



Respostas fisiológicas ao exercício agudo em ratos obesos tratados com metformina*

Gustavo Gomes de Araujo, Michel Barbosa de Araújo, Clécia Soares de Alencar Mota, Carla Ribeiro, Ricardo Antonio D'Angelo, Fúlvia de Barros Manchado e Eliete Luciano

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar as respostas fisiológicas ao exercício agudo em ratos Wistar obesos, tratados com metformina. Os animais receberam injeção subcutânea de glutamato monossódico (4mg/g peso corporal), para indução da obesidade. Os animais foram divididos em 4 grupos, conforme o tratamento recebido: obesos controles (OC); obesos metformina (OM); obesos controles exercitados (OCE) e obesos metformina exercitados (OME). Foram analisados, antes e após uma sessão de exercício agudo: glicose sérica (mg/dL), triglicerídeos (g/100g), colesterol total (mg/dL) e hematócrito (%). Os valores de glicose sérica e colesterol total foram reduzidos significativamente no grupo controle exercitado (OCE – $68,4 \pm 14,7$ e $70,8 \pm 18,3$) em comparação ao grupo controle sedentário (OC – $83,6 \pm 12,8$ e $91,3 \pm 9,6$). A administração de metformina isoladamente diminuiu a concentração de glicose de $83,6 \pm 12,8$ (OC) para $70,8 \pm 5,9$ (OM). Por outro lado, a associação de metformina com exercício aumentou a disponibilidade de triacilgliceróis livres após a atividade (OM – $166,6 \pm 11,3$, OME – $184,0 \pm 4,3$). Em conclusão o programa de intervenção utilizado (exercício físico agudo) mostrou-se eficiente na homeostasia glicêmica, bem como, nos níveis circulantes de lipídios em ratos obesos tratados com metformina.

ABSTRACT

Physiological responses to intense exercise in obese rats treated with metformin

The purpose of the present study was to investigate the physiological responses to intense exercise in obese Wistar rats treated with metformin. To induce obesity, all animals were infused with monosodic glutamate (4 mg/g of body weight) via subcutaneous injection. The rats were divided in 4 groups according to the received treatment: obese control (OC); obese metformin (OM); obese control exercise (OCE) and obese metformin exercise (OME). Before and after one session of intense exercise the following parameters were measured: serum glucose (mg/dl), triglycerides (g/100g), total cholesterol (mg/dl) and haematocrit (%). The values of serum glucose and total cholesterol were significantly reduced in control exercise group (OCE – 68.4 ± 14.7 and 70.8 ± 18.3) compared to obese control sedentary group (OC – 83.6 ± 12.8 and 91.3 ± 9.6). The isolate metformin infusion decreased the glucose concentration from 83.6 ± 12.8 (OC) to 70.8 ± 5.9 (OM). On the other hand, metformin associated with exercise increased the availability of free triglycerides after exercise (OM – 166.6 ± 11.3 , OME – 184.0 ± 4.3). In conclusion, the present intervention program (intense physical exercise) showed to be efficient on glycaemic homeostasis, as well as on lipids circulatory levels in obese rats treated with metformin.

* Departamento de Educação Física, IB, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. Aceito em 13/6/07.

Endereço para correspondência: Professora Eliete Luciano, Departamento de Educação Física, IB, UNESP, Av. 24 A, 1.515 – 13506-900 – Rio Claro, SP, Brasil. E-mail: gusta_ef@yahoo.com.br

Palavras-chave: Metformina. Obesidade. Natação.

Keywords: Metformin. Obesity. Swimming.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a obesidade tem sido considerada como uma doença multifatorial resultante de uma complexa interação de fatores culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos⁽¹⁻²⁾.

Existem evidências de que o excesso de gordura corporal desempenha importante papel no comprometimento das funções metabólicas, constituindo-se num dos fatores de risco mais significativos para o aparecimento de doenças crônico-degenerativas como: hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares⁽³⁾.

O diabetes mellitus tipo 2 afeta aproximadamente 160 milhões de pessoas em todo mundo e 90% do total de diabéticos, provocando desse modo um estado fisiológico de resistência à ação da insulina associado a uma deficiência de sua secreção nesses indivíduos⁽⁴⁾. A ineficiência pancreática de secreção da insulina, juntamente com a resistência tecidual e celular desse hormônio, resulta num aumento descomunal da glicose sanguínea levando o indivíduo a um estado de hiperglicemia, elevando assim os riscos de morbidade vascular entre outras complicações⁽⁵⁻⁶⁾. Os principais agentes causadores dessa doença ainda não estão bem definidos, por outro lado sabe-se que a maior propensão encontra-se em adultos acima de 40 anos, principalmente se estes são obesos⁽⁷⁾.

O tratamento do diabetes tipo 2 requer inúmeras vezes intervenções medicamentosas quando não se consegue reduzir os sintomas apenas com mudanças no estilo de vida. Atualmente, são crescentes os estudos que investigam o melhor tratamento farmacológico para o diabetes mellitus tipo 2⁽⁸⁾. No entanto, dentre os fármacos mais utilizados, a metformina descoberta por Kalkhoff *et al.*⁽⁹⁾ e utilizada primeiramente por Mahler *et al.*⁽¹⁰⁾ em pacientes portadores dessa doença, vem sendo considerada um dos principais agentes anti-hiperglicemiantes responsáveis pela diminuição da resistência periférica à insulina, precaução da hiperinsulinemia, benefícios no controle lipídico, diminuição do risco de acidentes vasculares, bem como prevenção dessa patologia em indivíduos altamente propícios a essa desordem metabólica^(7,11).

A atividade física, por outro lado, promove benefícios periféricos em organismos normais e diabéticos bem como a ação da metformina em relação ao aumento da: sensibilidade de insulina, na translocação de transportadores para os principais sítios de armazenamento (GLUT 4 e GLUT 2) e reação IRS (*Insulin Receptor Substrate*) resultando num melhor controle da glicemia⁽¹²⁾. No entanto, somente alguns estudos se preocupam em investigar o efeito potencializador do exercício físico juntamente a administração dessas drogas anti-hiperglicemiantes⁽¹³⁻¹⁴⁾.

A principal limitação em pesquisar ações medicamentosas em humanos, é referente aos possíveis efeitos colaterais ocorridos durante o uso primário de uma determinada droga. A utilização de animais de laboratório na fisiologia tem sido ampliada, tendo como

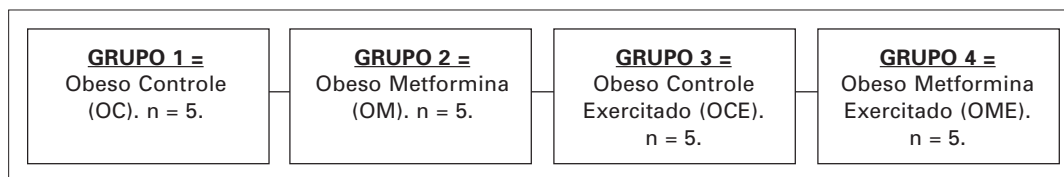


Figura 1 – Desenho experimental da divisão feita com os ratos e suas classificações

finalidade um melhor acompanhamento das alterações sistêmicas, celulares e moleculares decorrentes de intervenções primárias e/ou duvidosas.

Desse modo, o objetivo do presente estudo foi verificar as respostas fisiológicas ao exercício agudo (única sessão de esforço) em ratos Wistar obesos, tratados com metformina.

MÉTODOS

Animais e seu tratamento

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus albinus*) recém nascidos, mantidos no Biotério do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física da UNESP – Rio Claro. Após o desmame, foram distribuídos em gaiolas coletivas, sob condições ambientais controladas de temperatura (25°C) e ciclo claro/escuro (12h/12h) com água e alimentação *ad libitum*. Todos os experimentos seguiram as resoluções brasileiras específicas de bioética de pesquisa com animais: lei nº 6,638, de 8 de março de 1979 e decreto nº 645, de 10 de Julho de 1945.

Delineamento e grupos experimentais

O delineamento dos grupos ocorreu em duas etapas: na primeira, todos os animais (n = 20) recém nascidos receberam Glutamato Monossódico (MSG) via subcutânea (4,0mg/g de peso corporal) a cada 2 dias, nos primeiros 14 dias de vida, para indução da obesidade⁽¹⁵⁾. Segundo Souza *et al.*⁽¹⁶⁾, e Mello *et al.*⁽¹⁷⁾, este modelo de indução da obesidade caracteriza alterações fisiológicas semelhantes ao diabetes mellitus tipo 2.

Na segunda etapa com 130 dias de idade os ratos foram distribuídos em 4 grupos (figura 1).

- Grupo OC: não foram submetidos à administração da Metformina;
- Grupo OM: foram submetidos à administração da Metformina;
- Grupo OCE: não foram submetidos à administração da Metformina mas realizaram exercício;
- Grupo OME: foram submetidos à administração da Metformina e realizaram exercício.

Administração da Metformina

Os animais administrados com Metformina receberam a droga diluída em água (1,4mg/ml) durante 15 dias⁽⁶⁾.

Protocolo de exercício

Os animais foram submetidos a um período de 3 dias de adaptação com início no último dia de tratamento com metformina:

- 1ª sessão: 5 minutos com água na profundidade de 5cm;
- 2ª sessão: 10 minutos com água na profundidade de 15cm;
- 3ª sessão: 15 minutos com água na profundidade de 40cm.

O protocolo de exercício para os grupos OME e OCE constituiu de uma sessão de 30 minutos de natação sem carga adicional. O exercício físico agudo foi realizado um dia após o término da adaptação, em um tanque com 70cm largura e mesma medida em altura. A água foi mantida em 50cm de profundidade a temperatura de 31 ± 1°C.

Coleta e análise sanguínea

As amostras sanguíneas foram coletadas da extremidade da cauda de cada animal antes e imediatamente após a sessão de natação. O soro foi extraído por centrifugação para as seguintes análises:

Glicose sérica: método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase⁽¹⁸⁾, com kit Wiener Lab. Após 15 minutos de incubação em banho à 37°C, as absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 505nm.

Triacilgliceróis (TG) e Colesterol total (CT): método enzimático colorimétrico, com Kit Laborlab. Após 15 e 10 minutos (respectivamente) de incubação em banho à 37°C, as absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas em espectrofotômetro a 505nm.

Hematócrito: método do micro hematócrito⁽¹⁹⁾.

Análise estatística

Os dados foram analisados segundo o programa *Statistica 5.0*[®] através da análise da variância (ANOVA) com medidas repetitivas e a comparação de médias, pela diferença mínima significativa de $p < 0,05$ (LSD). Quando necessário foi utilizado o teste “t” student para amostras independentes ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os valores de glicose e colesterol total foram reduzidos significativamente no grupo controle exercitado (OCE) em comparação ao grupo controle (OC). Já a administração de metformina isoladamente (OM) diminuiu a concentração de glicose em 27%. Por outro lado, a associação de metformina com exercício aumentou estatisticamente a disponibilidade de triacilgliceróis livres após a atividade (tabela 1).

TABELA 1
Glicose (mg/dL), triacilgliceróis (g/100g) e colesterol total (mg/dL) séricos após o período experimental expressos em média ± DP

	Glicose	Triacilgliceróis livre	Colesterol total
OC	83,6 ± 12,8	174,0 ± 5,4	91,3 ± 9,6
OCE	68,4 ± 14,7*	175,8 ± 9,8	70,8 ± 18,3*
OM	70,8 ± 5,9	166,6 ± 11,3	89,1 ± 13,6
OME	73,9 ± 7,9	184,0 ± 4,3#	77,9 ± 13,6

* Diferença significativa em relação ao OC. # Diferença significativa em relação ao OM.

O coeficiente de variação (CV – %) teve valores reduzidos em todas as dosagens realizadas não excedendo 30% de variância (tabela 2).

TABELA 2
Coeficiente de variação em % (DP/Média*100) em todos os grupos experimentais

	Glicose sérica	Triacilgliceróis livre	Colesterol total
OC	15,3	3,1	10,5
OCE	21,5	5,6	25,8
OM	8,3	6,8	15,3
OME	10,7	2,3	17,5

Os valores de hematócrito nesses animais após exercício (OCE e OME) não demonstraram quadro de desidratação (figura 2).

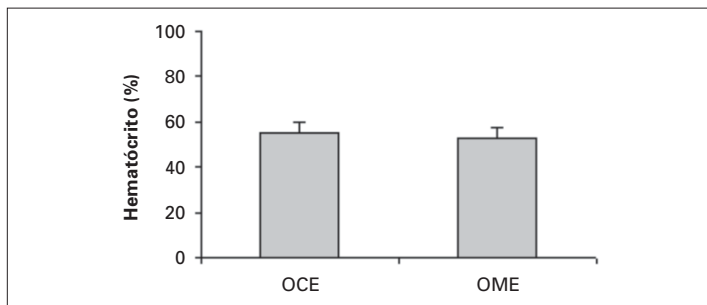


Figura 2 – Valores de Hematócrito (%) \pm DP após exercício agudo nos grupos OCE e OME

O peso médio dos animais tratados com metformina foi inferior ao peso do grupo controle antes e após o exercício (figura 3).

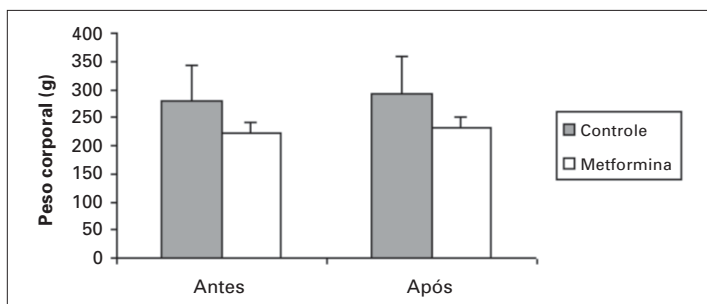


Figura 3 – Peso médio dos animais ao longo do experimento nos grupos controle e grupo metformina

Para os valores de ingestão alimentar determinada pela pesagem semanal da ração, os animais tratados com metformina apresentaram menor ingestão alimentar em relação ao grupo controle (figura 4).

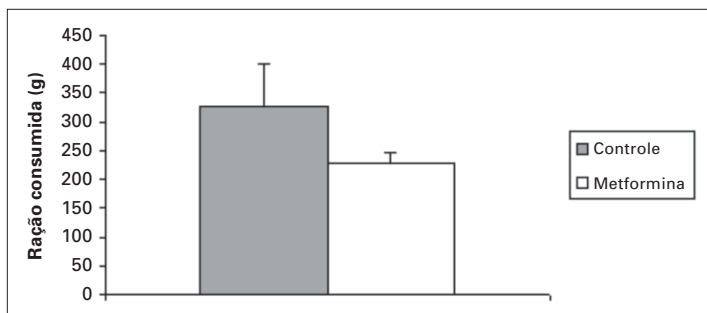


Figura 4 – Ingestão alimentar (g) calculada pela pesagem da ração consumida semanalmente nos grupos metformina e controle

DISCUSSÃO

Análises realizadas em diabéticos e/ou obesos têm demonstrado que a concentração de glicose é o principal indicador do estado desses indivíduos^(7,11). Sendo assim, as concentrações desse secretagogo no presente estudo demonstraram ser menores em todas as intervenções utilizadas (metformina, exercício e metformina com exercício) tendo diferença significativa apenas no grupo obeso exercitado quando comparado ao controle. Esses resultados corroboram com os de Tang e Reed⁽¹²⁾ e Souza *et al.*⁽¹⁶⁾, os quais identificaram significativa queda da concentração de glicose em ratos tratados com metformina e obesos (MSG), respectivamente. No presente estudo, não houve redução da glicemia após o exercício agudo (única sessão) entre obesos tratados com me-

tformina, o que pode estar relacionado com a estabilização da glicose circulante, como conseqüência da ação da droga. Este fato pode representar uma importante adaptação do organismo tratado, no sentido da manutenção da homeostase glicêmica. Tal adaptação poderia evitar uma eventual hipoglicemia, o que reduz a possibilidade de comprometer o organismo.

Avignon *et al.*⁽²⁰⁾, demonstraram que a metformina aumenta a disponibilidade de carboidratos como fonte energética influenciando conseqüentemente sua oxidação em indivíduos diabéticos tipo 2. Contudo, toda forma de tratamento do diabetes tipo 2 deve ser muito bem monitorada devido ao risco de hipoglicemia que esses indivíduos podem apresentar⁽¹²⁾.

A obesidade está diretamente relacionada ao diabetes tipo 2 devido ao aumento exacerbado das concentrações de gorduras tanto nos adipócitos quanto na corrente sanguínea^(6,21). Esse aumento intracelular dos depósitos de triacilgliceróis na musculatura, fígado e pâncreas nesses sujeitos, atenuam o metabolismo glicolítico interferindo em toda atividade insulínica⁽²¹⁾. Desse modo, a dosagem de triacilgliceróis e colesterol total mostrou ser um parâmetro confiável para melhor controle dos grupos obesos. No entanto, o aumento das concentrações de triacilgliceróis desses animais foi significativo no grupo metformina exercitado demonstrando que a característica aeróbia do esforço físico utilizado, associada a ação da metformina atenuou o predomínio energético da glicose. Este fato já havia sido verificado em diferentes condições de exercício físico⁽²²⁾. De acordo com alguns pesquisadores o aumento lipídico sérico após o exercício, parece indicar que cronicamente a disponibilidade aumentada do referido substrato após inúmeras sessões de exercício pode levar o indivíduo a diminuir seus estoques de gordura⁽¹¹⁻¹²⁾.

Vários modelos de obesidade animal têm sido estudados e já foram classificados pela sua etiologia. Entre os modelos neurais, a obesidade hipotalâmica é a mais conhecida⁽²³⁾. Há várias maneiras de indução da obesidade hipotalâmica, incluindo as injeções sistêmicas de MSG^(15,17). O MSG é um aminoácido neuro – excitatório lesivo ao sistema nervoso central quando em quantidades excessivas, pois danifica núcleos pertencentes ao hipotálamo, ou seja, provoca alterações no eixo hipotálamo – hipofisário⁽²⁴⁾. Em função disso, a taxa metabólica basal dos animais tratados com MSG decresce, favorecendo a instalação da obesidade⁽²⁵⁻²⁶⁾. O tratamento com metformina nesse estudo com ratos induzidos a obesidade pareceu não controlar apenas o metabolismo lipídico, mas também regulou a ingestão alimentar desses animais evitando conseqüentemente o excesso de peso. O fato de não ter sido encontrado diferença significativa no ganho de peso e na ingestão alimentar entre os grupos controle pode ser atribuído ao número reduzido de animais estudados.

Em conclusão, os resultados mostraram que as respostas geradas pela sessão única de exercício em ratos obesos foram semelhantes às ações medicamentosas. Isso demonstra que o tipo de exercício utilizado, mesmo em sessão única, pode atenuar a utilização da metformina trazendo benefícios parecidos em relação à homeostasia glicêmica e níveis circulantes de lipídios. Contudo, acreditamos que um programa de atividade física a longo prazo poderia melhorar ainda mais o estado clínico desses animais. No entanto, são necessários mais estudos que elucidam melhor essa relação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte técnico de Clarice Y. Sibuya, Eduardo Custódio e José Roberto R. Da Silva. APOIO FINANCEIRO: FAPESP (proc. 06/58411-2).

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

1. Hill JO, Melanson EL. Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31:515-21.
2. Bouchard C. A epidemia da obesidade: Introdução. In: Bouchard C. *Atividade física e obesidade.* Tradução: Dulce Marino. São Paulo: Manole; 2003. p. 3-22.
3. Guedes DP. Atividade física, aptidão física e saúde. In: Bankoff ADP. *Atividade física e saúde: orientações básicas sobre atividade física e saúde para profissionais das áreas de educação e saúde.* Brasília: MEC/MS; 1995.
4. Allgot B, Can D, King H, et al. *Diabetes atlas, 2nd Brussels: International Diabetes Federation;* 2003.
5. Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care.* 1995;18:258-68.
6. Wulffelé MG, KooyA, De Zeeuw D, Stehouwer CDA, Gansevoort RT. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J Intern Med.* 2004;256:1-14.
7. Bailey CJ. Treating insulin resistance in type 2 diabetes with metformin and thiazolidinediones. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2005;7:675-91.
8. Inzucchi SE. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes. *JAMA.* 2002; 287:360-72.
9. Kalkhoff RK, Hartz AH, Rupley D, Kissebah AH, Kelber S. Relationship of body fat distribution to blood pressure, carbohydrate, tolerance and plasma lipids in healthy obese women. *J Lab Clin Med.* 1993.
10. Mahler RJ. Hiperinsulinemia and non-insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1987;316:110-2.
11. Levri MK, Slaymaker E, Last A, Yeh J, Ference J, D'Amico F, et al. Metformin as treatment for overweight and obese adults: a systematic review. *Annals of Family Medicine.* 2005;3:5.
12. Tang T, Reed MJ. Exercise adds to metformin and acarbose efficacy in db/db mice. *Metabolism.* 2001;50:1049-53.
13. Borst SE, Snellen HG. Metformin, but not exercise training, increases insulin responsiveness in skeletal muscle of Sprague-Dawley rats. *Life Sciences.* 2001; 69:1497-507.
14. Hällsten K, Virtanen KA, Lönnqvist F, Sipilä H, Oksanen A, Viljanen T, et al. Rosiglitazone but not metformin enhances insulin- and exercise-stimulated skeletal muscle glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51:3479-85.
15. Marmo MR, Nunes MT, Volpato CB, Kettelhut IC, Hell NS, Lima FB, et al. Reduced growth hormone mRNA levels in 28d-old MSG rat impair protein and lipid metabolism. *European J Physiol.* 1994;427:29.
16. Souza CT, Nunes WM, Gobatto CA, de Mello MA. Insulin secretion in monosodium glutamate (MSG) obese rats submitted to aerobic exercise training. *Physiol Chem Phys Med.* 2003;35:43-53.
17. Mello MAR, Souza CT, Braga LR, Santos JW, Ribeiro L, Gobatto CA. Glucose tolerance and insulin action in monosodium Glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. *Physiol Chem Phys e Med.* 2001;33:63-71.
18. Henry RJ, Cannon DC, Wilkeman J. *Clinical Chemistry, principles and techniques,* 2nd Ed. New York: Harper and Harper Row Publishes; 1974.
19. Archer RK. Técnicas hematológicas básicas. In: *Técnicas de hematologia animal.* Espanha; 1967. p. 62-82.
20. Avignon A, Lapinski H, Rabasa-Lhoret R, Caubel C, Boniface H, Monnier L. Energy metabolism and substrates oxidative patterns in type 2 diabetic patients treated with sulphonylurea alone or in combination with metformin. *Diabetes Obes Metab.* 2000;2:229-35.
21. Raz I, Eldor R, Cernea S, Shafir E. Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005;21:3-14.
22. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Rosenblatt J, Wolfe RR. Substrate metabolism during different exercise intensities in endurance-trained women. *J Appl Physiol.* 2000;88:1707-14.
23. Scalfani CE. Animal models of obesity: classification and characterization. *Int J Obesity.* 1984;8:491-508.
24. Rohner F. A neuroendocrine reappraisal of the dual-center hypothesis: its implications for obesity and insulin resistance. *Inter J of Obes.* 1995;517-34.
25. Tokuyama K, Himms-Hagen J. Brown adipose tissue thermogenesis, torpor and obesity of glutamate treated mice. *Am J of Physiol.* 1986;407-25.
26. Andrade IS. Efeito da adrenalectomia e ingestão de sacarose sobre o metabolismo e comportamento alimentar, em ratos normais e obesos, pelo tratamento com glutamato monossódico. *Dissertação-Mestrado-UNIFESP.* São Paulo; 1995. p. 78.