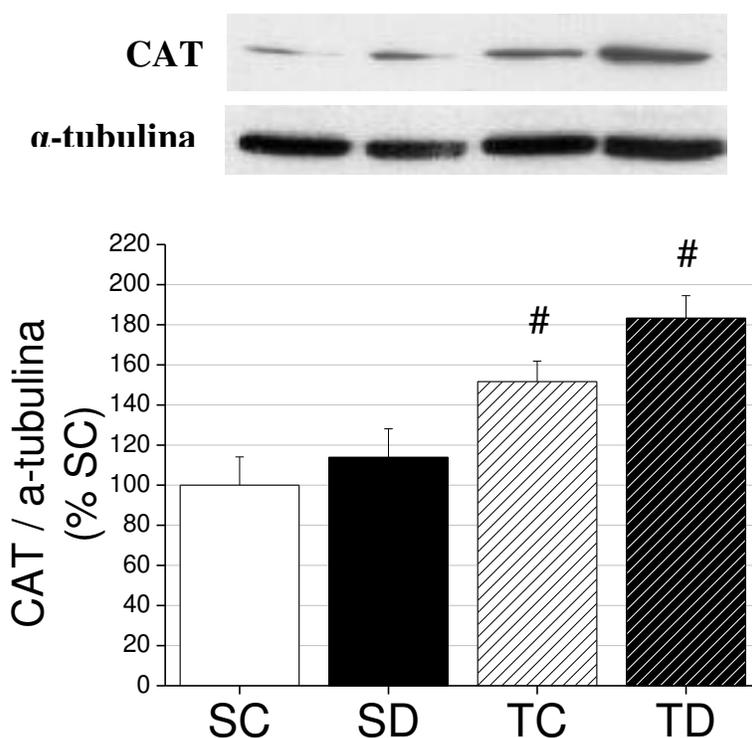
A expressão gênica da enzima antioxidante catalase apresentou aumento significativo de 1.4-vezes em ilhotas pancreáticas do grupo TD vs TC ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) (FIGURA 17). Nenhuma outra alteração significativa foi observada na expressão gênica da catalase entre ilhotas pancreáticas dos outros grupos analisados ( $n = 4$ ,  $P > 0.05$ ).



**FIGURA 17.** *Expressão gênica da enzima antioxidante Catalase em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.* Foi observado aumento significativo de 1.4-vezes na expressão gênica da CAT em ilhotas do grupo TD vs TC ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA do controle interno  $\beta$ -actina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa vs respectivo controle (efeito da dexametasona). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

## Nível protéico da enzima Catalase é aumentado pelo treinamento físico em ilhotas pancreáticas de ratos

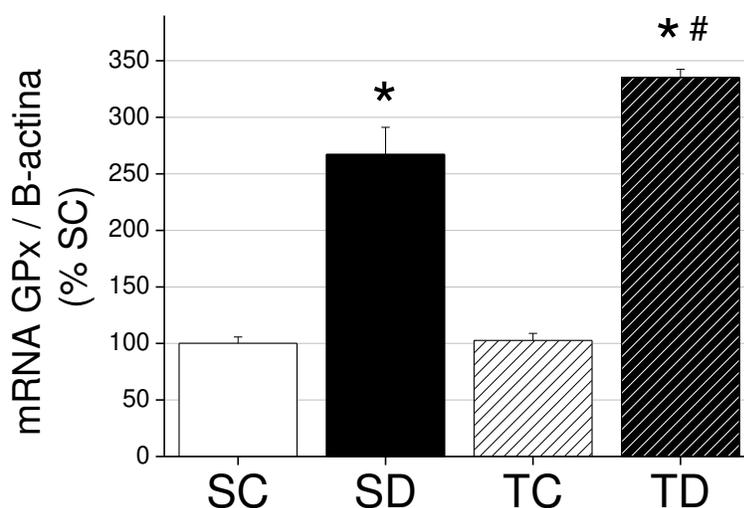
A **FIGURA 18** apresenta o nível protéico da enzima antioxidante catalase em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais. O treinamento físico foi capaz de aumentar significativamente o nível protéico da CAT nesse tecido (aumento de 1.5- e 1.6-vezes para TC e TD vs SC e SD, respectivamente;  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ).



**FIGURA 18.** *Nível protéico da catalase em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.* Foi observado aumento de 1.5- e 1.6-vezes no nível protéico da CAT nos grupos TC e TD vs SC e SD, respectivamente. Os valores foram normalizados pela nível protéico do controle interno  $\alpha$ -tubulina, que está apresentado sob o blot ( $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. # diferença significativa vs respectivo controle (efeito do exercício). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

## Tratamento com dexametasona aumenta a expressão gênica da enzima GPx em ilhotas pancreáticas de ratos

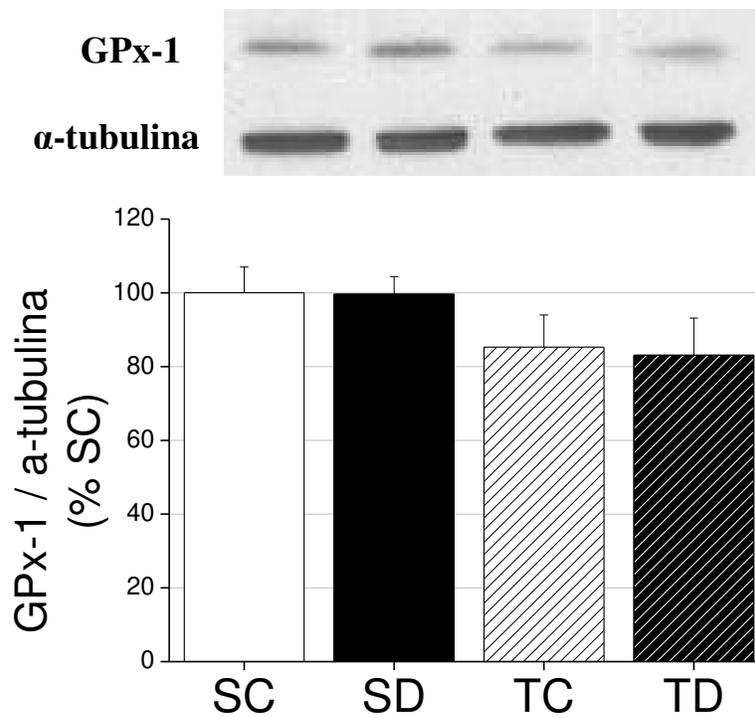
A expressão gênica da enzima antioxidante GPx apresentou aumento significativo em ilhotas pancreáticas dos grupos tratados com DEX em relação ao observado para ilhotas de animais controles (aumento de 2.6- e 3.2-vezes para SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) (FIGURA 19). Incremento de 1.2-vezes foi, ainda, observado na expressão gênica da GPx em ilhotas de ratos TD vs SD ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ).



**FIGURA 19.** Expressão gênica da enzima antioxidante GPx em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais. Foi observado aumento significativo de 2.6- e 3.2-vezes na expressão gênica da GPx em ilhotas do grupo SD e TD vs SC e TC, respectivamente. Além disso, foi observado aumento de 1.2-vezes na expressão gênica da GPx em ilhotas do grupo TD vs SD ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA do controle interno  $\beta$ -actina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* diferença significativa vs respectivo controle (efeito da dexametasona); # diferença significativa vs respectivo controle (efeito do exercício). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

**Nível protéico da enzima GPx não é alterado pelo treinamento físico e tratamento com dexametasona em ilhotas pancreáticas de ratos**

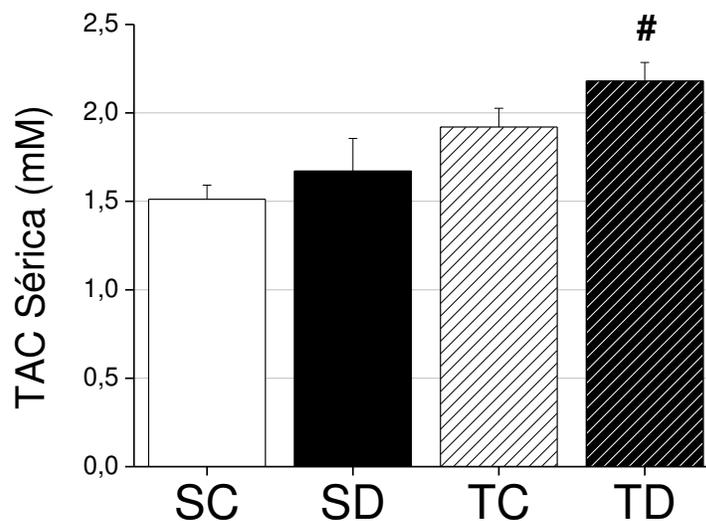
A **FIGURA 20** apresenta o nível protéico da GPx-1 em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais. Não houve alteração significativa entre os grupos ( $n = 6$ ,  $P > 0.05$ ).



**FIGURA 20.** *Nível protéico da GPx em ilhotas pancreáticas dos quatro grupos experimentais.* Não houve alteração significativa entre os grupos. Os valores foram normalizados pela expressão protéica do controle interno  $\alpha$ -tubulina, que está apresentado sob o blot ( $n = 6$ ,  $P > 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA.

## Treinamento físico promove melhora na capacidade antioxidante total sérica em ratos tratados com dexametasona

O efeito do tratamento com DEX e do treinamento físico sobre a concentração total de agentes antioxidantes no soro foi avaliado no presente trabalho, e é mostrado na **FIGURA 21**. Houve apenas leve tendência a aumento da TAC sérica nos grupos SD e TC em relação ao grupo SC ( $n = 5$ ,  $P > 0.05$ ). Aumento significativo de 1.3-vezes foi observado para o grupo TD em relação ao grupo SD ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ).



**FIGURA 21.** *Capacidade antioxidante total sérica para os quatro grupos experimentais.* Foi observado aumento de 1.3-vezes na TAC sérica do grupo TD vs SD ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. # diferença significativa vs respectivo controle (efeito do exercício). ANOVA seguido de *post test* Tukey.

**- DISCUSSÃO -**

## DISCUSSÃO

A efetividade do protocolo de treinamento físico utilizado no presente trabalho pode ser vista na **FIGURA 8**, que mostra melhora no desempenho físico dos grupos treinados (TC e TD) nos TEMs realizados 4 e 8 semanas após o início do treinamento (TEM-2 e TEM-3, respectivamente) em relação ao desempenho inicial desses mesmos animais (TEM-1) e em relação ao desempenho dos grupos que permaneceram sedentários durante todo o período (SC e SD). O protocolo experimental escolhido consistiu em treinamento físico aeróbio crônico em esteira ergométrica na intensidade de 60% da carga máxima de treino obtida em TEM sendo, este, um protocolo já utilizado por outros grupos de pesquisa e considerado como um exercício de intensidade moderada (ZANCHI et al., 2008).

O peso corpóreo dos 4 grupos experimentais foi acompanhado ao longo das 8 semanas de treinamento físico, e nenhuma alteração significativa de peso foi observada entre os grupos (**FIGURA 9**). Entretanto, após o término do tratamento com DEX foi possível observar redução significativa no peso corpóreo dos ratos SD e TD em relação aos seus respectivos pesos no início do tratamento (redução de 12 e 14% em SD e TD, respectivamente;  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ . **TABELA 2**). O tratamento com glicocorticóides é conhecido por promover redução de peso corpóreo (CALDEFIE-CHEZET et al., 2002; SAVARY et al., 2001), o que pode estar associado com perda de massa muscular como resultado da inibição da síntese protéica e aumento da proteólise (McGRATH & GOLDSPINK, 1982). Além disso, a alteração no perfil lipídico de animais tratados com glicocorticóides (NOVELLI et al., 1999; BARBERA et al., 2001; HOLNESS et al., 2005), com aumento nos níveis plasmáticos de ácidos graxos não esterificados (NEFAs) (SLAVIN

et al., 1994), indicam a ocorrência de lipólise acentuada nesses animais, o que também deve contribuir para a redução de peso corpóreo observada.

Os efeitos negativos dos glicocorticóides sobre a homeostase glicêmica dependem da dose e/ou do tempo de exposição a estes hormônios, e podem levar a um quadro de resistência periférica à insulina ou até mesmo ao surgimento do diabetes mellitus tipo 2 (JEONG et al., 2001). No presente trabalho, ratos tratados com DEX na dose de 1mg/kg de peso corpóreo durante 5 dias consecutivos apresentaram redução expressiva na sensibilidade à insulina (redução de 40% no Kitt para o grupo SD vs SC; n = 5,  $P < 0.05$ . **FIGURA 10**), o que está em acordo com dados prévios obtidos por nosso grupo (RAFACHO et al., 2007; RAFACHO et al., 2008; ANGELINI et al., 2009; RAFACHO 2009), concomitante a um aumento acentuado nos níveis glicêmicos de jejum (aumento de 3.2-vezes para SD vs SC; n = 10,  $P < 0.05$ . **TABELA 3**). Esta última observação também está em acordo com dados da literatura que demonstram a ocorrência de hiperglicemia após tratamento com altas doses de DEX (OGAWA et al., 1992). Por outro lado, o treinamento físico realizado de forma prévia ao tratamento com DEX foi capaz de prevenir a perda da sensibilidade à insulina em ratos TD, além de promover redução significativa nos níveis glicêmicos de jejum desses ratos em relação ao observado para os ratos SD (redução de 23% para TD vs SD; n = 10,  $P < 0.05$ . **TABELA 3**). Apesar da redução nos níveis glicêmicos de jejum ter sido significativa nos ratos TD vs SD, o treinamento físico não foi capaz de normalizar os níveis glicêmicos, ou seja, de trazê-los para níveis próximos ao observado para os ratos controle (TC).

Os glicocorticóides são considerados hormônios diabetogênicos por perturbarem a homeostasia da glicose, opondo-se a ação da insulina na supressão da gliconeogênese hepática e reduzindo a captação periférica de glicose, o que pode contribuir para o surgimento de hiperglicemia, como visto no presente trabalho nos animais tratados com

DEX. Os glicocorticóides podem promover seus efeitos atuando de forma direta sobre os tecidos muscular, adiposo e hepático ou podem, ainda, atuar reduzindo a capacidade de ação da insulina sobre esses tecidos. Estudos anteriores observaram, por exemplo, redução na expressão e fosforilação em Ser<sup>473</sup> e Thr<sup>308</sup> da proteína Akt em músculo e adipócitos isolados de ratos tratados com DEX (BURÉN et al., 2008). A Akt, proteína central na via de sinalização da insulina, torna-se ativa quando fosforilada nos resíduos Ser<sup>473</sup> e Thr<sup>308</sup>, e tem se mostrado necessária para a ativação de outras proteínas relacionadas com o processo de translocação de vesículas contendo GLUT-4 para a periferia das células musculares e adipócitos (RAMM et al., 2006). Por esse motivo, a redução na expressão e fosforilação da Akt foi proposta como a principal responsável pela resistência à insulina induzida por DEX (BURÉN et al., 2008). Além disso, a DEX ainda pode induzir resistência periférica à insulina através do estresse oxidativo e ativação de vias de sinalização estresse-sensíveis, como as vias da JNK e p38 MAPK. Foi demonstrado, por exemplo, aumento nos níveis intracelulares de EROs e ativação da JNK em adipócitos 3T3-L1 cultivados com DEX, o que deve estar associado a redução na sensibilidade à insulina observada nessas células (HOUSTIS et al., 2006). A ativação dessa serina/treonina-quinase pelo estresse oxidativo é responsável pela fosforilação do IR e/ou proteínas IRS em resíduos de serina ou treonina reduzindo, dessa forma, a extensão de sua fosforilação em resíduos de tirosina o que compromete a ação da insulina (EVANS et al., 2002). Já os efeitos diretos promovidos pelos glicocorticóides são iniciados quando esses hormônios se ligam ao GR, fazendo com que este seja translocado para o núcleo onde atua como regulador transcricional para genes-alvo específicos. No fígado, por exemplo, a ativação do GR induz a via gliconeogênica através do aumento da expressão gênica das enzimas PEPCK e G6Pase (revisado por VEGIOPOULOS & HERZIG, 2007).

Em condições normais, a insulina é responsável pela supressão da gliconeogênese hepática, através da redução na transcrição gênica das enzimas frutose-1-6-bisfosfatase e G6Pase. Entretanto, em condições onde a ação da insulina no fígado torna-se comprometida, como ocorre em ratos com resistência à insulina induzida por DEX, a ação da insulina como supressora da gliconeogênese é impedida. Esse efeito, associado ainda a pronunciada ação direta do glicocorticóide no aumento da expressão de enzimas gliconeogênicas, fazem com que a gliconeogênese hepática torne-se aumentada o que, certamente, constituiu um importante fator hiperglicemiante nos ratos tratados com altas doses de DEX utilizados no presente trabalho. Além disso, os aminoácidos derivados da proteólise muscular aumentada pela ação do glicocorticóide dão suporte ainda maior ao processo gliconeogênico, uma vez que atuam como substrato para a produção de nova glicose no tecido hepático. Provavelmente por prevalecer o efeito gliconeogênico da DEX sobre o fígado dos ratos TD, a glicemia de jejum desses animais não pôde ser reestabelecida pelo treinamento físico, mesmo que este tenha impedido a perda da sensibilidade à insulina nesses ratos, o que permite captação periférica normal de glicose.

O treinamento físico é capaz de melhorar a sensibilidade periférica à insulina atuando, por exemplo, no aumento da atividade da PI3K (HOUMARD et al., 1999) ou em passos distais a PI3K que levam ao aumento da translocação de vesículas contendo GLUT-4 aumentando, dessa forma, a captação de glicose pelos tecidos muscular e adiposo (KIRWAN & JING, 2002; ZIERATH, 2002; ZIERATH & WALLBERG-HENRIKSSON, 2002). Além disso, o treinamento físico ainda é capaz de aumentar a captação de glicose em músculo esquelético de forma independente da insulina, através de mecanismos associados ao próprio processo de contração muscular, que envolvem a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e o consequente aumento da translocação de vesículas contendo

GLUT-4 para a periferia dessas células (HAWLEY, 2004). Todos esses mecanismos, em conjunto, devem ter contribuído para a redução nos níveis glicêmicos de jejum observada nos ratos TD.

Níveis cronicamente elevados de glicocorticóides tem sido associados ao acúmulo de gordura hepática (processo também conhecido como esteatose hepática), sendo essa condição associada ao desenvolvimento de resistência à insulina nesse tecido. Já foi demonstrado que o tratamento de ratos com glicocorticóides leva ao aumento na síntese de triglicerídeos, diminuição na oxidação de ácidos graxos e consequente acúmulo de lipídios no fígado (COLE et al., 1982). Sendo assim, o aumento nos níveis séricos de triglicerídeos observados no presente trabalho em ratos tratados com DEX (aumento de 4.4- e 3.4-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ . **TABELA 3**) pode estar correlacionados ao efeito do glicocorticóide na indução de esteatose hepática nesses animais.

No presente trabalho, foi possível observar aumento na secreção de insulina em concentrações basal (2.8mM) e estimulatória (11.1mM) de glicose em ratos tratados com DEX em relação aos respectivos controles (em 2.8mM: aumento de 15- e 5.6-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente; em 11.1mM: aumento de 3- e 1.6-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 12$ ,  $P < 0.05$ . **FIGURA 11**). Além de aumentar a capacidade secretória de ilhotas isoladas, o tratamento com DEX promoveu aumento nos níveis insulinêmicos de jejum (aumento de 20- e 18-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 5$ ;  $P < 0.05$ . **TABELA 3**). Hiperinsulinemia de jejum e aumento da função secretória em ilhotas pancreáticas isoladas são condições frequentemente associadas à resistência periférica à insulina, constituindo um mecanismo compensatório, em geral suficiente, para a manutenção da normoglicemia (BARBERA et al., 2001; AHREN

& PACINI, 2005). Durante a resistência à insulina, o aumento na secreção de insulina é possibilitado, *in vivo*, pelo aumento na massa de células  $\beta$  pancreáticas. Dados prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que ratos tratados com DEX exibem aumento da massa de células  $\beta$  pancreáticas por hipertrofia, além de aumento na taxa proliferativa dessas células (RAFACHO et al., 2008). Além disso, também demonstramos previamente que o aumento, induzido por DEX, na capacidade secretória de ilhotas pancreáticas isoladas está associado a diversos fatores, como o aumento na função mitocondrial, sinalização do  $Ca^{2+}$  e atividade da PLC/PKC, bem como com alterações em eventos excitatórios nesse tecido (RAFACHO et al., 2010).

O treinamento físico foi capaz de aumentar a secreção de insulina estimulada por glicose (11.1mM) tanto em ratos TC quanto em ratos TD em relação aos respectivos grupos sedentários (aumento de 2.3- e 1.3-vezes em TC e TD vs SC e SD, respectivamente;  $n = 12$ ,  $P < 0.05$ . **FIGURA 11**). Existem poucos estudos na literatura que analisam a função pancreática endócrina em modelos de treinamento físico sendo esses estudos, em sua maioria, análises indiretas da secreção de insulina “*in vivo*”, através da quantificação dos níveis séricos de insulina ou através de clamp hiperglicêmico. Entre esses estudos, Choi e colaboradores (2006) demonstraram que o treinamento físico foi capaz de aumentar a função e massa de células  $\beta$  pancreáticas em ratos com diabetes induzido por pancreatectomia, graças ao aumento da expressão e fosforilação do IRS2 aumentando, dessa forma, a sinalização da via da insulina/IGF-1 nesse tecido. Além disso, em humanos com diabetes tipo 2 o exercício físico regular também proporcionou melhora na resposta secretória insulínica à hiperglicemia, o que sugere efeitos diretos do exercício na função do pâncreas endócrino (KIRÁLY et al., 2007).

Resultados referentes a experimentos *in vitro* de secreção de insulina utilizando ilhotas isoladas de ratos treinados são mais escassos na literatura. Entre esses poucos estudos, Lamontagne e colaboradores (2007) demonstraram inalteração nos níveis de insulina secretados por ilhotas isoladas de ratas treinadas, para todas as concentrações de glicose analisadas (3, 8 ou 16 mM), o que não está em acordo com o resultado obtido no presente trabalho. Os mecanismos envolvidos com essas diferenças observadas entre os 2 estudos *in vitro* não foram esclarecidos, mas podem ter ocorrido por variações no tipo de animal e protocolo de treinamento físico utilizados (protocolo utilizado por Lamontagne e colaboradores (2007): ratas fêmeas da linhagem Sprague-Dawley, treinadas em esteira ergométrica durante 90 minutos/dia, 4 dias/semana, na intensidade de 25m/min durante 10 semanas). Além disso, um possível mecanismo envolvido com esse aumento na capacidade secretória das ilhotas dos ratos treinados, seria o aumento da sinalização da via da insulina/IGF-1 nesse tecido uma vez que, diversos estudos recentes, tem sugerido um papel positivo para a insulina sobre sua própria biossíntese e secreção (revisado por LEIBIGER et al., 2008). Como dito anteriormente, Choi e colaboradores (2006) observaram aumento, induzido pelo treinamento físico, na sinalização da via da insulina/IGF-1 em ilhotas de ratos treinados. Sendo assim, é possível supor que o aumento na função secretória das ilhotas pancreáticas dos ratos treinados, observado no presente trabalho, esteja relacionado ao aumento na sinalização insulínica nesse tecido. Independentemente dos mecanismos envolvidos, o aumento na capacidade de secreção de insulina, associado ao aumento na sensibilidade periférica à insulina proporcionados pelo treinamento físico em ratos TD, certamente foram fundamentais para a redução nos níveis glicêmicos de jejum nesses animais em relação aos níveis observados para os ratos SD.

Redução no conteúdo total de insulina em ilhotas de ratos tratados com DEX (redução de 50% para SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ ) e aumento do mesmo parâmetro em ilhotas de ratos treinados (aumento de 93% para TC vs SC;  $n = 10$ ;  $P < 0.05$ . **FIGURA 12**) também foram achados interessantes do atual trabalho. Diminuição na expressão do mRNA da insulina (GOODMAN et al., 1996) e/ou desestabilização do mRNA da insulina (PHILIPPE & MISSOTTEN, 1990) são mecanismos já propostos para explicar o efeito inibitório da dexametasona sobre a biossíntese de insulina levando, dessa forma, a redução no conteúdo total de insulina intra-ilhota (JEONG et al., 2001). A redução no conteúdo total de insulina é uma característica frequentemente observada em ilhotas pancreáticas de indivíduos diabéticos e que, em geral, está associada com a deterioração da função das células  $\beta$  pancreáticas nesses indivíduos (WEIR et al., 2001). Diversas alterações estruturais e funcionais ocorrem nas células  $\beta$  pancreáticas durante a progressão de um estado pré-diabético para o diabetes. Entretanto, estabelecer limites entre as diferentes fases de progressão para o diabetes é tarefa complexa. Como a secreção de insulina mostrou-se ainda preservada nos ratos tratados com DEX no presente trabalho, a redução observada no conteúdo total de insulina intra-ilhota nesses animais pode indicar-nos que eles se encontram num estágio intermediário entre o pré-diabetes, em que predomina o aumento da produção de insulina e hiperinsulinemia compensatória a resistência periférica à insulina, e o diabetes propriamente dito, onde há redução da produção e secreção de insulina estimulada por glicose. Já o aumento observado no conteúdo total de insulina em ilhotas de ratos não foi completamente compreendido, uma vez que Koranyi e colaboradores (1991) demonstraram redução no conteúdo de mRNA da pró-insulina em ratas submetidas ao treinamento físico, o que deve contribuir para a redução no conteúdo total de insulina nesses animais. Mais uma vez o tipo de animal

e o protocolo de treinamento físico utilizados no estudo conduzido por Koranyi e colaboradores (1991) foram diferentes dos utilizados no presente estudo, o que pode estar relacionado com as diferenças observadas nos resultados dos 2 estudos. Entretanto, seriam necessárias análises morfológicas e funcionais adicionais para desvendar os mecanismos precisos envolvidos com essas alterações observadas e seus possíveis papéis na fisiologia do pâncreas endócrino nessa condição. Independentemente dos mecanismos envolvidos o fato é que, em condições patológicas onde a homeostase glicêmica é negativamente alterada, como ocorre em indivíduos com resistência periférica à insulina e/ou diabetes, intervenções capazes de aumentar a funcionalidade das células  $\beta$  pancreáticas poderiam auxiliar na prevenção da hiperglicemia, ou pelo menos amenizar os níveis glicêmicos nessas condições.

Iniciando as análises dos parâmetros relacionados ao estado redox das ilhotas pancreáticas no modelo utilizado, o primeiro dado interessante observado foi o aumento nos níveis intracelulares de EROs em ilhotas pancreáticas de ratos tratados com DEX em relação aos respectivos controles (em 2.8 mM de glicose: níveis 1.3- e 1.6-vezes maiores para SD e TD vs SC e TC, respectivamente; em 22 mM de glicose: níveis 1.1- e 2.7-vezes maiores para SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ). Além disso, o treinamento físico foi capaz de reduzir significativamente os níveis de EROs em ilhotas de ratos treinados em relação aos valores observados em ilhotas de ratos sedentários (em 2.8 mM de glicose: redução de 43% e 27% em TC e TD vs SC e SD, respectivamente; em 22 mM de glicose: redução de 69% e 27% em TC e TD vs SC e SD, respectivamente;  $n = 10$ ,  $P < 0.05$ . **FIGURA 13**). No experimento as ilhotas pancreáticas foram incubadas em duas concentrações distintas de glicose, 2.8mM e 22mM, para que fosse possível avaliar os níveis intracelulares de EROs em diferentes condições metabólicas (baixo e alto metabolismo,

respectivamente). Interessantemente, os níveis de EROs observados foram maiores em 2,8 em relação a 22mM de glicose. De acordo com dados extraídos da literatura, esse fato deve ter ocorrido, provavelmente, devido ao efeito muito mais tóxico e indutor de estresse oxidativo exercido por concentrações extremamente baixas de glicose, em comparação com altas concentrações de glicose, sobre as células  $\beta$  pancreáticas (MARTENS et al., 2005; HOU et al., 2008; JONAS et al., 2009).

O aumento nos níveis de EROs induzido pelo tratamento com DEX nas ilhotas pancreáticas analisadas é um resultado que está em acordo com dados prévios de nosso grupo, que demonstraram aumento nos níveis de EROs em células produtoras de insulina RINm5F cultivadas com DEX por 3 dias (ROMA, 2008; ROMA et al., 2009), e também com resultados de outros grupos que demonstraram aumento nos níveis de EROs em tecidos distintos, como em adipócitos 3T3-L1 cultivados com DEX (HOUSTIS et al., 2006) e em células de hipocampo cultivadas com DEX (YOU et al., 2009).

A presença de um sistema antioxidante eficaz é uma importante ferramenta de defesa intracelular contra os efeitos prejudiciais causados pelo aumento nos níveis de EROs. Isso porque os antioxidantes, enzimáticos ou não enzimáticos, são responsáveis pelo sequestro e conversão dessas EROs a espécies não reativas ou menos reativas exercendo, dessa forma, efeito protetor para possíveis alvos biológicos intracelulares, como proteínas, lipídios de membrana e ácidos nucleicos (EVANS et al., 2002; KOHEN & NYSKA, 2002). Sendo assim, alterações no grau de expressão e/ou atividade de importantes enzimas antioxidantes como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) poderiam explicar, pelo menos em parte, as alterações negativas promovidas pela DEX e/ou as alterações positivas promovidas pelo treinamento físico no balanço redox das ilhotas pancreáticas analisadas.

Nos grupos tratados com DEX observou-se, na maioria das vezes, aumento na expressão gênica das enzimas antioxidantes anteriormente citadas (*para a isoforma mitocondrial MnSOD*: aumento significativo de 1.9-vezes em SD vs SC,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$  **FIGURA 14**, e aumento não significativo de 1.4-vezes em TD vs TC,  $n = 4$ ,  $P > 0.05$ ; *para a isoforma citosólica Cu/ZnSOD*: aumento de 3- e 3.7-vezes em SD e TD vs SC e TC, respectivamente,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$  **FIGURA 15**; *para CAT*: aumento de 1.4-vezes em TD vs TC,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$  **FIGURA 17**; e *para GPx*: aumento de 2.6- e 3.2-vezes para SD e TD vs SC e TC, respectivamente;  $n = 4$ ,  $P < 0.05$  **FIGURA 19**). Esse resultado pode ter ocorrido por efeito direto da dexametasona sobre a transcrição gênica dessas enzimas antioxidantes, já que muitos dos efeitos dos glicocorticóides sobre suas células-alvo são mediados através de alterações na transcrição de genes específicos. Entretanto, já foi relatado a ocorrência de aumento, induzido por hiperglicemia, na expressão gênica de enzimas antioxidantes em ilhotas pancreáticas de ratos com diabetes induzido por pancreatectomia (LAYBUTT et al., 2002). Como os ratos tratados com DEX, utilizados no presente trabalho, tornaram-se hiperglicêmicos, um possível efeito direto da hiperglicemia no aumento da expressão gênica das enzimas antioxidantes analisada não pode ser descartado.

Os níveis protéicos das enzimas antioxidantes Cu/ZnSOD e GPx (**FIGURA 16 e FIGURA 20**, respectivamente) não revelaram o mesmo padrão observado para a expressão gênica das mesmas, mantendo-se inalterados entre os grupos. Ogawa e colaboradores (1992) trabalhando com ratos diabéticos induzidos por DEX, demonstraram aumento substancial nos níveis de mRNA para o transportador de glicose GLUT-2 em células  $\beta$  pancreáticas, acompanhado por redução nos níveis protéicos deste referido transportador. Segundo os autores deste trabalho, os mecanismos envolvidos com essas diferenças entre

expressão gênica e protéica podem incluir o bloqueio do processo de tradução ou o aumento da taxa de degradação da proteína GLUT-2, ambos induzidos pelo glicocorticóide. Corroborando com essa idéia, Gremlich e colaboradores (1997) mostraram que a taxa de tradução do GLUT-2 é minimamente afetada pela dexametasona, mas que a meia-vida do transportador é diminuída em 50%, indicando que o glicocorticóide deve ativar um mecanismo de degradação pós-traducional. Outro mecanismo possível e já proposto, seria a desestabilização dos mRNAs por ação da DEX, o que provocaria redução na síntese protéica e nos níveis de proteína observados (PHILIPPE et al., 1990). Sendo assim, como no presente trabalho o aumento nos níveis de mRNA da Cu/ZnSOD e GPx em ilhotas de ratos tratados com DEX não foram acompanhado por aumento equivalente nos níveis protéicos dessas enzimas, é possível que algum dos mecanismos pós-transcricionais ou pós-traducionais relacionados acima estejam sendo induzidos pelo tratamento com o glicocorticóide nas ilhotas pancreáticas desses ratos analisados.

Células  $\beta$  pancreáticas são extremamente vulneráveis aos aumentos nos níveis intracelulares de EROs, uma vez que essas células apresentam baixa expressão e atividade de enzimas antioxidantes em relação ao observado para outros tecidos (LENZEN et al., 1996; TIEDGE et al., 1997). Hoje em dia sabe-se que o estresse oxidativo, gerado por hiperglicemia crônica, é um dos responsáveis pela deterioração da função e perda de massa de células  $\beta$  pancreáticas durante a progressão do diabetes. Sendo assim, intervenções capazes de melhorar a capacidade antioxidante de células  $\beta$  pancreáticas poderiam ser benéficas por aumentar a resistência dessas células ao estresse oxidativo, o que poderia prevenir, ou pelo menos atrasar, a perda de função e massa de células  $\beta$  pancreáticas nessa condição patológica. O treinamento físico de intensidade moderada é uma das ferramentas utilizadas com o intuito de aumentar a resistência ao estresse oxidativo, principalmente nos

músculos ativos durante o exercício. Apenas um trabalho encontrado na literatura associa os efeitos do treinamento físico moderado sobre a capacidade antioxidante do pâncreas endócrino em ratos diabéticos. Nesse estudo, dirigido por Coskun e colaboradores (2006), foi observado aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em homogenado de pâncreas de ratos com diabetes tipo 1 treinados em relação aos não treinados. Em nosso trabalho, também observamos efeito positivo do treinamento físico sobre o sistema antioxidante das ilhotas pancreáticas analisadas por aumento nos níveis protéicos da enzima catalase (aumento de 1.5- e 1.6-vezes para TC e TD *vs* SC e SD, respectivamente;  $n = 6$ ,  $P < 0.05$  **FIGURA 18**). A catalase é uma enzima antioxidante capaz de remover o  $H_2O_2$  intracelular formado por dismutação dos  $O_2^-$ . Como a sonda DCFH-DA utilizada no presente trabalho para a análise da produção intracelular de EROs é mais especificamente oxidada por  $H_2O_2$  (revisado por SILVEIRA, 2004), é possível supor que o aumento nos níveis protéicos da CAT em ilhotas pancreáticas de ratos treinados tenha contribuído, pelo menos em parte, para a redução nos níveis de EROs observada nessas ilhotas.

O  $H_2O_2$  não é considerado uma espécie muito reativa, entretanto pode ser citotóxico em concentrações micromolares. Devido ao seu elevado  $K_m$ , a catalase é a enzima responsável pela remoção de  $H_2O_2$  quando este está presente em altas concentrações intracelulares. Como a expressão da catalase em células  $\beta$  pancreáticas é extremamente baixa (LENZEN et al., 1996; TIEDGE et al., 1997), isso lhes confere especial sensibilidade a níveis intracelulares elevados de  $H_2O_2$ . Dados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram, através da superexpressão da catalase em células produtoras de insulina RINm5F, a importância dessa enzima antioxidante para a proteção dessas células contra o estresse oxidativo induzido por DEX (ROMA et al., 2009). Por ter sido capaz de

aumentar a expressão da catalase em ilhotas pancreáticas, o treinamento físico pode ser considerado como uma importante intervenção protetora do pâncreas endócrino contra o estresse oxidativo.

Além de modular a capacidade antioxidante, é preciso levar em conta que outros mecanismos também podem estar envolvidos com a redução, induzida pelo treinamento físico, nos níveis de EROs em ilhotas pancreáticas de ratos treinados. Um mecanismo possível, mas não avaliado no presente trabalho, seria a redução na expressão e/ou atividade da NADPH oxidase nesse tecido. A NADPH oxidase é um complexo enzimático presente em diversos tipos celulares, incluindo células  $\beta$  pancreáticas. Este complexo está associado a membrana plasmática e é responsável pela redução de  $O_2$  a  $O_2^-$  usando NADPH como doador de elétrons (INOBUCHI et al., 2000; MORGAN et al., 2007). Alguns estudos já demonstraram o efeito modulatório do treinamento físico sobre a expressão e atividade da NADPH oxidase em diversos tecidos. Entre esses estudos, Zanchi e colaboradores (2008) mostraram redução na atividade da NADPH oxidase em aorta torácica de ratos após treinamento físico moderado durante 11 semanas. Sakurai e colaboradores (2009) demonstraram, ainda, redução na expressão da NADPH oxidase (NOX-2) em tecido adiposo de ratos após treinamento físico durante 9 semanas, o que contribuiu para a redução do estresse oxidativo nesse tecido. Sendo assim, o treinamento físico também poderia exercer efeito negativo sobre a expressão e/ou atividade da NADPH oxidase em outros tecidos como, por exemplo, em ilhotas pancreáticas, o que contribuiria para a redução nos níveis de EROs formados nesses tecidos. Ainda com relação ao papel da NADPH oxidase na produção intracelular de EROs, alguns estudos tem mostrado que o aumento do estresse oxidativo induzido por DEX, pode se dar por aumento na expressão da NADPH oxidase. Entre esses estudos, You e colaboradores (2009) demonstraram

aumento nos níveis intracelulares de EROs e na expressão do mRNA da NADPH oxidase em células de hipocampo cultivadas em presença de DEX. Outro estudo demonstrou aumento nos níveis intracelulares de EROs, induzido por DEX, em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), efeito evitado pelo uso de inibidor da NADPH oxidase em cultura dessas células com DEX (IUCHI et al., 2003). Sendo assim, é possível que o aumento observado no presente trabalho nos níveis de EROs em ilhotas pancreáticas de ratos tratados com DEX, possa ter ocorrido por efeito direto do glicocorticóide no aumento da expressão da NADPH oxidase nesse tecido.

A capacidade antioxidante total sérica (TAC) também foi avaliada no presente estudo nos quatro grupos experimentais (**FIGURA 21**). Esse parâmetro refere-se a atividade antioxidante combinada de todos os constituintes do soro, incluindo vitaminas, proteínas, lipídeos, glutathiona, ácido úrico, etc. Aumento significativo na TAC sérica foi observada apenas no grupo TD vs SD (aumento de 1.3-vezes;  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ), e apenas uma tendência a aumento no grupo TC vs SC (aumento não significativo;  $n = 5$ ,  $P > 0.05$ ). O aumento na TAC sérica, induzido por treinamento físico, também foi observado por outros autores (CHILD et al., 1998; SCHNEIDER et al., 2005) e, segundo esses autores, deve ter ocorrido graças a uma maior liberação de substâncias antioxidantes durante o exercício, entre elas o ácido úrico (MASTALOUDIS et al., 2001).

Os dados obtidos no presente trabalho nos permitiram comprovar o efeito diabetogênico da dexametasona administrada de forma crônica e em altas doses em ratos, promovendo a instalação de um quadro de resistência periférica à insulina, dislipidemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia de jejum, além de promover aumento significativo nos níveis de EROs em ilhotas pancreáticas. Além disso, o treinamento físico moderado, realizado previamente ao tratamento dos animais com solução fisiológica ou DEX,

monstrou ter efeito positivo sobre diversos parâmetros como, por exemplo, prevenindo a resistência à insulina induzida pelo tratamento com o glicocorticóide, aumentando a sensibilidade das ilhotas pancreáticas frente ao estímulo por glicose, reduzindo os níveis glicêmicos de jejum dos ratos tratados com DEX, além de aumentar os níveis protéicos da enzima antioxidante catalase e reduzir os níveis de EROs em ilhotas pancreáticas. Sendo assim, o treinamento físico mostrou ser uma intervenção capaz não só de evitar o surgimento de disfunções metabólicas que, em conjunto, poderiam contribuir para a progressão do estágio de pré-diabetes para o diabetes, mas também de aumentar a resistência das ilhotas pancreáticas ao estresse oxidativo. Prevenir, ou pelo menos reduzir o estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas no estágio pré-diabético é uma estratégia que poderia atrasar a deterioração da função e/ou a perda de massa de células  $\beta$  pancreáticas, características observadas durante a progressão para o diabetes tipo 2.

**- CONCLUSÕES -**

## CONCLUSÕES

### *Animais submetidos ao treinamento físico*

- O exercício físico aeróbio crônico de intensidade moderada foi capaz de aumentar o conteúdo total de insulina e a capacidade secretória de ilhotas pancreáticas isoladas frente ao estímulo por glicose (11.1mM). Os mecanismos exatos envolvidos com estas alterações não foram esclarecidos, mas podem envolver o aumento da sinalização insulínica nas ilhotas pancreáticas desses animais;
- Foi observada redução significativa nos níveis de EROs nas ilhotas pancreáticas desses animais. Essa redução deve ter ocorrido, pelo menos em parte, por aumento na degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> já que a enzima catalase, responsável por essa degradação, teve seus níveis protéicos aumentados pelo treinamento físico nesse tecido. Redução na expressão e/ou atividade da NADPH oxidase também poderia estar associada a redução nos níveis de EROs nessas ilhotas;

### *Animais tratados com dexametasona*

- A administração de altas doses de DEX em ratos (1mg/kg de peso corpóreo, intraperitonealmente, durante 5 dias consecutivos) foi capaz de induzir resistência periférica à insulina (RI) e hiperglicemia de jejum nesses animais. A hiperglicemia de jejum deve ter ocorrido em decorrência do aumento na resistência à insulina nesses animais, o que reduz a captação periférica de glicose, mas também por aumento da produção hepática de glicose, já que os glicocorticóides estimulam o processo gliconeogênico;

- Foram observados hiperinsulinemia de jejum e aumento na capacidade secretória de ilhotas pancreáticas isoladas frente ao estímulo por glicose (2.8 e 11.1mM). Essas características são frequentemente observadas em modelos de resistência à insulina, e devem ocorrer como mecanismo compensatório a redução na ação da insulina sobre seus tecidos-alvo;
- Os níveis de EROs foram aumentados em ilhotas pancreáticas pelo tratamento com DEX. Um possível aumento na expressão da NADPH oxidase poderia explicar o efeito direto da DEX no aumento dos níveis de EROs nesse tecido;

#### **Animais submetidos ao treinamento físico e tratamento com dexametasona**

- O treinamento físico foi capaz de prevenir a instalação de RI em ratos tratados com DEX, o que deve ter contribuído para a ocorrência de níveis glicêmicos de jejum mais baixos nesses ratos em relação aos ratos SD. Entretanto, o treinamento físico não foi capaz de normalizar os níveis glicêmicos de jejum nesses animais, provavelmente por prevalecer o efeito gliconeogênico imposto pelo tratamento com DEX;
- Semelhante ao observado para ratos SD, esses ratos exibiram hiperinsulinemia de jejum e aumento na capacidade secretória insulínica de ilhotas pancreáticas isoladas frente ao estímulo por glicose (2.8 e 11.1mM). Em 11.1mM de glicose, o treinamento físico proporcionou aumento ainda maior na secreção de insulina nos ratos tratados com DEX em relação ao observado para ratos SD;
- O treinamento físico foi capaz de reduzir os níveis de EROs em ilhotas pancreáticas de ratos tratados com DEX em relação ao observado para ratos SD. Esse efeito

também deve estar relacionado ao aumento nos níveis protéicos da enzima catalase nas ilhotas desses animais;

Em conclusão, a prática de atividade física regular mostrou ser uma intervenção capaz de melhorar a homeostase glicêmica, bem como de aumentar a resistência das ilhotas pancreáticas ao estresse oxidativo. Esse último efeito, em particular, deve ser benéfico para indivíduos pré-diabéticos, evitando a deterioração da função e apoptose de células  $\beta$  pancreáticas, características marcantes durante a progressão para o diabetes.

**- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRÉN, B.; PACINI, G. Islet adaptation to insulin resistance: mechanisms and implications for intervention. **Diabetes Obes Metab**, v.7, p.2-8, 2005.

AHRÉN, B. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. **Nat Rev Drug Discov**, v.8, p.369-385, 2009.

AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. Antioxidant system and oxidative stress in the testes. **Oxid Med Cell Longev**, v.1(1), p.15-24, 2008.

AMARAL, S.L.; PAPANEEK, P.E.; GREENE, A.S. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, p. H1163 – H1169, 2001.

AMARAL S.L.; MICHELINI, L.C. Sistema cardiovascular no exercício. In: Tirapegui J. **Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física**. São Paulo: Atheneu, p. 229-242, 2005.

ANGELINI, N.; RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R. Involvement of the cholinergic pathway in glucocorticoid-induced hyperinsulinemia in rats. **Diab Res Clin Pract**, 2009 (article in press).

BARBERA, M.; FIERABRACCI, V.; NOVELLI, M.; BOMBARA, M.; MASIELLO, P.; BERGAMINI, E.; DE TATA, V. Dexamethasone-induced insulin resistance and pancreatic adaptative response in aging rats are not modified by oral vanadyl sulfate treatment. **Eur J Endocrinol**, v.145, p.799-806, 2001.

BOSCHERO, A.C. Acoplamento da estimulação-secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.40, n.3, p.149-155, 1996.

BROWNLEE, M. A radical explanation for glucose-induced  $\beta$  cell dysfunction. **J Clin Invest**, v.112, p.1788-1790, 2003.

BURÉN, J.; LAI, Y.C.; LUNDGREN, M.; ERIKSSON, J.W.; JENSEN, J. Insulin action and signaling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v.474(1), p.91-101, 2008.

BURKS, D.J.; WHITE, M.F. IRS proteins and  $\beta$ -cell function. **Diabetes**, v.50(suppl.1), p.S140-S145, 2001.

CALDEFIE-CHEZET, F.; MOINARD, C.; MINET-QUINARD, R.; GACHON, F.; CYNOBER, L.; VASSON, M. Dexamethasone treatment induces long-lasting hyperleptinemia and anorexia in old rats. **Metabolism**, v.50, p.1054-1058, 2002.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.46, n.4, p.419-425, 2002.

CARVALHO, C.R.O.; SAAD, M.J.A. Resistência à insulina induzida por glicocorticóides: investigação de mecanismos moleculares. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.42(1), p.13-21, 1998.

CAZZOLA, R.; RUSSO-VOLPE, S.; CERVATO, G.; CESTARO, B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. **Eur J Clin Invest**, v.33, p.924-930, 2003.

CEJUDO, P.; BAUTISTA, J.; MONTEMAYOR, T.; VILLAGÓMEZ, R.; JIMÉNEZ, L.; ORTEGA, F.; CAMPOS, Y.; SÁNCHEZ H.; ARENAS, J. Exercise training in mitochondrial myopathy: a randomized controlled trial. **Muscle Nerve**, v. 32, n.3, p. 342-350, 2005.

CHILD, R.B.; WILKINSON, D.M.; FALLOWFIELD, J.L.; DONNELLY, A.E. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. **Med Sci Sports Exerc**, v.30, p.1603-1607, 1998.

CHOI, S.B.; JANG, J.S.; HONG, S.M.; JUN, D.W.; PARK, S. Exercise and dexamethasone oppositely modulate  $\beta$ -cell function and survival via independent pathway in 90% pancreatectomized rats. **J Endocrinol**, v.190, p.471-482, 2006.

COLE, T.G.; WILCOX, H.G.; HEIMBERG, M. Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism. **J Lipid Res**, v.23, p.81-91, 1982.

COOPER, C.E.; VOLLARD, N.B., CHOUEIRI, T., WILSON, M.T. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v.30, p.280-5, 2002.

COSKUN, O; OCAKCI, A.; BAYRAKTAROGLU, T.; KANTER, M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. **Tohoku J Exp Med**, v.203, p.145-154, 2004.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D.P.; CAPUTI, A.P.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol Rev**, v.53, p.135-159, 2001.

DEKKERS, J.C.; VAN DOORNEN, L.J.; KEMPER, H.C. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. **Sports Med**, v.21, p.213-238, 1996.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. **Biol Signals Recept**, v.10, p.125-40, 2001.

DORN, J.; NAUGHTON, J.; IMAMURA, D.; TREVISAN, M. Correlates of compliance in a randomized exercise trial in myocardial infarction patients. **Med Sci Sports and Exerc**, v. 33, p. 1976-8, 2001.

EVANS, J.L.; GOLDFINE, I.D.; MADDUX, B.A.; GRODSKY, G.M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v.23, p.599-622, 2002.

EVANS, J.L.; MADDUX, B.A.; GOLDFINE, I.D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. **Antioxid Redox Signal**, v.7, p.1040-1052, 2005.

GALVÃO, D.A.; NEWTON, R.U.; TAAFFE, D.R. Anabolic responses to resistance training in older men and women: a brief review. **J Aging Phys act**, v. 13, n.3, p. 343-358, 2005.

GOODMAN, P.A.; MEDINA-MARTINEZ, O.; FERNANDEZ-MEJIA, C. Identification of the human insulin negative regulatory element as a negative glucocorticoid response element. **Mol Cell Endocrinol**, v.120, p.139-146, 1996.

GRACY, R.W.; TALENT, J.M.; KONG, Y.; CONRAD, C.C. Reactive oxygen species: The unavoidable environmental insult? **Mutat Res**, v.428, p.17-22, 1999.

GREMLICH S.; RODUIT, R.; THORENS, B. Dexamethasone induces posttranslational degradation of GLUT-2 and inhibition of insulin secretion in isolated pancreatic  $\beta$  cells. **J Biol Chem**, v.272, p.3216-3222, 1997.

HAWLEY, J.A. Exercise as a therapeutic intervention for the prevention and treatment of insulin resistance. **Diabetes Metab Res Rev**, v.20, p.383-393, 2004.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GÖRGÜN, C.Z.; UYSAL, K.T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G.S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v.420, p.333-336, 2002.

HOLNESS, M.J.; SMITH, M.D.; GREENWOOD, G.K.; SUGDEN, M.C. Interactive influences of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  activation and glucocorticoids on pancreatic beta cell compensation in insulin resistance induced by dietary saturated fat in the rat. **Diabetologia**, v. 48, p. 2062-2068, 2005.

HOUMARD, J.A.; SHAW, C.D.; HICKEY, M.S.; TANNER, C.J. Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI3-kinase activity in human skeletal muscle. **Am J Physiol**, v.277, p.E1055-E1060, 1999.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E.D.; LANDER, E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v.44, p.944-948, 2006.

HOLLANDER, J.; BEJMA, J.; OOKAWARA, T.; OHNO, H.; JI, L.L. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific effect of age. **Mech Ageing Dev**, v.116, p.33-45, 2000.

HOU N.; TORII, S.; SAITO, N.; HOSAKA, M.; TAKEUCHI, T. Reactive oxygen species-mediated pancreatic  $\beta$ -cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases. **Endocrinology**, v.149, p.1654-1665, 2008.

HRBAC, J.; KOHEN, R. Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implications for health and disease. **Drug Develop Res**, v.50, p.516-527, 2000.

HUNTER, G.R.; BAMMAN, M.M.; LARSON-MEVER D.E.; JOANISSE, D.R.; McCARTHY, J.P.; BLAUDEAU, T.E.; NEWCOMER, B.R. Inverse relationship between exercise economy and oxidative capacity in muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 94, n. 5-6, p. 558-568, 2005.

INOUCHI, T.; LI, P.; UMEDA, F.; YU, H.Y.; KAKIMOTO, M.; IMAMURA, M.; AOKI, T.; ETOH, T.; HASHIMOTO, T.; NARUSE, M.; SANO, H.; UTSUMI, H.; NAWATA, H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v.49, p.1939-1945, 2000.

IUCHI, T.; AKAIKE, M.; MITSUI, T.; OHSHIMA, Y.; SHINTANI, Y.; AZUMA, H.; MATSUMOTO, T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. **Circ Res**, v.92, p.81-87, 2003.

JENKINS, R.R. Exercise, oxidative stress, and oxidants: a review. **Int J Sport Nutr**, v.3, p.356-375, 1993.

JEONG, I.; OH, S.; KIM, B.; CHUNG, J.; MIN, Y.; LEE, M.; KIM, K. The effect of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. **Diabetes Res Clin Pract**, v.51, p.163-171, 2001.

JONAS, J.C.; BENSELLAM, M.; DUPREZ, J.; ELOUIL, H.; GUIOT, Y.; PASCAL, S.M.A. Glucose regulation of islet stress responses and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes. **Diabetes Obes Metab**, v.11 (Suppl. 4), p.65-81, 2009.

KANETO, H.; XU, G.; FUJII, N.; KIM, S.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. **J Biol Chem**, v.277, p.30010-30018, 2002.

KANETO, H.; NAKATANI, Y.; MIYATSUKA, T.; KAWAMORI, D.; MATSUOKA, T.A.; MATSUHISA, M.; KAJIMOTO, Y.; ICHIJO, H.; YAMASAKI, Y.; HORI, M. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. **Nature Med**, v.10, p.1128-1132, 2004.

KIRÁLY, M.A.; BATES, H.E.; YUE, J.T.Y.; GOCHE-MONTES, D.; FEDIUC, S.; PARK, E.; MATTHEWS, S.G.; VRANIC, M.; RIDDELL, M.C. Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. **Metabolism**, v.56, p.732-744, 2007.

KIRWAN, J.P.; JING, M. Modulation of insulin signaling in human skeletal muscle in response to exercise. **Exerc Sport Sci Rev**, v.30, p.85-90, 2002.

KOHEN, R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v.148, p.149-157, 2000.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol Pathol**, v.30, p.620-650, 2002.

KORANYI, L.I.; BOUREY, R.E.; SLENTZ, C.A.; HOLLOSZY, J.O.; PERMUTT, M.A. Coordinate reduction of rat pancreatic islet glucokinase and proinsulin mRNA by exercise training. **Diabetes**, v.40, p.401-404, 1991.

LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, p. 35-39, 1967.

LAMONTAGNE, J.; MASIELLO, P.; MARCIL, M.; DELGHINGARO-AUGUSTO, V.; BURELLE, Y.; PRENTKI, M.; NOLAN, C.J. Circulating lipids are lowered but pancreatic islet lipid metabolism and insulin secretion are unaltered in exercise-trained female rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.32, p.241-248, 2007.

LARDINOIS, O.M. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. **Free Radic Res**, v.22, p.251-274, 1995.

LAYBUTT, D.R.; KANETO, H.; HASENKAMP, W.; GREY, S.; JONAS, J-C; SGROL, D.C., GROFF, A.; FERRAN, C.; BONNER-WEIR, S.; SHARMA, A.; WEIR, G.C. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to  $\beta$ -cell survival during chronic hyperglycemia. **Diabetes**, v.51, p.413-423, 2002.

LEEUWENBURGH C.; HOLLANDER, J.; LEICHTWEIS, S.; GRIFFITHS, M.; GORE, M.; JI, L.L. Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. **Am J Physiol**, v.272, p.R363-369, 1997.

LEIBIGER, I.B.; LEIBIGER, B.; BERGGREN, P-O. Insulin signaling in the pancreatic  $\beta$ -cell. **Annu Rev Nutr**, v.28, p.233-51, 2008.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various others mouse tissues. **Free Radic Biol Med**, v.20(3), p.463-6, 1996.

MARGARITIS, I.; TESSIER, F.; RICHARD, M-J; MARCONNET, P. No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. **Int J Sports Med**, v.18, p.186-190, 1997.

MARTENS, G.A.; CAI, Y.; HINKE, S.; STANGÉ, G.; CASTEELE, M.V.; PIPELEERS, D. Glucose supresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic  $\beta$  cells. **J Biol Chem**, v.280, p.20389-20396, 2005.

MASTALOUDIS, A.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. **Free Radic Biol Med**, v.31, p.911-922, 2001.

McGRATH, J.A.; GOLDSPIK, D.F. Glucocorticoid actions on protein synthesis and protein breakdown in isolated skeletal muscles. **Biochem J**, v.206, p.641-645, 1982.

MEYDANI, M.; EVANS, W.; HANDELMAN, G.; FIELDING, R.A.; MEYDANI, S.N.; FIATARONE, M.A.; BLUMMERG, J.B.; CANNON, J.G. Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. **Ann N Y Acad Sci**, v.669, p.363-364, 1992.

MORGAN, D.; OLIVEIRA-EMILIO, H.R.; KEANE, D.; HIRATA, A.E.; SANTOS DA ROCHA, M.; BORDIN, S.; CURI, R.; NEWLHOLME, P.; CARPINELLI, A.R. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal  $\beta$  cell line. **Diabetologia**, v.50, p.359-369, 2007.

NOVELLI, M.; de TATA, V.; BOMBARA, M.; LORENZINI, A.; MASINI, M.; POLLERA, M.; BERGAMINI, E.; MASIELLO, P. Insufficient adaptative capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. **J Endocrinol**, v. 162, p. 425-432, 1999.

OGAWA, A.; JOHNSON, J.H.; OHNEDA, M.; MCALLISTER, C.T.; INMAN, L.; ALAM, T.; UNGER, R.H. Roles of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes. **J Clin Invest**, v. 90, p.497-504, 1992.

SCHNEIDER, C.D.; BARP, J.; RIBEIRO, J.L.; BELLÓ-KLEIN, A. OLIVEIRA, A.R. Oxidative stress after three different intensities of running. **Can J Appl Physiol**, v.30(6), p.723-34, 2005.

PESCATELLO, L.S. ET AL. American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and Hypertension. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, n.3, p. 533-53; 2004.

PHILLIPPE, J.; MISSOTTEN, M. Dexamethasone inhibits insulin biosynthesis by destabilizing insulin messenger ribonucleic acid in hamster insulinoma cells. **Endocrinology**, v.127, p.1640-1645, 1990.

POWERS, S.K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L.L.; MARTIN, D.; HERB, R.A.; DUDLEY, G. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **Am J Physiol**, v.266, p.R375-R380, 1994.

RAFACHO, A.; ROMA, L.P.; TABOGA, S.R.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v.85(5), p.536-45, 2007.

RAFACHO, A.; GIOZZET, V.A.G.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R.; Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v.36(3), p.284-293, 2008.

RAFACHO, A.; CESTARI, T.M.; TABOGA, S.R.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.296(4), p.E681-9, 2009.

RAFACHO, A.; MARROQUÍ, L.; TABOGA, S.R.; ABRANTES, J.L.F.; SILVEIRA, L.R.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; BOSQUEIRO, J.R.; NADAL, A.; QUESADA, I. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. **Endocrinology**, v.151, p.85-95, 2010.

RAMM, G.; LARANCE, M.; GUILHAUS, M.; JAMES, D.E. A role for 14-3-3 in insulin-stimulated GLUT-4 translocation through its interaction with the RabGAP AS160. **J Biol Chem**, v.281(39), p.29174-80, 2006.

REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v.37, 1595-1607, 1988.

REYNOLDS, R.M.; WALKER, B.R. Human insulin resistance: the role of glucocorticoids. **Diabetes Obes Metab**, v.5, p.5-12, 2003.

ROLO, A.P.; PALMEIRA, C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.212, p.167-178, 2006.

ROMA, L.P. Mecanismos moleculares do efeito citotóxico da dexametasona em linhagens de células beta e ilhotas pancreáticas. Campinas, 2008. (Tese de doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas).

ROMA, L.P.; BOSQUEIRO, J.R.; CUNHA, D.A.; CARNEIRO, E.M.; GURGULCONVEY, E.; LENZEN, S.; BOSCHERO, A.C.; SOUZA, K.L.A. Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression. **Free Radic Biol Med**, v.47, p.1386-1393, 2009.

RYDER, J.W, CHIBALIN, A.V, ZIERATH, J.R. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. **Acta Physiol Scand**, v.171, n.3, p. 249-57, 2001.

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis Res**, v.4, p.146-150, 2002.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.

SATO, Y.; NAGASAKI, M.; NAKAI, N.; FUSHIMI, T. Physical exercise improves glucose metabolism in lifestyle-related diseases. **Exp Biol Med**, v.228, p.1208-1212, 2003.

SAVARY, I.; DEBRAS, E.; DARDEVET, D.; RANBOURDIN, F.; VASSON, M.P.; OBLED, C.; GRIZARD, J. Evidence for an alteration of plasma and liver proteins response to dexamethasone in aging rats. **Mech Aging Dev**, v.122, p.105-120, 2001.

SHOJI, V.M, FORJAZ, C.L. de M. Treinamento físico na Hipertensão Arterial. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v.10, n.6, supl A, p. 7-14, 2000.

SILVA, G.J.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M.. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.30, n.3 Pt 2, p. 714-9, 1997.

SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.48, n.6, p.812-822, 2004.

SLAVIN, B.G.; ONG, J.M.; KERN, P.A. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J Lipid Res**, v.35, p.1535-1541, 1994.

TIEDGE, M.; LORTZ, S.; DRINKGERN, J.; LENZEN, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes**, v.46(11), p.1733-42, 1997.

THOMPSON, A.; ARANY, E.J.; HILL, D.J.; YANG, K. Glucocorticoid receptor expression is altered in pancreatic B cells of the non-obese diabetic mouse during postnatal development. **Metabolism**, v.51, p.765-768, 2002.

VEGIOPOULOS, A.; HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. **Mol Cell Endocrinol**, v.275, p.43-61, 2007.

YOU, J.M.; YUN, S.J.; NAM, K.N.; KANG, C.; WON, R.; LEE, E.H. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. **Can J Physiol Pharmacol**, v.87(6), p.440-447, 2009.

WANG, M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the metabolic syndrome. **Nutr Metab**, v.2(3), p.1-14, 2005.

WEIR, G.C.; LAYBUTT, D.R.; KANETO, H.; BONNER-WEIR, S.; SHARMA, A.  $\beta$ -cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. **Diabetes**, v.50(Suppl.1), p.S154-S159, 2001.

ZANCHI, N.E.; BECHARA, L.R.G.; TANAKA, L.Y.; DEBBAS, V.; BARTHOLOMEU, T.; RAMIRES, P.R. Moderate exercise training decreases aortic superoxide production in myocardial infarcted rats. **Eur J Appl Physiol**, v.104, p.1045-1052, 2008.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**, v.4, p.574-89, 2004.

ZIERATH, J.R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. From receptor to effector: Insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetics patients. **Ann N Y Acad Sci**, v.967, p.120-134, 2002.

ZIERATH, J.R. Invited review: Exercise training-induced changes in insulin signaling in skeletal muscle. **J Appl Physiol**, v.93, p.773-781, 2002.

ZOPPI, C.C.; ANTUNES-NETO, J.; CATANHO, F.O.; GOULART, L.F.; MOTTAE MOURA, N.; VAZ DE MACEDO, D. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev Paul Educ Fis**, v.17, p.119-130, 2003.

**- ANEXOS -**



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

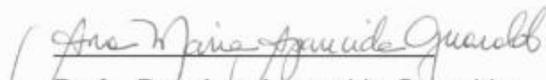
**CERTIFICADO**

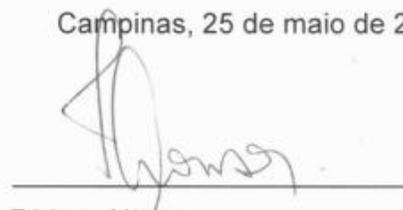
Certificamos que o Protocolo nº **1502-1**, sobre "**Investigação dos possíveis efeitos preventivos do exercício físico sobre o estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas de ratos tratados com dexametasona**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro / Julia Laura Fernandes Abrantes**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **25 de maio de 2008**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1502-1**, entitled " \_\_\_\_\_ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **May 25, 2008**.

Campinas, 25 de maio de 2008.

  
Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva