

**Como citar este artigo:**

Kuga GK, Gaspar RC, Muñoz VR, Nakandakari SC, Breda L, Sandoval BM, et al. Treinamento físico reverte alterações no diâmetro de mitocôndrias hepáticas de ratos diabéticos induzidos pela Aloxana. *einstein* (São Paulo). 2018;16(3):eAO4353. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082018AO4353>

**Autor correspondente:**

Gabriel Keine Kuga  
Instituto de Biociências  
Avenida 24 A, 1.515 – Jardim Vila Bela  
CEP: 13506-900 – Rio Claro, SP, Brasil  
Tel.: (19) 3526-9600  
E-mail: xgabriel@gmail.com

**Data de submissão:**

30/11/2017

**Data de aceite:**

19/2/2018

**Conflitos de interesse:**

não há.

**Copyright 2018**

Esta obra está licenciada sob  
uma Licença *Creative Commons*  
Atribuição 4.0 Internacional.

## ARTIGO ORIGINAL

# Treinamento físico reverte alterações no diâmetro de mitocôndrias hepáticas de ratos diabéticos induzidos pela Aloxana

Physical training reverses changes in hepatic mitochondrial diameter of Alloxan-induced diabetic rats

Gabriel Keine Kuga<sup>1</sup>, Rafael Calais Gaspar<sup>2</sup>, Vitor Rosetto Muñoz<sup>2</sup>, Susana Castelo Branco Ramos Nakandakari<sup>2</sup>, Leonardo Breda<sup>3</sup>, Bruna Marina Sandoval<sup>4</sup>, Flávio Henrique Caetano<sup>1</sup>, José Alexandre Curiacos de Almeida Leme<sup>1</sup>, José Rodrigo Pauli<sup>2</sup>, Ricardo José Gomes<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Limeira, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Fundação Hermínio Ometto, Araras, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Paulista, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>5</sup> Universidade Federal de São Paulo, Santos, SP, Brasil.

**DOI: 10.1590/S1679-45082018AO4353**

**RESUMO**

**Objetivo:** Investigar os efeitos do treinamento físico nos parâmetros morfológicos e metabólicos de ratos diabéticos. **Métodos:** Ratos Wistar foram randomizados para quatro grupos: controle sedentário, controle treinado, diabético sedentário e diabético treinado. *Diabetes mellitus* foi induzido por administração de Aloxana (35mg/kg) nos Grupos Diabético Sedentário e diabético treinado. O protocolo de treinamento físico incluiu natação com carga de 2,5% do peso corporal, por 60 minutos por dia (5 dias por semana) para os Grupos Controle Treinado e diabético treinado, durante 6 semanas. Ao final do experimento, os ratos foram sacrificados, e o sangue foi coletado para determinação das concentrações séricas de glicose, insulina, albumina e proteínas totais. Amostras do fígado foram coletadas para determinação do glicogênio, proteínas, DNA e diâmetro mitocondrial. **Resultados:** O Grupo Sedentário Diabético apresentou redução no peso corporal, insulinemia e glicogênio hepático, além de maior glicemia e diâmetro mitocondrial hepático. O protocolo de treinamento físico em animais diabéticos foi eficiente para restaurar o peso corporal e o glicogênio hepático, além de reduzir o diâmetro mitocondrial hepático. **Conclusão:** O treinamento físico melhorou o metabolismo hepático e promoveu importantes adaptações morfológicas, como no diâmetro mitocondrial no fígado de animais diabéticos.

**Descritores:** *Diabetes mellitus*; Exercício; Fígado; Ratos Wistar

**ABSTRACT**

**Objective:** To investigate the effects of physical training on metabolic and morphological parameters of diabetic rats. **Methods:** Wistar rats were randomized into four groups: sedentary control, trained control, sedentary diabetic and trained diabetic. *Diabetes mellitus* was induced by Alloxan (35mg/kg) administration for sedentary diabetic and Trained Diabetic Groups. The exercise protocol consisted of swimming with a load of 2.5% of body weight for 60 minutes per day (5 days per week) for the trained control and Trained Diabetic Groups, during 6 weeks. At the end of the experiment, the rats were sacrificed and blood was collected for determinations of serum glucose, insulin, albumin and total protein. Liver samples were extracted for measurements of glycogen, protein, DNA and mitochondrial diameter determination. **Results:** The sedentary diabetic animals presented decreased body weight, blood insulin, and hepatic glycogen, as well as increased glycemia and mitochondrial diameter. The physical training protocol in diabetic animals was efficient to recovery body weight and liver glycogen, and to decrease the hepatic

mitochondrial diameter. **Conclusion:** Physical training ameliorated hepatic metabolism and promoted important morphologic adaptations as mitochondrial diameter in liver of the diabetic rats.

**Keywords:** *Diabetes mellitus*; Exercise; Liver; Wistar, rats

## INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença caracterizada pela secreção ou ação insuficiente da insulina, classificada em dois tipos principais – os tipos 1 e 2. O DM tipo 1 (dependente de insulina) está relacionado à deficiência de insulina devido a mecanismos que reduzem sua concentração sérica. Já o DM tipo 2 (não dependente de insulina) caracteriza-se pela resistência à insulina (quando tal hormônio não age corretamente), mesmo em alta concentração sérica.<sup>(1)</sup>

A insulina é um hormônio anabólico polipeptídico com importante papel no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos. Em casos de deficiência de insulina ou sua ação ineficiente, há um comprometimento na captação de glicose e aminoácidos, levando à hiperglicemia pelo aumento de gliconeogênese, lipólise e degeneração de diversos tecidos – especialmente o renal, o cardiovascular, o ósseo e o hepático.<sup>(1,2)</sup> No fígado, o DM reduz o armazenamento de glicogênio, altera secreção de diversos hormônios como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e induz alterações morfológicas.<sup>(3-5)</sup> Além disso, quando não há controle metabólico adequado, o DM provoca esteatose hepática devido à acumulação de lipídeos no fígado.<sup>(5,6)</sup>

Por outro lado, o exercício físico é um componente essencial do tratamento de DM tipos 1 e 2, por incluir diversos parâmetros metabólicos, como glicogênio muscular durante a atividade física, contribuição lipídica para o metabolismo energético, número e tamanho de mitocôndrias musculares, sensibilidade à insulina e importantes enzimas responsáveis pela mobilização e oxidação de lipídeos.<sup>(7-9)</sup> Ainda, o exercício físico contribui para a captação de glicose e aminoácidos periféricos, ajuda na preservação do armazenamento de glicogênio muscular, e reduz o catabolismo proteico típico do DM tipo 1.<sup>(2,10,11)</sup>

A Aloxana é uma droga muito usada em modelos experimentais na indução de DM tipo 1, por destruir as células beta-pancreáticas, causando alterações na homeostase glicêmica dos animais (por exemplo, hiperglicemia, redução de glicogênio hepático e redução de insulina circulante).<sup>(3,5,12,13)</sup> Além disso, a indução de DM pela Aloxana oferece um cenário experimental para a

investigação dos efeitos do exercício físico como intervenção terapêutica para esta doença.<sup>(3,5,12,13)</sup>

## OBJETIVO

Investigar os efeitos de um protocolo de exercício físico nos aspectos metabólicos e ultraestruturais do tecido hepático de animais diabéticos experimentais.

## MÉTODOS

### Animais experimentais

Foram utilizados ratos machos Wistar com 70 dias de idade. Os animais foram mantidos em ambiente a 25°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, e receberam ração Purina para roedores e água *ad libitum*. *Diabetes mellitus* foi induzido por meio de injeção intravenosa de Aloxana monoidratada (35mg.kg<sup>-1</sup> peso corporal; Sigma®).<sup>(4,12,14)</sup> Após 5 dias, amostras sanguíneas foram obtidas dos ratos alimentados, para determinar a concentração plasmática de glicose. Os ratos que não apresentavam diabetes (glicose <14,7mmolL<sup>-1</sup>) ou que apresentam diabetes grave (glicose >35,5mmolL<sup>-1</sup>) foram excluídos do estudo.<sup>(12)</sup> Este procedimento foi feito de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade de Campinas (processo 4513-1/2017). Para o experimento, os ratos foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos, cada um com dez animais: Controle Sedentário (CS), Controle Treinado (CT), Diabético Sedentário (DS) e Diabético Treinado (DT). O número de animais utilizados para a análise está demonstrado na legenda das figuras.

### Protocolo de exercício físico

O protocolo de exercício físico consistiu em natação durante 60 minutos por dia, 5 vezes por semana, durante 6 semanas consecutivas. Após um período de adaptação ao ambiente aquático de 5 dias, cargas com peso equivalente a 2,5% do peso corporal foram afixadas ao peitoral dos animais. Todas as sessões de natação começaram às 8h e foram realizadas em um tanque (100cm x 70cm x 60cm), com água a 31°C±1°C, e profundidade de 40cm.

### Eutanásia e perfil bioquímico sanguíneo

Ao final do período experimental, todos os ratos ficaram em repouso durante 48 horas após a última sessão de exercícios, sem jejum prévio. Após a eutanásia, amostras sanguíneas foram coletadas em tubos de vidro sem anticoagulantes, para avaliação de diversos parâ-

metros. Todas amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3.000rpm durante 10 minutos e foram feitas as seguintes análises a partir das amostras séricas: glicose sérica pelo método enzimático colorimétrico,<sup>(15)</sup> insulínia (radioimunoensaio, kit Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, Estados Unidos), e proteína total sérica e albumina.<sup>(16)</sup>

A laparotomia foi feita para extrair fragmentos do fígado, para medição de glicogênio, proteína total e DNA. Foram feitos os seguintes protocolos: o conteúdo de glicogênio foi obtido de acordo com o método descrito por Dubois et al.,<sup>(17)</sup> o teor de proteína total, pelo método de Lowry et al.,<sup>(18)</sup> e o DNA, conforme Giles et al.,<sup>(19)</sup> Também foi avaliada a proporção proteína/DNA, para medir o metabolismo proteico no fígado.

### Rotina para microscopia eletrônica

Fragmentos do lobo esquerdo do fígado (de três animais por grupo) foram fixados em Karnovsky modificado por 3 horas e, então, colocados em 5mL de glutaraldeído 50% e 95mL de tampão fosfato 0,1M. O tratamento das amostras para este procedimento foi previamente descrito<sup>(4)</sup> e adaptado do método de Reynolds.<sup>(20)</sup> As amostras foram analisadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão Philips CM10. O diâmetro mitocondrial foi medido utilizando-se o programa AUTOCAD®.

### Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média±desvio padrão e analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA), com o teste *post hoc* de Bonferroni. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

## RESULTADOS

A tabela 1 mostra a evolução do peso corporal em todos os grupos. Após a quarta semana do período experimental, o Grupo DS apresentou peso corporal menor

do que o Grupo CS. Ao final do treinamento físico, o Grupo CT apresentou peso corporal mais alto do que o Grupo DS. Estes dados indicam que o DM induziu a perda de peso corporal.

Avaliamos se DM e treinamento físico modulavam os parâmetros séricos dos animais. Os animais diabéticos apresentaram níveis mais altos de glicose e níveis mais baixos de insulina, confirmando o estado patológico. Não foram encontradas diferenças entre os Grupos Controle nem entre os Grupos Treinados para estes parâmetros (glicose e insulina). Todos os grupos apresentaram níveis similares em relação aos níveis séricos de proteína total e albumina (Tabela 2).

Também foram analisados os parâmetros hepáticos (Tabela 3). O Grupo DS demonstrou teor mais baixo de glicogênio do que os outros grupos, confirmado o estado catabólico dos animais diabéticos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos para proteína total e DNA. No entanto, o Grupo CT apresentou a razão proteína/DNA mais alta do que o CS.

A figura 1 destaca a ultraestrutura do tecido hepático do Grupo CS, expondo o fígado destes animais com características estruturais normais, como as cristas mitocondriais, o retículo endoplasmático rugoso e liso, os peroxissomos, a baixa quantidade de lipídeos e o envoltório nuclear aparentemente normal. O Grupo CT apresentou características estruturais semelhantes às do Grupo CS, mas foi encontrado um número aparentemente mais alto de peroxissomos em volta da mitocôndria (Figura 2).

**Tabela 2.** Parâmetros séricos de ratos em todos os grupos após período experimental de 6 semanas

Parâmetros séricos	CS	CT	DS	DT
Glicose, mg/dL	117±13	121±15	439±99*†	413±91*†
Insulina, mUI/mL	15,2±2,9	16,3±3,4	11,8±2,1*†	11,5±2,9*†
Proteína total, g/100mL	6,58±0,53	6,36±0,36	6,48±0,72	6,34±0,39
Albumina, g/100mL	4,63±0,93	4,39±0,8	4,21±0,8	4,32±1

Resultados expressos como média±desvio padrão. \* p<0,05 versus Grupo CS; † p<0,05 versus Grupo CT. CS: Controle Sedentário; CT: Controle Treinado; DS: Diabético Sedentário; DT: Diabético Treinado.

**Tabela 1.** Evolução do peso corporal de ratos em todos os grupos durante o período experimental (6 semanas)

Parâmetro	Grupos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
Peso corporal (g)	CS	298±30	322±41	324±53	351±29	364±69	379±55
	CT	290±32	305±55	316±55	316±33	337±55	352±43
	DS	256±38	264±47	274±47	280±61*	275±65*	277±49*†
	DT	250±39	290±32	301±56	309±54	316±58	327±54

Resultados expressos como média±desvio padrão. \* p<0,05 versus Grupo CS; † p<0,05 versus Grupo CT. CS: Controle Sedentário; CT: Controle Treinado; DS: Diabético Sedentário; DT: Diabético Treinado.



Foram encontradas alterações estruturais no Grupo DS, como a ocorrência de ondulações na membrana interna do envoltório nuclear. Além disso, os hepatócitos apresentaram mais retículos endoplasmáticos, maior quantidade de gotículas lipídicas e cristas mitocondriais ocultas.

**Tabela 3.** Parâmetros hepáticos de ratos em todos os grupos após período experimental de 6 semanas

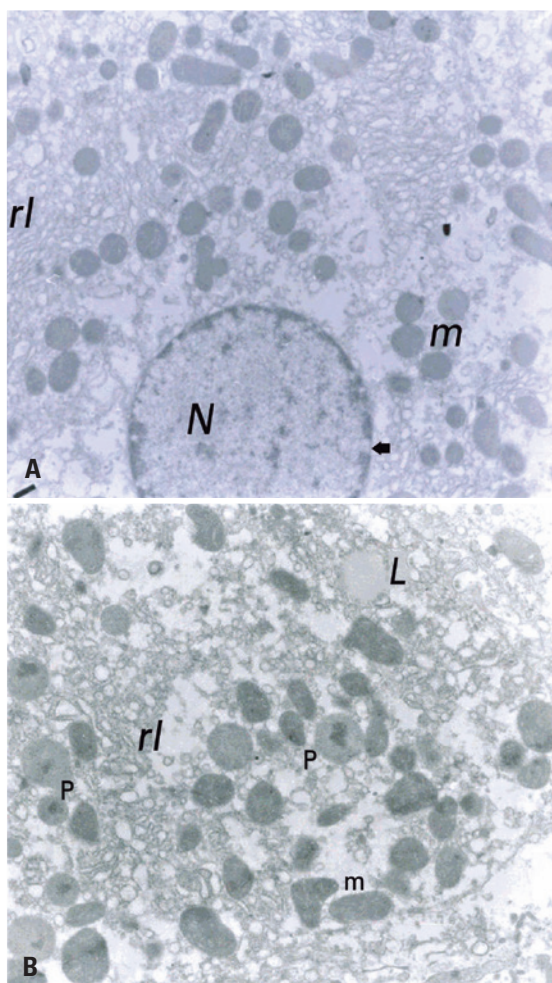
Parâmetros hepáticos	CS	CT	DS	DT
Glicogênio, mg%	5,2±1,2	6,2±1	2±0,5*†	5±1,8
Proteína total, mg%	2,2±0,38	2,8±0,62	3±0,77	3±1,1
DNA, mg%	0,18±0,01	0,14±0,04	0,18±0,04	0,18±0,03
Proteína/DNA	12±2,8	20±6,4*	17±3,5	17±5,9

Resultados expressos como média±desvio padrão. \*  $p < 0,05$  versus Grupo CS; †  $p < 0,05$  versus Grupo CT; ‡  $p < 0,05$  versus Grupo DT.

CS: Controle Sedentário; CT: Controle Treinado; DS: Diabético Sedentário; DT: Diabético Treinado.

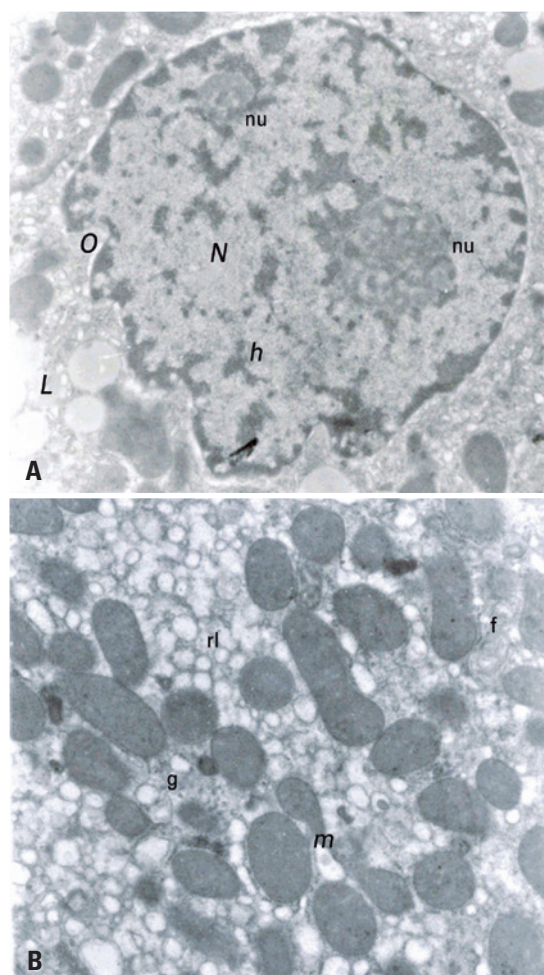
Assim como o Grupo DS, o Grupo DT apresentou as mesmas alterações estruturais, confirmando os efeitos do DM. Porém, foi observada quantidade aparentemente maior de glicogênio ao redor das mitocôndrias no Grupo DT, o que sugeriu efeito do exercício físico nesta característica.

Finalmente, a figura 3 mostra o diâmetro mitocondrial dos grupos estudados. A análise estatística revelou aumento significativo ( $p > 0,05$ ) do diâmetro mitocondrial nos Grupos Diabéticos (DS e DT) em comparação aos controle (CS e CT). O Grupo DT apresentou redução do diâmetro mitocondrial comparado ao DS, sugerindo efeitos do exercício físico. As figuras 4A e 4B ilustram as alterações mitocondriais entre os Grupos Sedentários (CS e DS) pela técnica ultraestrutural.



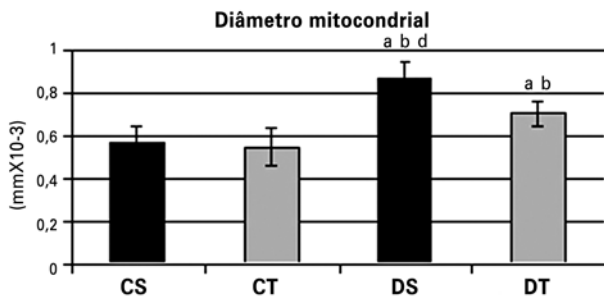
**Figura 1.** Ultraestrutura do tecido hepático do Grupo Controle Sedentário. (A) Micrografia representativa do tecido hepático de rato do Grupo Controle Sedentário. Esta micrografia mostra a abundância de mitocôndrias (m) ao redor do núcleo (N) e entre o retículo endoplasmático liso (rl). Observe certa abundância de poros nucleares (seta) (10.250x). (B) Micrografia representativa do tecido hepático de rato do Grupo Controle Treinado. Esta micrografia mostra a abundância de peroxissomos (P) entre as mitocôndrias (m) e o retículo endoplasmático liso (rl). Também é visível a presença de material com aspectos lipídicos (L), porém sem a delimitação característica de gotículas típicas (14.500x).

**Figura 1.** Ultraestrutura do tecido hepático do Grupo Controle Sedentário



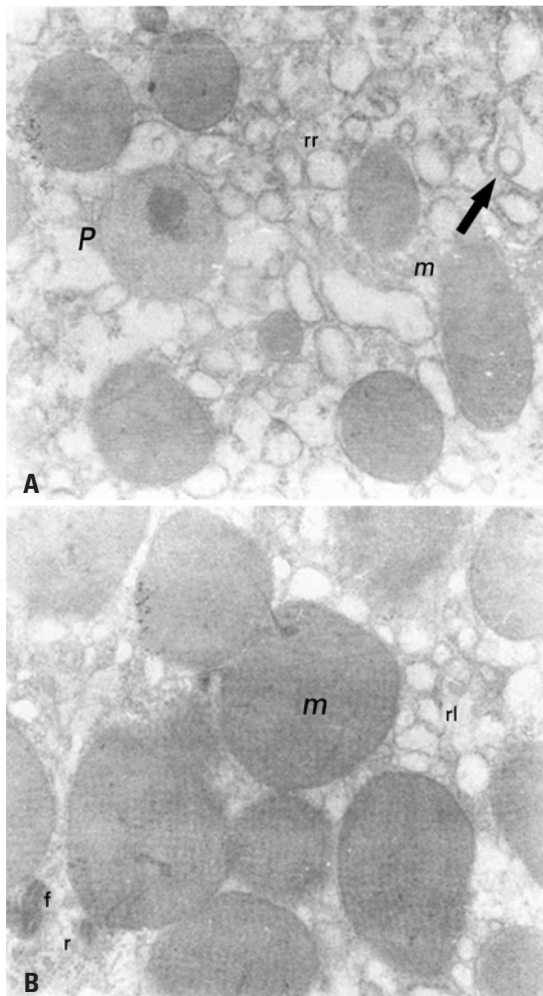
**Figura 2.** Características estruturais do Grupo Controle Treinado. (A) Micrografia representativa do tecido hepático de rato do Grupo Diabético Sedentário. Destaca-se a aparência alterada do núcleo (N) e grandes gotículas lipídicas (L). Além disso, notamos a presença de irregularidades na membrana interna (o) do envoltório nuclear, bem como a presença de retículo endoplasmático liso ao redor do núcleo, e retículo endoplasmático rugoso em menor quantidade (14.500x). (B) Micrografia representativa do tecido hepático de rato do Grupo Diabético Treinado. Retículo endoplasmático liso vacuolado (rl) localizado entre as mitocôndrias (m). É notável também a presença de glicogênio (g) e figuras mielinicas (f) (21.000x).

**Figura 2.** Características estruturais do Grupo Controle Treinado



Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup>  $p < 0,05$  versus Grupo CS; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  versus Grupo CT; <sup>d</sup>  $p < 0,05$  versus Grupo DT.

**Figura 3.** Diâmetro mitocondrial ( $\text{mm} \times 10^{-3}$ ) de ratos dos Grupos Controle Sedentário (CS), Controle Treinado (CT), Diabético Sedentário (DS) e Diabético Treinado (DT) após o período experimental (6 semanas;  $n = 10$  ratos por grupo)



(A) Micrográfico representativo do tecido hepático de rato do Grupo Controle Sedentário. Observa-se grande quantidade de retículos endoplasmáticos rugosos (rr), além de peroxissomos (P) e mitocôndrias (m) (41.000x). (B) Micrográfico representativo do tecido hepático de rato do Grupo Diabético Sedentário. Nota-se a presença de grandes vesículas de retículo liso (rl), alguns ribossomos (r), figuras mielínicas e mitocôndrias com largos diâmetros (41.000x).

**Figura 4.** Mitocôndrias dos Grupos Sedentários

## DISCUSSÃO

O exercício físico é um componente essencial do tratamento de DM e seus respectivos *deficits* metabólicos.

No presente estudo, os resultados obtidos para o Grupo DS estão de acordo com o que clinicamente esperado no contexto do DM, que inclui ganho de peso reduzido, hipoinsulinemia e hiperglicemia.<sup>(1)</sup> Essa condição é consequência da disfunção das células beta das Ilhotas de Langerhans devido à administração de Aloxana.

O protocolo de exercício físico aplicado não reduziu a glicose sérica dos animais diabéticos. Há estudos prévios que demonstram melhor reação das células musculares e adiposas à insulina após o exercício físico, devido ao aumento do teor de transportadores de glicose (GLUT-4) e sua translocação para a membrana.<sup>(9)</sup> Após o exercício físico, observamos melhoras nos passos iniciais da via de sinalização da insulina, começando com o aumento na associação entre o substrato do receptor de insulina (SRI-1) e a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K),<sup>(7,21)</sup> o que leva a uma melhor sensibilidade à insulina. Ademais, a contração muscular mobiliza o GLUT-4 em uma via independente da ação da insulina, contribuindo para maior captação de glicose.<sup>(22)</sup> Porém, em nosso estudo, o treinamento físico não apresentou efeito na glicose sérica dos animais diabéticos, talvez devido à duração do treinamento.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para proteína total sérica e albumina, sugerindo que os animais diabéticos não apresentam níveis de desidratação que poderiam interferir em outros resultados. Sabe-se que uma consequência do DM é aumento da pressão osmótica de fluidos extracelulares, o que leva à transferência de fluidos, que, por sua vez, pode causar desidratação.<sup>(2)</sup> A hiperglicemia também leva à perda de glicose via urina e diurese osmótica, resultando na depleção de fluidos orgânicos. A proteinúria diabética está relacionada ao aumento de filtração glomerular de proteínas e diminui a reabsorção tubular, considerando-se que estes fatores são influenciados pelo grau de controle metabólico do diabético.<sup>(23,24)</sup> Apesar da hiperglicemia, nossos resultados indicam que não houve um nível de desidratação que pudesse interferir em resultados bioquímicos e morfológicos.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para medidas de proteína total e DNA. Porém, houve aumento significativo na razão proteína/DNA do tecido hepático no Grupo CT, sugerindo que o protocolo de treinamento físico favoreceu a redução do catabolismo de proteínas hepáticas.<sup>(4)</sup> No entanto, o Grupo DS apresentou redução no armazenamento de glicogênio hepático em comparação aos Grupos Controles. Isso é corroborado por resultados prévios encontrados na literatura.<sup>(10,12)</sup> Confirmando o efeito terapêutico do exercício físico no diabetes, encontramos armazenamento restaurado de glicogênio hepático no Grupo DT em comparação



ao Grupo DS. Estudo conduzido por Leme et al.,<sup>(3)</sup> também demonstrou aumento no glicogênio hepático em animais diabéticos submetidos a protocolo de exercício físico em comparação aos sedentários. Em nosso trabalho, o protocolo de treinamento físico foi eficiente na restauração do armazenamento de glicogênio hepático nos animais diabéticos e no aumento da razão proteína/DNA no fígado.

As análises ultraestruturais do fígado revelaram as alterações estruturais promovidas pelo DM, com destaque para aumento no diâmetro mitocondrial. Nossos resultados corroboram os achados de Kozyritskii et al.,<sup>(25)</sup> que relataram aumento no número de mitocôndrias, redução de retículo endoplasmático rugoso e proliferação do retículo endoplasmático liso. Além disso, há o aparecimento de corpos similares aos lisossomos e vacúolos autofágicos no citoplasma dos hepatócitos dos ratos diabéticos. O retículo endoplasmático liso é responsável por diversas funções, dependendo do tipo de célula ao qual pertence. Nos hepatócitos, esta organela age nos lipídeos e no metabolismo do colesterol, contribuindo para o processo de desintoxicação. Sabe-se também que ribossomos livres e aderidos nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso estão relacionados à síntese de proteínas celulares.<sup>(26)</sup> Petersen<sup>(27)</sup> também encontrou anormalidades mitocondriais em animais diabéticos, sugerindo que esta hiperfunção mitocondrial pode ocorrer em uma tentativa de prevenir esteatose hepática. Da mesma forma, Lucchesi et al.,<sup>(28)</sup> relataram a diminuição no número de organelas intracitoplasmáticas e a degeneração de mitocôndrias, após as análises ultraestruturais dos hepatócitos de animais diabéticos. As mitocôndrias hepáticas têm papel importante na patogênese da esteatose hepática – uma comorbidade comum em pacientes diabéticos.<sup>(29,30)</sup>

Indivíduos diabéticos frequentemente apresentam esteatose ou glicogenose. A esteatose pode progredir para fibrose e cirrose, ao contrário da glicogenose, que não evolui para estas patologias, mas que pode sinalizar a necessidade de um melhor controle glicêmico.<sup>(31)</sup> O acúmulo de lipídeos em células hepáticas pode levar à esteatose, com subsequente evolução para cirrose.<sup>(5)</sup> Em nosso estudo, não observamos a ocorrência de glicogenose em hepatócitos, porém encontramos grande acúmulo de lipídeos no fígado dos animais diabéticos, o que pode preceder o início da esteatose. Também observamos a ocorrência de mudanças na massa de cromatina e no envólucro nuclear de animais diabéticos. Doi et al.,<sup>(32)</sup> também encontraram ondulações nucleares, alterações na massa de cromatina e núcleo com contorno irregular em animais diabéticos. Em humanos, Schmid et al.,<sup>(33)</sup> demonstraram que indivíduos diabéticos possuem redução na síntese de adenosina

trifosfato (ATP) hepática, o que está relacionado à resistência à insulina, com possível deficiência nas concentrações de mitocôndrias hepáticas.<sup>(4)</sup>

Com relação ao Grupo DT, a análise estatística demonstrou que o diâmetro mitocondrial neste grupo foi menor do que no Grupo DS, sugerindo que o protocolo de exercício físico utilizado pode ter contribuído para a diminuição na hiperfunção mitocondrial. Poucos estudos investigaram as mudanças estruturais no tecido hepático de sujeitos diabéticos e a influência da atividade física nessas alterações. No entanto, sabe-se que uma dieta com alto teor de gordura e a falta de exercício físico estão associadas a alterações hepáticas ultraestruturais e à prevalência de esteatose hepática.<sup>(34)</sup> Além disso, Lima et al.,<sup>(35)</sup> verificaram que o exercício físico crônico promoveu melhoras no aparato antioxidante e redução no estresse oxidativo nas mitocôndrias hepáticas, exercendo efeito protetor.

Em humanos, a patogênese do DM está relacionada à deficiência de células beta-pancreáticas.<sup>(36,37)</sup> No presente estudo, embora o desencadeador patogênico seja diferente (indução por administração de Aloxana), é importante notar que o treinamento físico atenuou as alterações metabólicas e morfológicas causadas pelo diabetes. Nosso modelo experimental de DM foi semelhante ao DM tipo 1, que ocorre em humanos – trata-se de uma doença caracterizada pela destruição autoimune de células beta-pancreáticas secretoras de insulina.<sup>(37)</sup> Embora os benefícios do exercício físico para DM tipo 1 em estudos com animais estejam bem descritos na literatura,<sup>(38)</sup> recente estudo clínico relatou os efeitos protetores do exercício físico na função de linhagens de células beta humanas recém-diagnosticadas com DM tipo 1.<sup>(37)</sup> Estes achados reforçam a importância do treinamento físico como intervenção não farmacológica contra o DM. Há relatos de DM tipo 1 em humanos que apresentam alterações no metabolismo hepático;<sup>(39)</sup> porém, são necessárias mais pesquisas com estes pacientes, para investigar as alterações mitocondriais e o possível efeito protetor do exercício físico.

Os resultados obtidos em nosso trabalho destacam alguns aspectos relevantes. Um deles é o dano causado pelo DM aos hepatócitos, o que é evidenciado pela análise ultraestrutural do fígado, que apresentou diversas alterações, como a redução do retículo endoplasmático rugoso. Isso pode indicar baixa síntese de proteína hepática, diâmetro mitocondrial aumentado, hiperfunção mitocondrial e aumento do acúmulo de gotículas lipídicas – fatos esses que comumente associados à esteatose hepática. Outro importante achado do nosso estudo foi a influência da atividade física no fígado. Este aspecto foi evidenciado pelos seguintes fatores: o

aumento da razão proteína/DNA do órgão no Grupo CT, e a restauração do glicogênio hepático e a redução do diâmetro mitocondrial no Grupo DT. Enfim, este estudo oferece evidências sobre o papel do exercício físico como estratégia terapêutica contra os danos causados ao fígado pelo DM.

## CONCLUSÃO

O *diabetes mellitus* experimental reduziu o teor do glicogênio e aumentou o diâmetro mitocondrial no fígado. O protocolo de treinamento físico aumentou a razão proteína/DNA no tecido hepático dos Grupos Controles, e recuperou o teor do glicogênio hepático e o diâmetro mitocondrial nos Grupos Diabéticos. Portanto, o treinamento físico com a natação promoveu importantes adaptações metabólicas e morfológicas em animais diabéticos.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

R.J.G. e J.A.C.A.L. foram responsáveis pelo desenho experimental, coleta de dados, análises de dados e extração de tecido. G.K.K., R.C.G., V.R.M., S.C.B.R.N., L.B. e B.M.S. foram responsáveis pela edição de imagens e elaboração do manuscrito. F.H.C., J.A.C.A.L. e J.R.P. foram responsáveis pela revisão do manuscrito. R.J.G. foi responsável pela análise de dados, *design* do manuscrito e revisão final. Todos os autores aprovaram a submissão do estudo e estão de acordo com as diretrizes do periódico.

## INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Kuga GK: <https://orcid.org/0000-0002-2404-0686>  
 Gaspar RC: <https://orcid.org/0000-0002-2208-3527>  
 Muñoz VR: <https://orcid.org/0000-0003-4280-6558>  
 Nakandakari SC: <https://orcid.org/0000-0002-4451-2935>  
 Breda L: <https://orcid.org/0000-0002-0855-8864>  
 Sandoval BM: <https://orcid.org/0000-0002-3081-0720>  
 Caetano FH: <https://orcid.org/0000-0001-7715-1307>  
 Leme JA: <https://orcid.org/0000-0001-8610-6778>  
 Pauli JR: <https://orcid.org/0000-0002-6129-1521>  
 Gomes RJ: <https://orcid.org/0000-0002-1396-3741>

## REFERÊNCIAS

- American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(Suppl 1):S8-16.
- Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 12a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.
- Leme JA, Silveira RF, Gomes RJ, Moura RF, Sibuya CA, Mello MA, et al. Long-term physical training increases liver IGF-I in diabetic rats. *Growth Horm IGF Res*. 2009;19(3):262-6.
- Remedio RN, Castellar A, Barbosa RA, Gomes RJ, Caetano FH. Morphology and protein content of hepatocytes in type I diabetic rats submitted to physical exercises. *Micron*. 2011;42(5):484-91.
- Leme JA, Gomes RJ, de Mello MA, Luciano E. Effects of short-term physical training on the liver IGF-I in diabetic rats. *Growth Factors*. 2007;25(1):9-14.
- Tai FW, Syn WK, Alazawi W. Practical approach to non-alcoholic fatty liver disease in patients with diabetes. *Diabet Med*. 2015;32(9):1121-33. Review.
- Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carneira JB, Peres SB, Reis MA, et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol*. 2002;147(1):149-57.
- Holloszy JO. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J Appl Physiol*. 2005;99(1):338-43. Review.
- Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Adv Physiol Educ*. 2014;38(4):308-14. Review.
- Luciano E, de Mello MA. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. *Rev Paul Educ Fis*. 1998;12(2):202-9.
- Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Hu FB. Physical activity in relation to cardiovascular disease and total mortality among men with type 2 diabetes. *Circulation*. 2003;107(19):2435-9.
- Gomes RJ, Leme JA, de Moura LP, de Araújo MB, Rogatto GP, de Moura RF, et al. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. *Cell Biochem Funct*. 2009;27(4):199-204.
- Diegues JC, Pauli JR, Luciano E, de Almeida Leme JA, de Moura LP, Dalia RA, et al. Spatial memory in sedentary and trained diabetic rats: molecular mechanisms. *Hippocampus*. 2014;24(6):703-11.
- Gomes RJ, de Oliveira CA, Ribeiro C, Mota CS, Moura LP, Tognoli LM, et al. Effects of exercise training on hippocampus concentrations of insulin and IGF-1 in diabetic rats. *Hippocampus*. 2009;19(10):981-7.
- Henry RJ, Cannon DC, Wilkeman J. *Clinical chemistry, principles and techniques*. 2a ed. New York: Harper and Harper Row Publishers; 1974.
- Nogueira DM, Strufaldi B, Hirata MH, Abdalla DS, Hirata RD. *Métodos de Bioquímica Clínica: técnicas e interpretação*. São Paulo: Pancast; 2007.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. *Anal Chem*. 1956;28(3):350-6.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
- Giles KW, Myers A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature*. 1965;206(4979):93. doi:10.1038/206093a0
- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1963;17(1):208-12.
- Da Silva AS, Pauli JR, Ropelle ER, Oliveira AG, Cintra DE, De Souza CT, et al. Exercise Intensity, Inflammatory Signaling, and Insulin Resistance in Obese Rats. *Med Sci Sport Exerc*. 2010;42(12):2180-8.
- Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev*. 2013;93(3):993-1017. Review.
- Skupien J, Warram JH, Smiles A, Galecki A, Stanton RC, Krolewski AS. Improved glycemic control and risk of ESRD in patients with type 1 diabetes and proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2916-25.
- Abrass CK. Diabetic proteinuria: Glomerular or tubular in origin? *Am J Nephrol*. 1984;4(6):337-46. Review.
- Kozyritskii VG, Minchenko AG. [Ultrastructural changes in rat hepatocytes with diabetes and insulin administration]. *Tsitol Genet*. 1978;12(5):397-401. Russian.
- Bailey FR. *Histologia*. 2a ed. São Paulo: Edgard Blücher; 1973.
- Petersen P. Abnormal mitochondria in hepatocytes in human fatty liver. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1977;85(3):413-20.

28. Lucchesi AN, Cassettari LL, Spadella CT. Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in Rat Liver that Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans. *J Diabetes Res*. 2015;2015:1-11. doi: 10.1155/2015/494578
29. Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(9):2136-42. Review.
30. Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22 Suppl 1:S20-7. Review. Erratum in: *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(3):501-2.
31. Imtiaz KE, Healy C, Sharif S, Drake I, Awan F, Riley J, et al. Glycogenic hepatopathy in type 1 diabetes: an underrecognized condition. *Diabetes Care*. 2013;36(1):e6-7.
32. Doi K, Yamanouchi J, Kume E, Yasoshima A. Morphologic changes in hepatocyte nuclei of streptozotocin (SZ)-induced diabetic mice. *Exp Toxicol Pathol*. 1997;49(3-4):295-9.
33. Schmid AI, Szendroedi J, Chmelik M, Krssák M, Moser E, Roden M. Liver ATP synthesis is lower and relates to insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(2):448-53.
34. Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282(2):G193-9. Review.
35. Lima FD, Stamm DN, Della-Pace ID, Dobrachinski F, de Carvalho NR, Royes LF, et al. Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. *PLoS One*. 2013;8(2):e55668.
36. Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802-12. Review.
37. Narendran P, Jackson N, Daley A, Thompson D, Stokes K, Greenfield S, et al. Exercise to preserve  $\beta$ -cell function in recent-onset Type 1 diabetes mellitus (EXTOD) - a randomized controlled pilot trial. *Diabet Med*. 2017;34(11):1521-31.
38. Pereira de Moura L, Gomes RJ, Leme JA, Voltarelli FA, Ribeiro C, Ferreira de Moura R, et al. [Pancreatic insulin of type I diabetic rats subjected to an individualized exercise-training protocol]. *Motricidade*. 2012;8(1):23-32. Portuguese.
39. Petersen KF, Price TB, Bergeron R. Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during exercise: impact of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(9):4656-64.