



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

WELLINGTON CONTIERO

**EFEITO DO DIABETES CRÔNICO INDUZIDO POR  
ESTREPTOZOTOCINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATROFIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

WELLINGTON CONTIERO

**EFEITO DO DIABETES CRÔNICO INDUZIDO POR  
ESTREPTOZOTOCINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATROFIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C762e Contiero, Wellington.

Efeito do diabetes crônico induzido por estreptozotocina sobre o estresse oxidativo e atrofia do músculo esquelético / Wellington Contiero. – Londrina, 2014.

55 f. : il.

Orientador: Flávia Alessandra Guarnier.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes – Teses. 2. Atrofia muscular – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Guarnier, Flávia Alessandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

WELLINGTON CONTIERO

**EFEITO DO DIABETES CRÔNICO INDUZIDO POR  
ESTREPTOZOTOCINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E  
ATROFIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Jair Tonon  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Rafael Demenice  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de Julho de 2014

*"Reze e trabalhe, fazendo de conta que esta vida é um dia de capina com sol quente, que às vezes custa muito a passar, mas que sempre passa. E você ainda pode ter um muito pedaço bom de alegria (...) Cada um tem a sua hora e a sua vez: você há de ter a sua." (Guimarães Rosa)*

## **DEDICATÓRIA**

A **Lucas Petreli**, por me mostrar uma visão da vida que eu não tinha, por fazer eu acreditar em mim mesmo, mostrar que viver vale a pena com todas as dificuldades que eu tive, ser fonte inspiradora na busca de respostas da ciência, pois Deus vai ilumina-la para devolver o que lhe foi tirado, e que este, seja um minúsculo caminho que fará parte desse imenso projeto.

**Antonio e Tereza**, meus pais, pelo dom da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela oportunidade de existir e ser quem sou, com todas as minhas qualidades e defeitos, que são maiores e ainda corrigidos a cada dia de existência.

Aos meus pais, que me guiam a cada dia, que me deram a condição de educação, em ambos sentidos, que ficam felizes pelas minhas vitórias e me consolam em minhas derrotas, mas nunca deixam eu desistir de ser quem sou e de meus ideais enquanto pessoa. Amo-os imensuravelmente.

Aos meus Irmãos Cibele e Felipe, meus cunhados, Pedro e Daniele, e meu sobrinho Eduardo (Nanico), pelo apoio, seja ele pela escuta ou opinião, pela força durante todo esse trajeto, o qual não foi fácil, sendo imprescindível tê-los ao meu lado.

A minha família londrinense, me dando ânimo para percorrer semanalmente 440Km, e por maior que fosse a dificuldade me sustentaram, animaram, riram e choraram comigo, à vocês Eduardo Vignoto, Ricardo Vignoto, Marcio Scarone e Guilherme S. Valverde, não há palavras que expressem o meu sentimento, mas se for para resumir em uma única seria, amo-os como irmãos, por isso família Londrinense.

Ao cara que me viveu ao meu lado esses três longos anos, e que me inseriu nessa fantástica família londrinense, que me ensinou por horas sentados na biblioteca central da UEL, que estava ao meu lado durante todo tempo, Fernando Pinheiro (Homer), sem você, este sonho não teria chegado ao fim. Pessoa fantástica, um grande irmão para mim, o meu muito obrigado.

Aos não menos importante, mas pessoas fundamentais para o término do mestrado e em minha pessoa, que no pior momento de sua vida me fez ver o quanto ela pode ser fascinante, que não devemos desistir por maior que seja a dificuldade imposta, e hoje, tornou-se fonte inspiradora de respeito, admiração, escola de vida, base sustentadora, sendo peça fundamental na conclusão desta etapa, Lucas e Priscila Petreli, como vocês já me disseram e uso suas palavras, em todo tempo amo o amigo, e na dor que nasce um irmão (Proverbio 17), amo-os infinitamente, bem como ao Seu João, Sueli e Daniel.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flávia Alessandra Guarnier, que confiou em mim, me orientando, me ensinando com seu vasto conhecimento a cada dia durante esse período de estudos. Hoje, seu eu concluo este curso, é devido sua influência em minha vida acadêmica desde a graduação, sendo exemplo de professora, a você sou eternamente grato.

Aos amigos de laboratório Poliana Camila Marinello, Fernando Henrique Borges e Fernanda Paschoal pelas inúmeras dúvidas sanadas no decorrer do dia a dia de laboratório, pelos dias em bancada, pelas risadas que não foram poucas, dias inesquecíveis e pessoas inesquecíveis.

A Nichelle Vieira, pela imensa paciência nesse finzinho de trabalho, em toda a histologia, Imunohistoquímica e por ser uma ótima companheira, amiga. A Thamara Nishida, Sara Real Prado, Larissa Ferrari, Laís Sábio e Fernanda Campos, obrigado pelo conhecimento compartilhado, risadas e oportunidades de conviver com vocês, acrescentando a cada dia mais o meu aprendizado.

Ao corpo docente do Mestrado em Patologia Experimental, por ter contribuído para a minha formação científica em especial Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alessandra Lourenço Cecchini Armani, Prof. Dr. Rodrigo Luiz Cabral, Prof. Dr. Jair Tonon, Prof. Dr. Rubens Cecchini.

Aos técnicos de laboratório de patologia, Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Dionízio Filho, pela assistência técnica prestada e colaboração.

Aos amigos de trabalho na Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, em especial ao Prof<sup>o</sup> Me. Julio Alberto Agante Fernandes, Prof<sup>o</sup>. Dr. Fabio Antonio Néia Martini e Prof<sup>o</sup> Me. Fabricio Jose Jassi, pela oportunidade, companheirismo e força, por acreditar em meu potencial, e ajudar a crescer uma nova universidade.

As minhas amigas, Andreia Ortega e Ana Carolina Xavier Ordonha, que me acompanha diariamente, em nossos plantões na UTI, me dando apoio, carinho e ajuda a 5 anos, duas grandes amigas, e ao Dr<sup>o</sup> Wilson Aparecido Ferreira dos Reis, que além de ser meu chefe, é um amigo e aumenta o meu conhecimento a cada plantão com ele.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente. Funcionários da UEL, da biblioteca, RU, serviço geral, sem vocês nossa vida seria muito mais difícil, sou grato a todos que se empenham em uma UEL melhor.

CONTIERO, Wellington. **Efeito do diabetes crônico induzido por estreptozotocina sobre o estresse oxidativo e atrofia do músculo esquelético.** 2014. 55f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

No músculo esquelético, o diabetes do tipo I é capaz de iniciar um processo atrófico precocemente. A hiperglicemia sistêmica promove aumento de radicais livres por ativar vias do metabolismo glicolítico geradoras de radicais livres. Este fato parece contribuir com o quadro de atrofia. Os modelos experimentais de diabetes não avaliam modelos de longa exposição à hiperglicemia, o que pode não refletir o quadro real da doença no que diz respeito ao músculo esquelético, já que o paciente permanece hiperglicêmico por décadas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o estado oxidativo do músculo esquelético e a atrofia muscular em um modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, 120 dias após indução. Assim, ratos Wistar machos de 90 dias de idade foram divididos entre normoglicêmicos (N) e diabéticos (D). Os animais destinados ao grupo D sofreram indução do diabetes com estreptozotocina (35 mg/kg). Os animais destinados ao grupo N não sofreram nenhum procedimento. Após 120 dias, a glicemia de jejum foi avaliada, os animais foram sacrificados e os músculos gastrocnêmio esquerdo e direito colhidos. Para caracterização do estresse oxidativo, foram realizados ensaios para quantificação de peroxidação lipídica (quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de t-butil, e teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), capacidade antioxidante (capacidade antioxidante total e glutatona total e oxidada), e alteração oxidativa de proteínas (carbonilação e quantificação de cloraminas). Para caracterização da atrofia, a análise morfométrica foi realizada. As análises de lipoperoxidação, capacidade antioxidante total, e proteínas carboniladas não revelaram diferenças significantes entre os grupos. Tanto a glutatona total quanto a glutatona oxidada demonstraram estar diminuídas em D, assim como os produtos avançados de oxidação de proteínas. A análise morfométrica revelou aumento de frequência de áreas de secção transversa menores no músculo gastrocnêmio dos animais diabéticos. Desta forma, parece razoável inferir que, após 120 dias de indução do diabetes por estreptozotocina, as principais mudanças oxidativas tenham deixado de ocorrer. É possível que este estado tenha sido induzido por uma adaptação à demanda metabólica ocorrida durante o período e que os sistemas de degradação já tenham agido em resposta às modificações e que as proteínas em questão já tenham sido degradadas, levando à atrofia.

**Palavras-chaves:** Diabetes. Perda de massa. Estresse oxidativo.

CONTIERO, Wellington. **Chronic diabetes induced by streptozotocin effect on oxidative stress, and skeletal muscle atrophy**. 2014. 55p. Master Thesis (Master in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

### ABSTRACT

In skeletal muscle, type I diabetes is capable of initiating a process Atrophicus prematurely. Systemic hyperglycemia promotes increase of free radicals by activating pathways of metabolism glicolítico generate free radicals. This fact seems to contribute to the framework of atrophy. The experimental models of diabetes do not evaluate models of long exposure to hyperglycemia, which may not reflect the real picture of the illness with regard to the skeletal muscle, since the patient remains Hyperglycemic for decades. The objective of the present study was to evaluate the oxidative State of skeletal muscle and muscular atrophy in a model of diabetes induced by Streptozotocin, 120 days after induction. Thus, male Wistar rats for 90 days of age were divided between normoglicêmicos (N) and diabetic (D). The animals intended for Group D suffered diabetes induction with Streptozotocin (35 mg/kg). The animals intended for group N not suffered any procedure. After 120 days, the fasting glucose was assessed, the animals were sacrificed and the left and right gastrocnemius muscles harvested. For characterization of oxidative stress, trials were carried out to quantify of lipid peroxidation (chemiluminescence analysers stimulated by t-butyl hydroperoxide, and test of the thiobarbituric acid reactive substances), antioxidant capacity (total antioxidant capacity and total glutathionas and oxidized), and oxidative modification of proteins (carbonylation and quantification of chloramines). For characterization of the atrophy, morphometric analysis was performed. Analyses of lipoperoxidation, total antioxidade capacity, and carboniladas proteins did not reveal significant differences between the groups. Both the oxidized glutathione to glutathione total showed be diminished in D, as well as advanced oxidation protein products. Morphometric analysis revealed increased frequency of smaller cross-sectional areas in the gastrocnemius muscle of diabetic animals. Thus, it seems reasonable to infer that, after 120 days of induction of diabetes by Streptozotocin, the major oxidative changes have ceased to occur. It is possible that this State has been induced by an adaptation to the metabolic demand during the period and that the degradation systems have already acted in response to changes and that the proteínas in question have already been degraded, leading to atrophy.

**Keywords:** Diabetes. Mass loss. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Vias de fatores de transcrição mediadas por IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$ , aumentando os fatores de transcrição NF - B e STAT-1, sendo os principais reguladores das vias apoptóticas no modelo com Estreptozotocina. .... 13
- Figura 2-** Vias proteolíticas ativadas por espécies reativas de oxigênio – a via da calpaína, caspase-3 e o sistema proteassomal em músculo esquelético. .... 17
- Figura 3-** Sistema enzimático oxidante e antioxidante. O<sub>2</sub><sup>-•</sup> = ânion superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio ..... 19
- Figura 4-** Vias dois polióis induzidas por espécies reativas de oxigênio. .... 20
- Figura 5-** Estudos avaliando o efeito do estresse oxidativo no diabético tipo I. .... 21
- Figura 6-** Corte histológico em H. E. do musculo extensor digitório longo. Corte transversal do músculo A. animal induzido com STZ. B. animal controle. Corte longitudinal do músculo C. animal induzido com STZ D. animal controle. .... 24

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Produtos da glicação avançada
AOPP	Produtos avançados de oxidação de proteínas
ATP	Adenosina tri fosfato
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GLUT	Proteína transportadora de glicose
GLUT-2	Proteína transportadora de glicose tipo dois
GLUT-4	Proteína transportadora de glicose tipo quatro
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IL-1	Interleucina um
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotideo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato-oxidase
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
SOD	Superoxido Dismutase

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	DIABETES MELITUS E O MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO POR ESTREPTOZOTOCINA .....	11
1.2	HIPERGLICEMIA E COMPLICAÇÕES SISTÊMICAS ASSOCIADAS AO DIABETES .....	14
1.3	METABOLISMO E FORMAÇÃO DE ENERGIA NO MÚSCULO DE DIABÉTICOS DO TIPO I .....	15
1.4	MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS NAS CÉLULAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DIABÉTICOS .....	17
1.5	CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA NO CONTEXTO DA ADAPTAÇÃO CELULAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	21
1.6	MODIFICAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DO DIABÉTICO TIPO I.....	23
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>3.</b>	<b>HIPOTESE</b> .....	27
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
4.1	GERAIS.....	28
4.2	ESPECÍFICOS.....	28
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES</b> .....	29
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30
	Atrofia e estresse oxidativo após longo período de exposição à hiperglicemia em músculo de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. ....	35

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DIABETES MELITUS E O MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO POR ESTREPTOZOTOCINA.

O diabete *mellitus* foi considerado uma das maiores doenças do século passado e vem aumentando sua incidência nos últimos 10 anos, sendo considerada uma epidemia. Em 2013, a Organização Mundial da Saúde apontou, segundo dados obtidos até 2008, que 347 milhões de pessoas eram portadoras da doença no mundo, o que correspondia a 9,5% da população mundial adulta com predomínio de morte em 80% dos casos em países de baixa a média renda. Estima-se que aproximadamente 700 milhões de pessoas serão portadoras do diabetes em 2030 (FORBES; COOPER, 2013; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010).

O diabetes é caracterizado como uma síndrome crônica pelo comprometimento do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas; é causada pela falta de secreção de insulina pelo pâncreas ou redução da sensibilidade dos tecidos à ela, o que impede o uso da glicose pelo metabolismo e consequente hiperglicemia. Dentre as alterações provocadas pelo diabetes estão as associadas a danos secundários em múltiplos sistemas de órgãos como rins, olhos, nervos e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; FORBES; COOPER, 2013; KRAUSE *et. al.*, 2011).

Existem dois tipos gerais de diabete melitus denominados tipo I e tipo II. O tipo I, denominado insulino-dependente é causado por um conjunto de fatores genéticos e ambientais, que levam à destruição de até 80% das células  $\beta$  pancreáticas. As alterações estão envolvidas com a produção de anticorpos contra as células  $\beta$ , contra a insulina e contra outras substâncias como o ácido glutâmico descarboxilase e tirosina fosfatase, além de alterações em genes do antígeno leucocitário humano (HLA); já as alterações ambientais, parecem estar envolvidas com infecções virais, promovendo processos inflamatórios nas células  $\beta$  e consecutivamente, destruição das mesmas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; HVIID *et al.*, 2004).

Devido à lesão das células  $\beta$ , deficiência na produção de insulina e hiperglicemia, os portadores de diabetes do tipo I apresentam aumento da concentração de glicose na urina, desidratação nos tecidos por aumento da pressão osmótica intracelular

facilitando a entrada de glicose na célula, lesão tecidual por funcionamento anormal e alterações nas estruturas dos tecidos, suprimento sanguíneo inadequado levando à hipóxia, além da depleção de proteínas e lipídeos para provimento de fonte de energia, o que justifica a perda rápida de peso e astenia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; FORBES; COOPER, 2013).

O diabetes do tipo II é causado por uma redução da sensibilização dos tecidos-alvo aos efeitos metabólicos da insulina (resistência à insulina), estando também associada a múltiplas anormalidades metabólicas. A insulina se encontra em níveis elevados nas concentrações plasmáticas, em decorrência da resposta compensatória das células  $\beta$  do pâncreas, devido a diminuição e armazenamento dos carboidratos, e conseqüente elevação do nível de glicemia. Entretanto, níveis elevados de insulina não são suficientes para manter a regulação normal da glicose pela acentuada dessensibilização dos receptores de insulina nos tecidos. A conseqüência dessas alterações é a hiperglicemia após a ingestão de carboidratos ainda nos estágios iniciais da doença. Já nos estágios avançados do diabetes tipo II, as células  $\beta$  entram em exaustão e param a produção de insulina em quantidades suficientes para impedir o desenvolvimento de hiperglicemia, sobretudo sob ingestão de carboidratos. (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; FORBES; COOPER, 2013; KRAUSE *et. al.*, 2011).

Ainda há outros tipos de diabetes, como por defeitos genéticos nas células  $\beta$  ou na ação da insulina, endocrinopatias e a indução por fármacos, alvo de diversos estudos (FERREIRA; NICOLAU, 2011). Na experimentação animal, diversos fármacos são empregados para a indução do diabetes, dentre eles os que prejudicam a secreção de insulina, como o N-3 piridilmetil-N' 4 nitrofenil uréia, um raticida que deprime a nicotinamida adenina dinucleotídeo na célula  $\beta$  pancreática (possibilitando a síntese de insulina); a pentamidina, um fármaco que se liga aos ácidos nucleicos e DNA inibindo a síntese de insulina; o aloxano, envolvido no aumento de cálcio intracelular, alterações no DNA e aumento de estresse oxidativo destruindo as células  $\beta$  pancreáticas e impossibilitando a síntese de insulina; e a estreptozotocina, detalhada abaixo. 'O aloxano e a estreptozotocina destroem especificamente e apresentam citotoxicidade nas células  $\beta$  pancreáticas quando em doses adequadas (FERREIRA; NICOLAU, 2011, DORNAS W. C. *et. al.*, 2006, MILLER *et. al.*, 1978).

Os modelos experimentais mais utilizados para a indução de diabetes tipo I consistem na administração de aloxano ou estreptozotocina uma única vez (ZANOELLO *et. al.*, 2011, AUGHSTEEN, *et. al.*, 2006, CHAO *et al.*, 1976). A estreptozotocina é uma nitrosamina

que atua por diminuição da ação da adenina-nicotinamida nas células  $\beta$  pancreáticas, inibindo a síntese e conseqüentemente, bloqueando de forma irreversível a produção de insulina, uma condição similar ao diabetes insulino-dependente. Ademais, a lesão leva a ativação de NF- $\kappa$ B e conseqüente aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1(IL-1) e isotipos (CHEN *et al.*, 2001), que vão ativar diversos fatores (figura1), como pró apoptóticos e de indução de estresse oxidativo, que acabam contribuindo para a destruição das células  $\beta$  pancreáticas e conseqüentemente, hiperglicemia (FAHIM; EL-SABBAN; DAVIDSON, 1998; FERREIRA; NICOLAU, 2011; CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003).

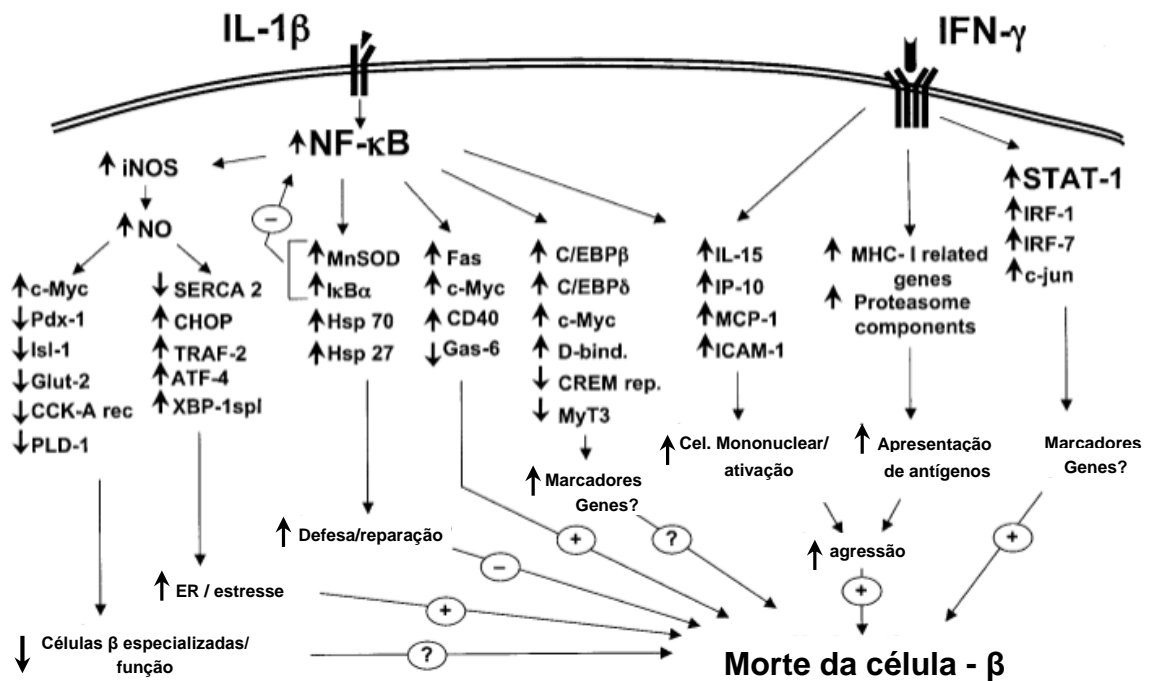


Figura 1: Vias de fatores de transcrição mediadas por IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$ , aumentando os fatores de transcrição NF - B e STAT-1, sendo os principais reguladores das vias apoptóticas no modelo com Estreptozotocina. Adaptado de CNOP *et.al*, 2005.

## 1.2 HIPERGLICEMIA E COMPLICAÇÕES SISTÊMICAS ASSOCIADAS AO DIABETES

As complicações sistêmicas ou comorbidades associadas ao diabetes variam de acordo com o tempo de exposição à hiperglicemia. Vários são os tecidos envolvidos, e as consequências da interação com altas concentrações de glicose. As microangiopatias, por exemplo, incluem uma variedade de anormalidades estruturais e funcionais da angiogênese na retina, apresentando espessamento de parede dos vasos na membrana basal da retina, e consecutivamente, hipertensão ocular e hipóxia, além da formação de microaneurismas e de edema na mácula, o que leva a perda de visão (FORBES; COOPER, 2013).

Ainda relacionadas às lesões microangiopáticas encontram-se as nefropatias, outra consequência comum do diabetes, causadas por lesões glomerulares devido ao espessamento da membrana basal capilar renal, esclerose mesangial e glomeruloesclerose nodular (COTRAN *et al.*, 2000; FORBES; COOPER, 2013); as neuropatias, que estão associadas com a progressão da doença, sendo mais comuns na fase crônica e causadas por anormalidades dos nervos periféricos. O mecanismo de alteração dos nervos estão ligados às alterações causadas pelas vias dos polióis e pela glicação de proteínas, levando a desmielinização segmentar do nervo, perda de fibras de pequeno e grande calibre e espessamento das arteríolas endoneurais com quadros de hipóxia local (DYCK; GIANNINI, 1996; COTRAN *et al.*, 2000; FORBES; COOPER, 2013).

Dentre as complicações macroangiopáticas, podem ser citadas as alterações vasculares pela disfunção endotelial, predispondo para a formação de aterosclerose e outras morbidades cardiovasculares, como uma consequência dos efeitos deletérios no compartimento vascular. O início desses eventos ocorre pela formação acelerada de placas ateroscleróticas em vasos de médio a grande calibre (COTRAN *et al.*, 2000; FORBES; COOPER, 2013).

Outra comorbidade extensivamente apresentada por indivíduos diabéticos é a perda de massa muscular. O diabetes do tipo I é capaz de induzir atrofia da musculatura esquelética, que ocorre pelo aumento do catabolismo celular. A insulina é um potente sinalizador para síntese protéica, e sua falta acaba por promover sinalização a favor da degradação proteica. Os indivíduos diabéticos apresentam perda de força, o que é atribuído à perda de estruturas musculares contráteis. Uma das causas é a hipóxia consequente do espessamento difuso dos vasos e diminuição do fluxo sanguíneo, diminuindo o oxigênio

disponível para sobrevivência da célula. Desta forma, há a necessidade de alteração da produção de energia para a via glicolítica, e consequente mudança do predomínio do tipo de fibra muscular de maneira geral ( KRAUSE *et. al.*, 2011; LUCIANO; MELLO, 1998).

Modelos experimentais de indução de diabetes do tipo I parecem promover as mesmas alterações observadas em seres humanos. A indução de diabetes por estreptozotocina ou aloxano em diversos tempos mostra mudança do tipo de fibra muscular em vários músculos. O transplante de ilhotas pancreáticas, recuperando a habilidade de produzir insulina é capaz de reverter a mudança do tipo de fibra (JERKOVIC, *et al.*, 2009; FEWELL, MOERLAND, 1995; MEDINA-SANCHEZ, 1994).

### **1.3 METABOLISMO E FORMAÇÃO DE ENERGIA NO MÚSCULO DE DIABÉTICOS DO TIPO I**

O músculo esquelético é responsável por aproximadamente 80% da captação de glicose mediada por insulina *in vivo* (HARDIN *et al.*, 1993), o que torna o músculo esquelético um alvo altamente sensível frente a oscilações dos níveis de glicose ou insulina. Como mencionado, a insulina é produzida nas células  $\beta$  pancreáticas. O estímulo para indução ou inibição da sua produção pelas células  $\beta$  é dado através de proteínas transportadoras de glicose conhecidas como GLUT. Uma família de GLUT homólogos foi identificada, caracterizando transportadores tecido-específicos. Neste caso, o subtipo que funciona como sensor nas células  $\beta$  é o GLUT-2, que também está presente como transportador de glicose do fígado. Esse subtipo, que é insulino-independente, faz com que a glicose transloque até a membrana plasmática da células  $\beta$ , e passe do meio extra para o meio intracelular, iniciando a síntese da produção de insulina em pré-próinsulina no complexo de golgi, e finalizando no retículo endoplasmático rugoso, formando vesículas para transportá-la para o meio extracelular. Para que a insulina seja liberada, a célula é estimulada pela própria glicose, por hormônios intestinais, por alguns aminoácidos, e por sulfoniluréias (CONTRAN *et al.*, 2000; WANG; GLEICHMANN, 1998).

O mecanismo pelo qual a insulina promove a captação no músculo esquelético envolve o transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4), que é insulino-dependente e está presente no músculo esquelético, músculo cardíaco e tecido adiposo (HARDIN *et al.*,

1993). Uma vez a insulina liberada no meio extracelular, os GLUT-4 presentes nas células musculares vão ativar uma cascata de sinalização, para aumento da captação de glicose e produção de energia. (WANG; GLEICHMANN, 1998).

No diabético tipo I, o mecanismo de captação de glicose pelo GLUT-4 encontra-se deficiente, fato explicado pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas, inibição da produção de insulina e consecutivamente a translocação de glicose. Assim, o GLUT-4, que é insulino-dependente, tem a sua ação e expressão diminuídas. Mediante essa situação, as células musculares aumentam a quantidade da proteína transportadora de glicose-2 (GLUT-2) na membrana das células musculares para a captação de glicose independente de insulina, e provimento de energia de forma anaeróbia no músculo (KRAUSE *et al.*, 2011; FORBES; COOPER, 2013). Um problema dessa adaptação à captação de glicose é a baixa concentração de GLUT-2 na membrana do músculo esquelético, fato que diminui sensivelmente o rendimento e eficiência das reações dependentes de glicose. Um novo mecanismo adaptativo surge aí, promovendo aumento da disponibilização de glicose intramuscular por oxidação de ácidos graxos (REIS *et al.*, 2008; LAAKSONEN *et al.*, 2002; LUCIANO; MELLO, 1998).

Além do aumento da disponibilização de energia por via anaeróbia, a disponibilização de oxigênio para o músculo esquelético no diabetes também está diminuída. O aumento da viscosidade sanguínea por aumento da glicose encontra-se elevada, o que dificulta o transporte de oxigênio, e a difusão do mesmo para os tecidos. Outras são as modificações que agravam o quadro de hipóxia muscular, como o espessamento de membrana basal; das proteínas constituintes da parede do vaso com enrijecimento do mesmo; diminuição da atividade do óxido nítrico, das prostaglandinas e aumento da endotelina -1, um potente vasoconstritor (REIS *et al.*, 2008).

Desta forma, com o quadro de hipóxia constituído, há redução na produção de energia pela via oxidativa, e conseqüentemente menor produção de ATP por via aeróbia, o que acarreta em aumento da formação de espécies reativas de oxigênio. Esse quadro acaba por alterar a forma de obtenção de energia pelo músculo esquelético no indivíduo diabético, por modificar as vias metabólicas de produção de energia e contribuindo para o processo de alteração de qualidade e quantidade de fibras musculares, o que caracterizaria a adaptação da célula muscular em longo prazo (HARCOURT; PENFOLD; FORBES, 2013; JERKOVIĆ *et al.*, 2009).

Como observado, todas as vias metabólicas encontram-se alteradas no indivíduo diabético. A ativação de vias alternativas para obtenção de glicose intramuscular e a diminuição do oxigênio disponível para geração de energia por via aeróbia acabam por aumentar consideravelmente a produção de espécies reativas de oxigênio (REIS *et al.*, 2008). Evidências apresentadas a partir da metade da década de 90 demonstram que o aumento do estresse oxidativo seria capaz de modular a degradação protéica no músculo estriado esquelético (figura 2) (POWERS *et.al.*, 2010), colaborando para a indução de um quadro de atrofia e astenia em doenças crônicas. No entanto, poucas são as evidências que demonstrem mudança de padrões de estresse oxidativo e modificações adaptativas do músculo esquelético com o tempo, já que o indivíduo permanece doente e apresentando as mesmas comorbidades por muito mais de uma década.

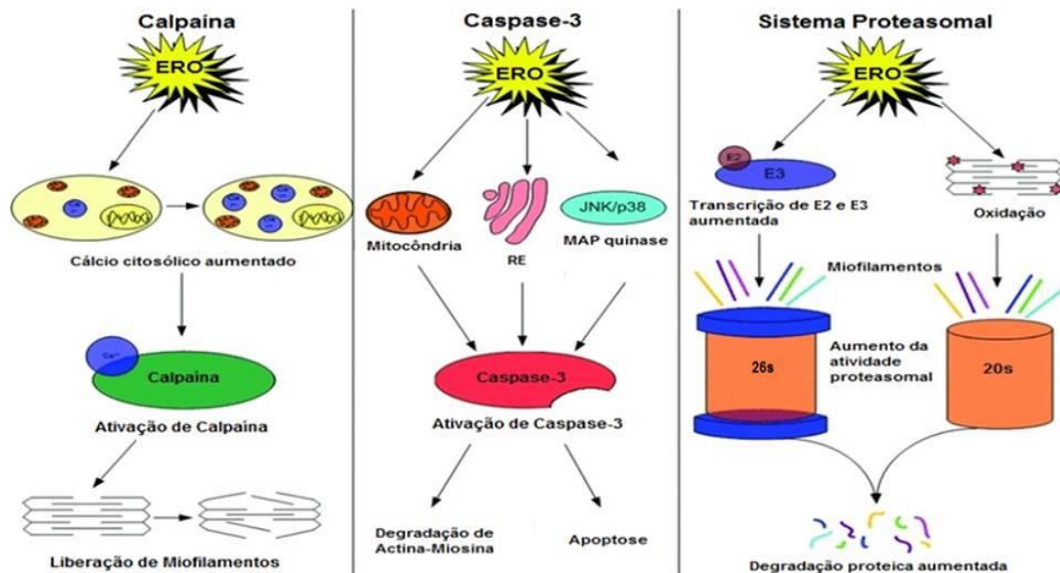


Figura 2: Vias proteolíticas ativadas por espécies reativas de oxigênio – a via da calpaina, caspase-3 e o sistema proteossomal em músculo esquelético. Adaptado de POWERS *et. al.*, 2010.

#### 1.4 MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS NAS CÉLULAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE DIABÉTICOS

Radicais livres são moléculas instáveis, com elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica. São formados por reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Ainda, alguns compostos não

apresentam elétrons desemparelhados, mas se comportam como radicais livres. A geração de radicais livres *in vivo* é um constante fenômeno, tanto do metabolismo fisiológico como em alterações adaptativas nas doenças. O oxigênio faz um papel duplo na célula: é essencial para organismos aeróbios, mas também atua com um radical livre, pois contém dois pares de elétrons disponíveis para reações de óxido-redução. Quando o oxigênio captura um elétron, se torna um radical livre, recebendo a denominação de ânion superóxido, podendo ser gerado na cadeia respiratória durante a fosforilação oxidativa na mitocôndria (DOMÍNGUEZ *et al.*, 1998). Um dos locais mais atingidos pelas espécies reativas é a membrana plasmática, tendo como resultado a lipoperoxidação, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, com consequente perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo intracelular e morte celular. A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (FERREIRA, A.; MATSUBARA, 1997; MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEGHINI, 1984).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) e a neutralização dos mesmos por defesa antioxidante. As ERO sofrem ação de sistemas antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase, encontrados na mitocôndria e no citosol. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; KUYVENHOVEN; MEINDERS, 1999). Os radicais livres também atuam como importantes sinalizadores intracelulares e estão envolvidos em muitos processos de adaptação celular, principalmente no tecido muscular (HALLIWELL ; GUTERRIDGE, 2007; PARTHIBAN *et al.*, 1995).

O estresse oxidativo apresenta um papel central nas reações bioquímicas associadas com a hiperglicemia crônica, contribuindo para a mudança no padrão de tipo de fibras musculares. O diabetes em humanos e induzido experimentalmente tem apresentado evidências crescentes como uma situação geradora de estresse oxidativo sistêmico e tecidual. Em ambos os casos são encontrados níveis aumentados de oxidação de lipídios, DNA e proteínas, além de diminuição dos níveis de antioxidantes (KHAMAISI *et al.*, 2000). Além disso, evidências sugerem que a lesão celular oxidativa causada pelos radicais livres contribuem para o desenvolvimento das complicações no diabetes tipo I, e que a diminuição das defesas antioxidantes (enzimáticas e não-enzimáticas) parecem correlacionar-se com a gravidade das alterações oxidativas relacionadas aos efeitos deletérios no diabetes em diversos tecidos. Estes padrões têm sido observados em alguns modelos experimentais e em diversos tempo de

exposição. No entanto, longos períodos de exposição não são extensivamente estudados (GIACCO; BROWNLEE, 2010; REIS *et al.*, 2008; HALLIWELL, GUTERRIDGE, 2007).

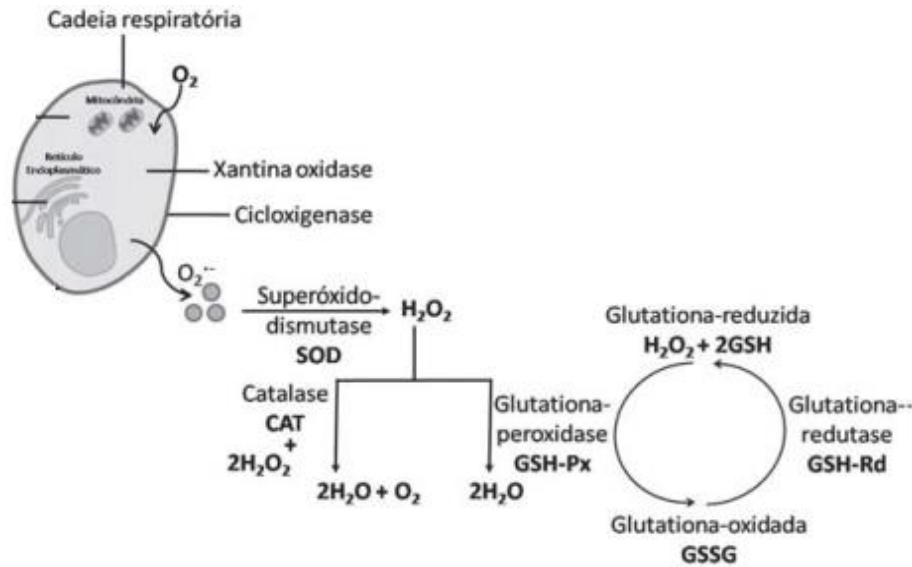


Figura 3. Sistema enzimático oxidante e antioxidante.  $O_2^{\bullet-}$  = ânion superóxido;  $H_2O_2$  = peróxido de hidrogênio. Adaptado de DELBIN; ANTUNES; ZANESCO, 2009.

Neste sentido, a glicose pode sofrer glicosilação oxidativa, sendo assim uma fonte potencial para formação de espécies reativas no diabético. Este mecanismo é seguido por um processo no qual a glicose se liga quimicamente ao grupo amino de proteínas, sem a ajuda de enzimas, formando produtos de glicosilação, que se reorganizam para formar produtos de glicosilação inicial do tipo Amadori, mais estáveis e quimicamente reversíveis. Isso acaba por estimular enzimas capazes de reorganizar proteínas modificadas ou formar proteínas altamente modificadas se o processo de reorganização for ineficiente (KIKUCHI *et al.*, 2003; KUYVENHOVEN; MEINDERS, 1999; BAYNES *et al.*, 1991).

Os produtos de glicosilação inicial em tecidos como o músculo, não sofrem dissociação e realizam uma lenta série de rearranjos químicos para formar os produtos de glicação avançada - *advanced glycation end-products* (AGE). E uma segunda fase, os AGE podem ser formados por alteração entre a produção de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes (HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013; KIKUCHI *et al.*, 2003). A hiperglicemia e o estresse oxidativo têm demonstrado acelerar a formação de AGE no músculo estriado esquelético, visto que dentre as possíveis alterações oxidativas que as proteínas musculares podem sofrer, a glicação da miosina de cadeia leve e de cadeia pesada têm sido apontadas como grande fonte

de dano protéico, e conseqüente degradação, o que poderia acarretar em disfunção e astenia (HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013; KIKUCHI *et al.*, 2003 BAYNES *et al.*, 1991).

A hiperglicemia, com conseqüente aumento de ERO, reduz os níveis de óxido nítrico ativando a aldose redutase (Figura 4). O aumento do fluxo pela via dos polióis, induzido pelo aumento de ERO, principalmente pelas mitocôndrias, determina maior conversão de glicose a sorbitol, reduzindo NADPH e glutatona (antioxidante intracelular) e aumentando o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia e a conversão do sorbitol à frutose, resultando aumento da relação NADH e NAD<sup>+</sup>, o que aumentaria a síntese “de novo” de diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da proteína kinase C, uma das proteínas responsáveis pela degradação de proteínas musculares geradoras de atrofia (GIACCO; BROWNLEE, 2010; REIS *et al.*, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2007; FERREIRA, A.; MATSUBARA, 1997)

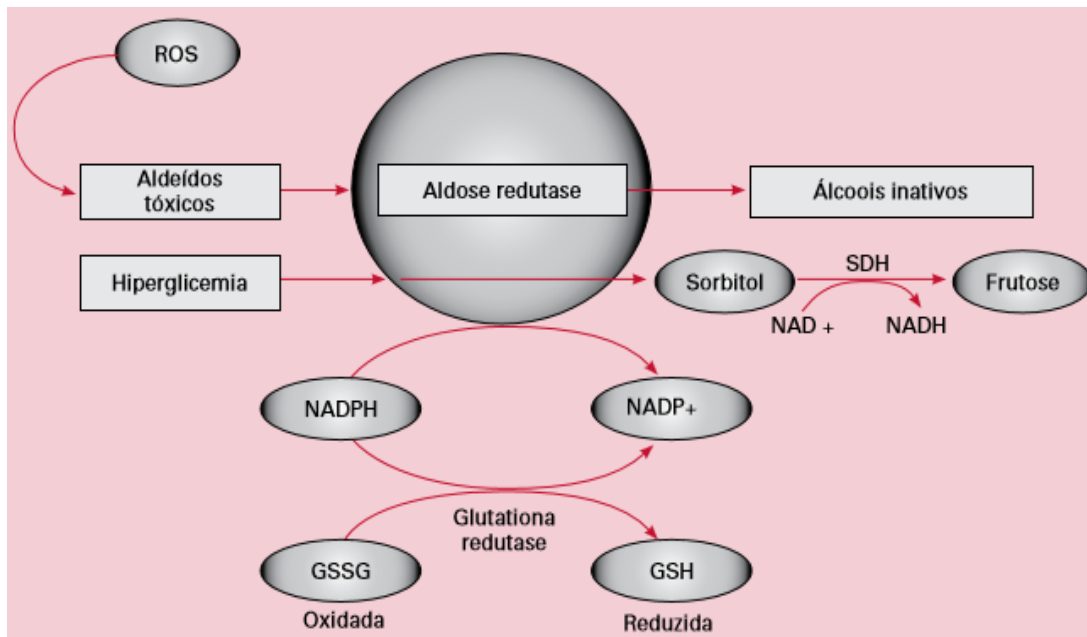


Figura 4. Vias dois polióis induzidas por espécies reativas de oxigênio. Adaptado de REIS *et al.*, 2008.

Além disso, os AGE não são os únicos produtos de oxidação de proteínas no músculo do diabético. A geração de espécies radicalares em várias vias metabólicas é capaz de formar diferentes produtos de oxidação de proteínas. A carbonilação e a formação de produtos avançados de oxidação de proteínas (AOPP) por interação com o processo inflamatório são as mais comuns (HÖHN; KÖNIG; GRUNE, 2013). O estresse oxidativo seria, então, capaz de modular direta e indiretamente a balança síntese/degradação de proteínas, levando a atrofia (KRAUSE *et al.*, 2011; LECKER *et al.*, 2004; POWERS; JACKSON, 2008; POWERS *et al.*,

2005). No entanto, parece que o perfil de geração de estresse oxidativo difere no tempo de exposição à hiperglicemia, o que interferiria diretamente no padrão de resposta à atrofia.

Reis *et al.* (2008) em sua revisão, mostraram diferentes parâmetros de estresse oxidativo em pacientes expostos a diversos tempos de hiperglicemia (tempo definido a partir do diagnóstico) (Figura 5). Em suma, o estresse oxidativo parece exercer seus efeitos tóxicos em estágios precoces da doença, deixando de aparecer em estágios mais avançados (REIS *et al.*, 2008). O fato traz à luz a participação do estresse oxidativo em processos adaptativos e não somente em mecanismos de lesão celular. Quando a adaptação está estabelecida e o equilíbrio metabólico é alcançado, os parâmetros deixariam de aparecer.

Investigadores	n	Marcador oxidativo	Marcador antioxidante	Resultados	Comentários	Anos a partir do diagnóstico (em média)
Santini e cols. (9)	72	ROOH Diene conjugados (DC)	CAOT	↑ ROOH e DC ↓ CAOT	Aumento do estresse oxidativo e redução das defesas antioxidantes, independentemente do controle glicêmico ou de complicações	
Dominguez e cols. (30)	54	MDA plasmático	GPx	↑ MDA ↓ GPx	Estresse oxidativo está presente em estágios precoces da doença e mantém-se no curso dela	→ <b>Precoce – 7 a 10 dias</b>
Vessby e cols. (31)	38	MDA 8-Iso-PGF <sub>2α</sub>	CAOT α e γ-tocoferol	↓ CAOT ↑ α e γ-tocoferol	Ausência de estresse oxidativo no DM1	→ <b>16 anos</b>
Hata e cols. (32)	27	8-OhdG	—	↑ 8-OhdG	Aumento do estresse oxidativo em estágios precoces da doença	→ <b>5,5 anos</b>
Gleisner e cols. (33)	27	8-Iso-PGF <sub>2α</sub>	CAOT	NS em relação aos controles	Ausência de estresse oxidativo no DM1, nos primeiros cinco anos de doença	→ <b>&lt; 5 anos</b>
Reis e cols. (34)	16	ROS	Redução de MTT pelo plasma	↑ ROS ↑ redução do MTT	Manutenção do balanço oxidante/antioxidante nos primeiros cinco anos após o diagnóstico	→ <b>2,62</b>
Mera e cols. (35)	37	ROOH Diene conjugados	CAOT	↑ ROOH e DC ↓ CAOT	Aumento do estresse oxidativo e redução das defesas antioxidantes, principalmente em mulheres	

ROOH = lipídeos oxidados; MDA = malonaldeído; GPx = glutatona peroxidase; 8-Iso-PGF<sub>2α</sub> = 8-Iso-prostaglandina F<sub>2α</sub>; CAOT = capacidade antioxidante total do plasma; 8-OhdG = 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina; ROS = espécies reativas de oxigênio; MTT = sais de tetrazólio.

**Figura 5. Estudos avaliando o efeito do estresse oxidativo no diabético tipo I. Adaptado de REIS *et al.*, 2008.**

## 1.5 CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA NO CONTEXTO DA ADAPTAÇÃO CELULAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Como mencionado, as glutatonas são uma família de enzimas envolvidas em sistemas antioxidantes enzimáticos. A glutatona é sintetizada no citoplasma de todas as células animais, sendo o fígado o órgão mais ativo na produção. A mitocôndria contém de 10 a 20% do total de glutatona de uma célula, o que é adquirido do citosol, já que a organela não é capaz de produzi-la. O principal substrato para a ação da glutatona peroxidase (GPx), é um

tripeptídeo que representa a forma reduzida da glutathiona, o GSH (gama-glutamil-cisteinil-glicina). Além de ser um cofator para a ação da GPx, a GSH está envolvida em uma série de processos metabólicos, incluindo o metabolismo do ascorbato, manutenção da comunicação entre as células, e geralmente prevenindo grupos proteína-SH de se oxidarem e promoverem ligações cruzadas. Pelos seus altos níveis encontrados em sistemas celulares, o equilíbrio entre GSH e GSSG (a forma oxidada da glutathiona, após sofrer ação da glutathiona peroxidase) é o maior responsável pela manutenção do estado redox da célula. Em uma situação normal no balanço redox de 10mM de glutathiona total, 99% representa GSH e 1% GSSG (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Além do seu importante papel no balanço redox, a GSH é um cofator para diversas enzimas em diversas vias metabólicas, incluindo enzimas envolvidas na síntese de leucotrienos. O metilglioxal, por exemplo, é produzido a partir de gliceraldeído 3-fosfato e de dihidroxicetona fosfato (intermediários da glicólise), e durante a lipoperoxidação. A GSH é capaz de oxidar metilglioxal, acelerando a sua remoção, já que a molécula reage rapidamente com DNA e proteínas, formando ligações covalentes com resíduos de cisteína, arginina e lisina, por exemplo. Adicionalmente, a glutathiona possui capacidade de assistir na remoção de aldeídos tóxicos, e possui um papel na manutenção do dobramento das proteínas e na sua degradação com ligações S-S (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

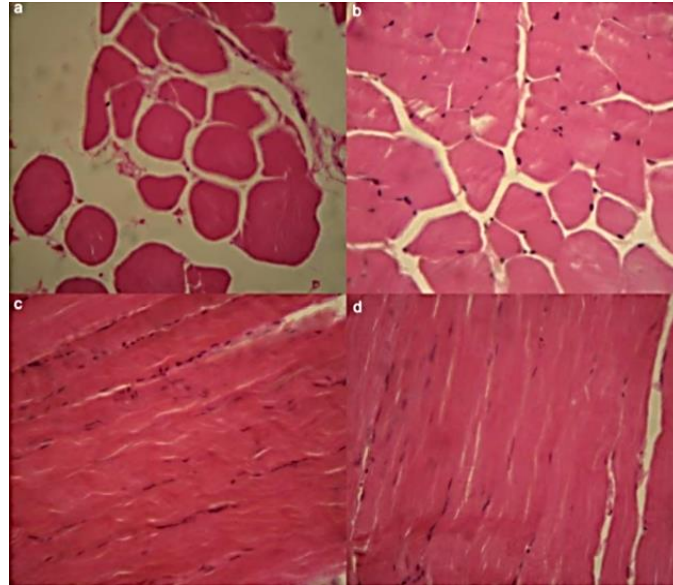
Como um antioxidante direto, *in vitro*, a GSH pode reagir com os radicais hidroxil, ácido hipocloroso, peroxinitrito, carboxil, peroxil, radicais carbono-centrados e oxigênio singlet, mas não muito efetivamente com o ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

No músculo esquelético, os níveis de GSH e GPx (38 UI/mg de proteína) são modestos. No músculo do diabético, a geração de AGE, modificação de estrutura de proteínas, ativação da glicólise e o aumento de espécies radicalares parecem ser fontes importantes de consumo de GSH. Como a direção da GSH pode tomar diferentes rumos, a tradicional relação GSSG/GSH pode não oferecer o resultado esperado quando o estresse oxidativo estiver estabelecido. Mastrocola *et al.* (2008), em um modelo de diabetes induzido por estreptozotocina verificaram aumento do índice GSSG/GST no músculo de ratos, 21 dias após a indução. Não são encontrados estudos na literatura que avaliem o músculo esquelético em modelos experimentais de longa duração. Em um modelo de 6 semanas de duração, Aragno *et al.* (2012) encontraram, no músculo esquelético de animais com diabetes induzido por estreptozotocina,

níveis aumentados da razão GSSG/GSH (%) 6 semanas (aproximadamente 42 dias) após a indução.

## **1.6 MODIFICAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DO DIABÉTICO TIPO I**

Como mencionado, uma das primeiras comorbidades encontradas em diabéticos do tipo I é a perda de massa magra, com desenvolvimento da perda e força muscular e atrofia (MEDINA-SÁNCHEZ et al., 1994; JERKOVIC et al., 2009). O diabetes do tipo I apresenta tipicamente atrofia do músculo esquelético associada ao aumento de morbidade e mortalidade. De acordo com o já exposto, a atrofia resulta da diminuição da síntese proteica e/ou aumento da proteólise nas fibras musculares. Apesar de o mecanismo preciso destes eventos ainda não ser totalmente conhecido, sabe-se que a indução do processo atrofico acontece via ubiquitinação e indução do sistema proteolítico ATP-ubiquitina-proteassoma, induzindo a redução do diâmetro das fibras musculares (KELLEHER et al., 2010). O diabetes do tipo I é capaz de iniciar um processo atrofico, com aumento do estado catabólico pela falta da ação de insulina, tal fato é explicado pelo aumento da produção de energia pela via anaeróbia induzindo a alteração no perfil metabólico e contrátil das fibras musculares, com predominância das fibras tipo IIA e IIB. Em estados avançados há predomínio das fibras tipo IIB, com redução no tamanho das fibras tipo I correlacionada com perda de massa muscular, redução do diâmetro de fibras, aumento da sua densidade numérica por unidade de área de referência e ligeira diminuição no diâmetro e comprimento do mionúcleo (Figura 6) (FAHIM; EL-SABBAN; DAVIDSON, 1998)



**Figura 6. Corte histológico em H. E. do músculo extensor digitório longo. Corte transversal do músculo A. animal induzido com STZ. B. animal controle. Corte longitudinal do músculo C. animal induzido com STZ D. animal controle. Adaptado de AUGHSTEEN; KHAIR; SULEIMAN, 2006.**

Na morfometria quantitativa de ratos não diabéticos e diabéticos pela indução de estreptozotocina, e acompanhados por 30 dias, AUGHSTEEN et al. (2006) verificaram que os músculos dos animais apresentavam diminuição no tamanho da fibra muscular, aumento de densidades por unidade de referência de área e consequente diminuição do peso do animal. Em um estudo de JERKOVIĆ et al. (2009) sobre o efeito do diabetes induzido por estreptozotocina sobre a capacidade regenerativa do músculo esquelético 10 dias, 4 e 8 semanas (aproximadamente 56 dias) após indução, os autores mostraram que os animais diabéticos apresentaram perda de peso e atrofia.

As fibras musculares são classificadas de acordo com sua função, características citoquímicas, ultraestruturais, propriedades contráteis e perfil metabólico. Essa classificação divide as diferentes fibras em: fibras oxidativas - tipo I (vermelhas), que realizam contração lenta e apresentam predominância no organismo em indivíduos saudáveis; fibras oxidativas-glicolíticas – tipo II A (vermelhas e brancas), que apresentam contração rápida e exercem papel de transição para as fibras glicolíticas; e fibras glicolíticas – tipo IIB (brancas), exercem contração rápida, e estão em menor quantidade (SARTORI et al., 2003).

O processo adaptativo durante a hiperglicemia crônica também induz modificação dos tipos de fibras musculares. Fewell et al., (1995) mostraram diminuição das

fibras de contração rápida em músculos de animais diabéticos, 5 semanas (aproximadamente 35 dias) após indução do diabetes experimental. Medina –Sánchez et al. (1994) mostraram aumento das fibras do tipo IIB (glicolíticas) em um modelo de 12 semanas (aproximadamente 84 dias) de indução de diabetes por streptozotocina. Jerkovic et al. (2009) mostraram em seu modelo de acompanhamento da indução do diabetes por estreptozotocina por 10 dias, 4 e 8 semanas (aproximadamente 56 dias), mudanças da redistribuição das fibras musculares dependente da duração da exposição à hiperglicemia, e afetando todos os tipos de fibras musculares. CHAO et al., 1978, em estudos sobre as alterações morfológicas e ultraestruturais das células musculares em ratos diabéticos, utilizando modelo de indução por estreptozotocina, por um período de 90 dias até o sacrifício, mostraram troca no padrão de fibras musculares para glicolíticas tipo IIB e diversas alterações morfológicas nas mitocôndrias musculares desse animais.

Novamente, não se encontram estudos na literatura que avaliem exposições à hiperglicemia de longa duração, o que refletiria diretamente um quadro real do indivíduo diabético que permanece exposto à doença por mais de uma década. Ainda, não existem relações entre o perfil do estresse oxidativo gerado e o estabelecimento da atrofia neste mesmo perfil de exposição.

## 2. JUSTIFICATIVA

A hiperglicemia crônica de longa duração induzida em indivíduos diabéticos leva a alterações metabólicas importantes de forma a mudar o padrão de obtenção de energia do indivíduo. O músculo esquelético é responsável por aproximadamente 80% da captação de glicose mediada por insulina *in vivo*, o que torna o músculo esquelético um alvo altamente sensível frente a oscilações dos níveis de glicose ou insulina. O estresse oxidativo gerado por estas vias metabólicas ativadas parece ter fundamental importância no processo de adaptação muscular e desenvolvimento do processo de atrofia e/ou mudança do perfil do tipo de fibra muscular. No entanto, os estudos que investigam separadamente os aspectos citados utilizam modelos de curta ou média duração de exposição à hiperglicemia. Não se encontram estudos na literatura que avaliem exposições à hiperglicemia de longa duração, o que refletiria diretamente um quadro real do indivíduo diabético que permanece exposto à doença por mais de uma década. Ainda, não existem relações entre o perfil do estresse oxidativo gerado e o estabelecimento da atrofia neste mesmo perfil de exposição.

### **3. HIPÓTESE**

A exposição de longo prazo à hiperglicemia possui características oxidativas diferentes da exposição de curto prazo, e influencia positivamente no estabelecimento do quadro de atrofia.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 GERAIS**

Verificar se a exposição crônica de longo prazo a um quadro de hiperglicemia, influencia na quantidade/qualidade de estresse oxidativo e a relação com a atrofia do músculo estriado esquelético no diabetes tipo I induzido por estreptozotocina.

### **4.2 ESPECÍFICOS**

Avaliar os níveis de lipoperoxidação de membrana nas células musculares, os níveis de Glutathione, na forma reduzida e oxidada e alterações das proteínas constituintes do tecido muscular, caracterizando o estado das alterações promovidas pelo estresse oxidativo a longo prazo;

Estabelecer as alterações microscópicas do músculo esquelético por meio da morfometria em animais diabéticos, 120 dias após indução por estreptozotocina, caracterizando a atrofia.

## 5. CONSIDERAÇÕES

Esta dissertação deu origem a um artigo científico intitulado “**Atrofia e estresse oxidativo após longo período de exposição à hiperglicemia em músculo de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina**” e submetido a um periódico científico.

Os resultados nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. Após 120 dias de indução do diabetes por estreptozotocina, as mudanças oxidativas tenham deixado de ocorrer.
2. É possível que este estado tenha sido induzido por uma adaptação à demanda metabólica ocorrida durante o período;
3. Os sistemas de degradação já promoveram as modificações nas proteínas musculares gerando o quadro atrófico estabelecido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGNO, M. *et. al.* **Obistatin induced recovery of myocardial dysfunction ion type I diabetic rats: underlying mechanisms.** Cardiovascular Diabetology, 11:129, 2012.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION,. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** Diabetes care, v. 36, n. Supplement 1, p. S67-S74, 2013.

AUGHSTEEN, A. A.; KHAIR, A.; SULEIMAN, A. A. **Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats.** JOP, v. 7, n. 4, p. 382-398, 2006.

BAYNES, J. W. **Role of oxidative stress in development of complications in diabetes.** Diabetes, v. 40, n. 4, p. 405-412, 1991.

CARVALHO, E. N. D.; CARVALHO, N. A. S. D.; FERREIRA, L. M. **Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats.** Acta Cirurgica Brasileira, v. 18, n. SPE, p. 60-64, 2003.

CHAO, T. *et. al.* **Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers of streptozotocin-diabetic rats.** Cell and tissue research, v. 168, n. 2, p. 239-246, 1976.

CHEN, Z. *et. al.* **MAP kinases.** Chemical reviews, v. 101, n. 8, p. 2449-2476, 2001.

CNOP, M. *et. al.* **Mechanisms of pancreatic  $\beta$ -cell death in Type 1 and Type 2 diabetes many differences, few similarities.** Diabetes, v. 54, n. suppl 2, p. S97-S107, 2005.

COTRAN, L., KUMAR V., ABBAS A.K., FAUSTO N. **Patologia: bases patológicas das doenças.** 5. ed. Elsevier, 2000.

DELBIN, M. A.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. **Papel do exercício físico na isquemia/reperfusão pulmonar e resposta inflamatória.** Rev Bras Cir Cardiovasc, v. 24, n. 4, p. 552-61, 2009.

DORNAS W. C. *et. al.* **Aloxano e Diabetes,** Revista Brasileira de Toxicologia 19, n.2 (2006) 81-87

DOMÍNGUEZ, C. *et. al.* **Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents.** Diabetes care, v. 21, n. 10, p. 1736-1742, 1998.

DYCK, P. J.; GIANNINI, C. **Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, v. 55, n. 12, p. 1181-1193, 1996.

FAHIM, M.; EL-SABBAN, F.; DAVIDSON, N. **Muscle contractility decrement and correlated morphology during the pathogenesis of streptozotocin-diabetic mice.** The Anatomical Record, v. 251, n. 2, p. 240-244, 1998.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, C. L. R.; NICOLAU, R. A. **Diabete experimental em ratos-revisão sistemática.** Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, Encontro Latino Americano de Pós-Graduação: Anais de trabalhos completos XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, p. 1-5, 2011.

FEWELL J. G., MOERLAND T. S. **Responses of mouse fast and slow skeletal muscle to streptozotocin diabetes: Myosin isoenzymes and phosphorous metabolites.**, Molecular and Cellular Biochemistry 148: 147-154, 1995.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. **Mechanisms of diabetic complications.** Physiological reviews, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. **Oxidative stress and diabetic complications.** Circulation research, v. 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.

HARDIN D. S., *et.al.*, **Muscle Group-Specific Regulation of GLUT 4 Glucose Transporters in Control, Diabetic, and Insulin-Treated Diabetic Rats,** Metabolism, Vol42,No 10 (October),1993: pp 1310-1315

HALLIWELL, B.; GUTERRIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford Biosciences, university press, v. 4, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.** Biochemical journal, v. 219, n. 1, p. 1, 1984.

HARCOURT, B. E.; PENFOLD, S. A.; FORBES, J. M. **Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation.** Nature Reviews Endocrinology, v. 9, n. 2, p. 113-123, 2013.

HÖHN, A.; KÖNIG, J.; GRUNE, T. **Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins.** Journal of proteomics, v. 92, p. 132-159, 2013.

HVIID, A. *et. al.*; **Childhood vaccination and type 1 diabetes.** New England Journal of Medicine, v. 350, n. 14, p. 1398-1404, 2004.

JERKOVIĆ, R. *et. al.*, **The effects of long-term experimental diabetes mellitus type I on skeletal muscle regeneration capacity.** Collegium antropologicum, v. 33, n. 4, p. 1115-1119, 2009.

JOHANSEN, J. S. *et. al.*, **Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice.** Cardiovascular diabetology, v. 4, n. 1, p. 5, 2005.

KELLEHER, A. R.; FAIRCHILD, T. J.; KESLACY, S. **STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF- $\kappa$ B canonical cascade activation.** Acta diabetologica, v. 47, n. 4, p. 315-323, 2010.

KHAMAISSI *et al.*, **Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine,** Biochem. J. 349, 579–586 2000.

KIKUCHI, S. *et al.* **Glycation - a sweet tempter for neuronal death.** Brain Research Reviews, Sapporo, Japan, v. 41, p. 306-323, 2003.

KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. **Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms.** Pediatric diabetes, v. 12, n. 4pt1, p. 345-364, 2011.

KUYVENHOVEN, J.; MEINDERS, A. **Oxidative stress and diabetes mellitus: pathogenesis of long-term complications.** European Journal of Internal Medicine, v. 10, n. 1, p. 9-19, 1999.

LAAKSONEN, D. E. *et. al.* **Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats.** Scandinavian journal of medicine & science in sports, v. 12, n. 3, p. 163-170, 2002.

LECKER, S. H. *et. al.* **Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression.** The FASEB Journal, v. 18, n. 1, p. 39-51, 2004.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. D. **Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais.** Revista Paulista de Educação Física, v. 12, n. 2, p. 202-209, 1998.

MASTROCOLA, R. *et. al.* **Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 44, n. 4, p. 584-593, 2008.

MEDINA-SÁNCHEZ M. *et.al.*, **Effect of streptozotocin-induced diabetes and islet transplantation in proximal skeletal muscle: a histochemical and morphometric analysis.** *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1994, 123(6):921-929

MELLO FILHO, A.; HOFFMANN, M.; MENEGHINI, R. **Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron.** *Biochemical Journal*, v. 218, n. 1, p. 273, 1984.

MILLER, L. V.; STOKES, J. D.; SILPIPAT, C. **Diabetes mellitus and autonomic dysfunction after Vacor rodenticide ingestion.** *Diabetes Care*, v. 1, n. 2, p. 73-76, 1978.

PARTHIBAN, A. *et. al.* **Oxidative stress and the development of diabetic complications-antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane.** *Cell biology international*, v. 19, n. 12, p. 987-994, 1995.

POWERS, S. K. *et. al.*, **Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation,** *Exp Physiol* 95.1 pp 1–9, 2010.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. **Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production.** *Physiological reviews*, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.

POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; DERUISSEAU, K. C. **Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress.** *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 288, n. 2, p. R337-R344, 2005.

REIS, J. S. *et. al.* **Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1.** *Arq. bras. endocrinol. metab*, v. 52, n. 7, p. 1096-1105, 2008.

SANCHEZ, O. A. *et. al.*, **Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats.** *Journal of Applied Physiology*, v. 99, n. 2, p. 472-478, 2005.

SARTORI, J. R. *et. al.*, **Tipos de fibras no músculo flexor longo do hálux de frangos de corte submetidos ao estresse pelo calor e frio e alimentados em" pair-feeding.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n. 4, p. 918-925, 2003.

SHAW J.E. , SICREE R.A. , ZIMMET P.Z. **Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030**, Diabetes Research and Clinical Practice Volume 87, Issue 1, Pages 4–14, 2010

VASCONCELOS, S. M. L. *et. al.*, **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação**. Quim Nova, v. 30, n. 5, p. 1323-38, 2007.

WANG, Z.; GLEICHMANN, H. **GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice**. Diabetes, v. 47, n. 1, p. 50-56, 1998.

ZANOELLO, A. M. *et. al.*, **Efeito protetor do Syzygium cumini contra Diabetes Mellitus induzido por aloxano em ratos**. Acta Farmacéutica Bonaerense, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2002.

**Atrofia e estresse oxidativo após longo período de exposição à hiperglicemia em músculo de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina.**

Wellington Contiero<sup>1</sup>, Camila Cavichioli Sehaber<sup>2</sup>, Alessandra Lourenço Cecchini<sup>3</sup>,  
Jacqueline Nelisis Zanoni<sup>2</sup>, Flávia Alessandra Guarnier<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiopatologia das Adaptações Musculares, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, PR

<sup>2</sup> Laboratório de Plasticidade Neuroentérica, Espaço Segundo Cérebro, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, PR

<sup>3</sup> Laboratório de Patologia Molecular, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, PR

**\*Autor correspondente:**

Flávia A. Guarnier

Departamento de Ciências Patológicas

Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário

e-mail: [faguarnier@uel.br](mailto:faguarnier@uel.br)

Phone/Fax +55-43-33714267

86051-990 Londrina, Brasil

## RESUMO

No músculo esquelético, o diabetes do tipo I é capaz de iniciar um processo atrófico precocemente. A hiperglicemia sistêmica promove aumento de radicais livres por ativar vias do metabolismo glicolítico geradoras de radicais livres. Este fato parece contribuir com o quadro de atrofia. Os modelos experimentais de diabetes não avaliam modelos de longa exposição à hiperglicemia, o que pode não refletir o quadro real da doença no que diz respeito ao músculo esquelético, já que o paciente permanece hiperglicêmico por décadas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o estado oxidativo do músculo esquelético e a atrofia muscular em um modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, 120 dias após indução. Assim, ratos Wistar machos de 90 dias de idade foram divididos entre normoglicêmicos (N) e diabéticos (D). Os animais destinados ao grupo D sofreram indução do diabetes com estreptozotocina (35 mg/kg). Os animais destinados ao grupo N não sofreram nenhum procedimento. Após 120 dias, a glicemia de jejum foi avaliada, os animais foram sacrificados e os músculos gastrocnêmio esquerdo e direito colhidos. Para caracterização do estresse oxidativo, foram realizados ensaios para quantificação de peroxidação lipídica (quimiluminescência estimulada por hidroperóxido de t-butil, e teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), capacidade antioxidante (capacidade antioxidante total e glutathionas total e oxidada), e alteração oxidativa de proteínas (carbonilação e quantificação de cloraminas). Para caracterização da atrofia, a análise morfométrica foi realizada. As análises de lipoperoxidação, capacidade antioxidante total, e proteínas carboniladas não revelaram diferenças significantes entre os grupos. Tanto a glutathiona total quanto a glutathiona oxidada demonstraram estar diminuídas em D, assim como os produtos avançados de oxidação de proteínas. A análise morfométrica revelou aumento de frequência de áreas de secção transversa menores no músculo gastrocnêmio dos animais diabéticos. Desta forma, parece razoável inferir que, após 120 dias de indução do diabetes por estreptozotocina, as principais mudanças oxidativas tenham deixado de ocorrer. É possível que este estado tenha sido induzido por uma adaptação à demanda metabólica ocorrida durante o período e que os sistemas de degradação já tenham agido em resposta às modificações e que as proteínas em questão já tenham sido degradadas, levando à atrofia.

Palavras Chaves: diabetes, perda de massa, estresse oxidativo

## INTRODUÇÃO

O Diabetes melito é uma das maiores doenças do século passado e vem aumentando sua incidência nos últimos 10 anos, sendo considerada uma epidemia. Em 2013, a Organização Mundial da Saúde apontou que, até o ano de 2008, haviam 347 milhões de pessoas portadoras de Diabetes no mundo. Estima-se que até o ano de 2030 este índice poderá ser duplicado em relação aos portadores no mundo (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). No diabético tipo I, a hiperglicemia ocorre por um processo complexo ocasionado por destruição de células beta, as responsáveis pela produção de insulina (FORBES E COOPE, 2013).

As complicações sistêmicas ou comorbidades associadas ao diabetes variam de acordo com o tempo de exposição à hiperglicemia (FORBES; COOPER, 2013). Uma das primeiras comorbidades encontradas em diabéticos do tipo I é a perda de massa magra, com desenvolvimento da perda de força muscular e atrofia (MEDINA-SÁNCHEZ et al., 1994; JERKOVIC et al., 2009). O diabetes do tipo I apresenta tipicamente atrofia do músculo esquelético associada ao aumento de morbidade e mortalidade. De acordo com o já exposto, a atrofia resulta da diminuição da síntese proteica e/ou aumento da proteólise nas fibras musculares. Apesar de o mecanismo preciso destes eventos ainda não ser totalmente conhecido, sabe-se que a indução do processo atrofico acontece via ubiquitinação e indução do sistema proteolítico ATP-ubiquitina-proteassoma, induzindo a redução do diâmetro das fibras musculares (KELLEHER et al., 2010). Modelos experimentais de indução de diabetes do tipo I parecem promover as mesmas alterações observadas em seres humanos. A indução de diabetes por estreptozotocina ou aloxano em diversos tempos mostra atrofia, com mudança do tipo de fibra muscular em vários músculos. O transplante de ilhotas pancreáticas, recuperando a habilidade de produzir insulina é capaz de reverter o quadro (JERKOVIC et al, 2009; FEWELL, et. al., 1995; MEDINA-SANCHEZ, 1994).

O músculo esquelético é responsável por aproximadamente 80% da captação de glicose mediada por insulina *in vivo* (HARDIN et al., 1993), o que torna o músculo esquelético um alvo altamente sensível frente a oscilações dos níveis de glicose ou insulina. Com o quadro de hipóxia constituído pelo aumento da viscosidade sanguínea e transporte diminuído de oxigênio para os tecidos, há redução na produção de energia pela via oxidativa, e consequentemente, menor produção de ATP por via aeróbia, o que acarreta em aumento da formação de espécies reativas de oxigênio. Ainda, o estresse oxidativo apresenta um papel

central nas reações bioquímicas associadas com a hiperglicemia crônica. Todas as vias metabólicas encontram-se alteradas no indivíduo diabético. A ativação de vias alternativas para obtenção de glicose intramuscular e a diminuição do oxigênio disponível para geração de energia por via aeróbia acabam por aumentar consideravelmente a produção de espécies reativas de oxigênio (REIS et al., 2008). Evidências apresentadas a partir da metade da década de 90 demonstram que o aumento do estresse oxidativo seria capaz de modular a degradação protéica no músculo estriado esquelético (POWERS, 2010), colaborando para a indução de um quadro de atrofia e astenia em doenças crônicas. No entanto, poucas são as evidências que demonstrem mudança de padrões de estresse oxidativo e modificações adaptativas do músculo esquelético com o tempo, já que o indivíduo permanece doente e apresentando as mesmas comorbidades por muito mais de uma década.

As glutatonas são uma família de enzimas envolvidas em sistemas antioxidantes enzimáticos. A glutatona é sintetizada no citoplasma de todas as células animais, sendo o fígado o órgão mais ativo na produção (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Além do seu importante papel no balanço redox, a GSH é um cofator para diversas enzimas em diversas vias metabólicas. No músculo esquelético, os níveis de GSH são modestos. No músculo do diabético, a geração de produtos de glicação, modificação de estrutura de proteínas, ativação da glicólise e o aumento de espécies radicalares parecem ser fontes importantes de consumo de GSH. Como a direção da GSH pode tomar diferentes rumos, a tradicional relação GSSG/GSH pode não oferecer o resultado esperado quando o estresse oxidativo estiver estabelecido. Mastrocola et al. (2008), em um modelo de diabetes induzido por estreptozotocina verificaram aumento do índice GSSG/GSH no músculo de ratos, 21 dias após a indução. Não são encontrados estudos na literatura que avaliem o músculo esquelético em modelos experimentais de longa duração. Em um modelo de 6 semanas de duração, Aragno et al. (2012) encontraram, no músculo esquelético de animais com diabetes induzido por estreptozotocina, níveis aumentados da razão GSSG/GSH (%) 6 semanas (aproximadamente 42 dias) após a indução. Trabalhos recentes avaliando concentração de GSH e GSSG muscular em modelos experimentais de doenças crônicas com componentes de perda de massa muscular mostraram diminuição dos níveis de GSH, sem aumento de GSSG. (GUARNIER et al., 2010; BERNARDES et al., 2014).

Como visto, a hiperglicemia crônica de longa duração induzida em indivíduos diabéticos leva a alterações metabólicas importantes de forma a mudar o padrão de obtenção de energia do indivíduo. O estresse oxidativo gerado por estas vias metabólicas ativadas parece ter

fundamental importância no processo de adaptação muscular e desenvolvimento do processo de atrofia e/ou mudança do perfil do tipo de fibra muscular. No entanto, os estudos que investigam separadamente os aspectos citados utilizam modelos de curta ou média duração de exposição à hiperglicemia. Não se encontram estudos na literatura que avaliem exposições à hiperglicemia de longa duração, o que refletiria diretamente um quadro real do indivíduo diabético que permanece exposto à doença por mais de uma década. Ainda, não existem relações entre o perfil do estresse oxidativo gerado e o estabelecimento da atrofia neste mesmo perfil de exposição. O objetivo do presente estudo é verificar se a exposição crônica de longo prazo a um quadro de hiperglicemia, influencia na quantidade/qualidade de estresse oxidativo e a relação com a atrofia do músculo estriado esquelético no diabetes tipo I induzido por estreptozotocina.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Departamento de Ciências Morfológicas, Laboratório de Pesquisa em Plasticidade Neural Entérica coordenado pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jacqueline Nelisis Zanoni da Universidade Estadual de Maringá (UEM), e aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais da UEM.

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Maringá (200-250 g, 90 dias de idade), divididos em 2 grupos (n = 9/grupo): controle normoglicêmico (N), acondicionados em gaiolas e acompanhados por 120 dias; e diabéticos (D), que sofreram indução por inoculação e.v. (veia peniana) de estreptozotocina 35 mg/kg (Sigma, St Louis, EUA; após jejum de 14 horas) e acompanhados por 120 dias. Os animais foram pesados antes e após o período de tratamento. Para verificar o estabelecimento do modelo experimental, uma gota de sangue foi obtida da cauda dos animais para mensuração da glicemia pela determinação fotométrica da glicose por meio de glicoso-colorante-oxidoreductase (glicosímetro Accu-Chek Active, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Alemanha). Somente foram utilizados ratos com glicemia superior a 200 mg/dL nos grupos D. Após o período estabelecido, os animais foram pesados, anestesiados com solução de tiopental sódico (40 mg/kg i.p.), e eutanaziados por rompimento da aorta

abdominal. O sangue para a quantificação da glicemia final foi colhido pela aorta abdominal antes do sacrifício, e os músculos gastrocnêmio colhidos e pesados. O índice de caquexia foi calculado pela fórmula:  $IC = [mi - mf + (gmc)] / (mi + gmc) \times 100$ , onde, mf - massa final, mi - massa inicial e gmc - ganho de massa corpórea (adaptado de GUARNIER *et al.*, 2010). Um dos músculos gastrocnêmio foi destinado à fixação com metanol e ácido acético glacial (3:1 v/v) por 70 minutos, e então incluído em parafina. O músculo contralateral foi imediatamente congelado em N<sub>2</sub> líquido e estocado a -86°C até o uso.

### **Avaliação do estado oxidativo do músculo**

**Preparo do tecido:** Para as técnicas de estresse oxidativo, os tecidos foram colocados em tubos gelados e homogeneizados em homogeneizador tipo ultra-turrax (Marconi - MA102/mini) em ciclos únicos de 45s, contendo concentração de tecido e tampão previamente estabelecido para cada técnica. O homogenato total a 10 mg/mL em 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/120 mM KCl, pH 7.4 foi usado para as técnicas de quimiluminescência estimulada por t-butil hidroperóxido (QL) e teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para determinação da quantidade de proteínas carboniladas, um homogenato 50 mg/mL em 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/120 mM KCl, pH 7.4 foi utilizado (Reznick & Packer, 1994). Para capacidade antioxidante total (TRAP) e ensaios de glutathionas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), um sobrenadante proveniente de uma centrifugação a 10000 x g por 15 minutos a 4°C foi de um homogenato 50 mg/mL em 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/120 mM KCl, pH 7.4 foi utilizado. Para a determinação de proteínas altamente oxidadas, foi utilizado um homogenato total 40 mg/mL em tampão tris-HCl 20 mM, pH 7.4 e centrifugado a 3600 x g por 10 minutos por 4°C.

**Quimiluminescência estimulada por tert-butil hidroperóxido:** Para avaliar o grau de estresse oxidativo prévio do tecido, foi utilizado o método de quimiluminescência (QL) induzida por *tert*-butil hidroperóxido, descrito por Gonzalez-Flecha *et al.* (1991). Os homogenatos totais foram incubados com tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM a 37°C por 5 minutos. A reação teve início após a adição de *tert*-butil à amostra. A emissão de luminescência pela amostra foi determinada em luminômetro durante 40 minutos. Após o

período, uma curva de iniciação, propagação e terminação foi obtida e a área sob a curva determinada por obtenção da integral. Os resultados foram expressos em Área sob a curva de QL.

**Quantificação da Capacidade Antioxidante Total (CAT):** A avaliação da capacidade antioxidante total foi medida por quimiluminescência (QL) e foi realizada conforme descrito anteriormente para Repetto et al. (1996). Em um meio de reação contendo 20 $\mu$ M de 2-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) e 200 $\mu$ M de luminol. Depois da emissão máxima ser atingida, 70 $\mu$ L de sobrenadante ou trolox (análogo hidrossolúvel do alfa-tocoferol) foi adicionado ao meio de reação. O tempo total de *quenching* foi comparado com o tempo do trolox, e os resultados expressos em  $\mu$ M de trolox.

**Quantificação de substâncias de reação ácido tiobarbitúrico (TBARS):** A peroxidação lipídica nos homogenatos dos músculos dos dois grupos foi determinada pela reação de TBARS, conforme descrito por Oliveira e Cecchini (2000). No ensaio de TBARS, o malondialdeído (MDA) formado durante a peroxidação lipídica reage e forma um produto de coloração rosa translúcido, 2-MDA (TBA). Em solução de ácido 2-MDA (TBA) absorve luz em 532 nm e é facilmente extraível em solventes orgânicos tais como o n-butanol. O nível de MDA foi estimado em nmol/100 mg de tecido.

**Glutationa reduzida e Glutationa oxidada:** Segundo Tietze(1969) para determinação de GSH, foi adicionada glutatona redutase ao sobrenadante do homogenato a fim de converter toda GSSG à GSH e promover a determinação espectrofotométrica das duas formas. Para a determinação de GSSG, os sobrenadantes foram incubados por uma hora com 2-vinilpiridina, ligando-se irreversivelmente à GSH do meio. Ambos os resultados foram expressos em  $\mu$ M/mL.

**Determinação de Proteínas Carboniladas:** Foram determinadas como descrito por Reznick e Packer (1996), com modificações. Brevemente, os homogenatos foram primeiramente centrifugados a 3000 x g por 10 min, em temperatura ambiente (TA), e os sobrenadantes submetidos à reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) em HCl 2,5N. A

seguir foram incubados por 1h à TA com agitações a cada 15 minutos. As amostras foram então lavadas em 20% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas por 10 minutos para coletar o precipitado de proteínas, quando foi realizada uma nova lavagem com TCA 10% e os pellets foram dispersados mecanicamente. Finalmente, os pellets foram lavados 3 vezes em etanol:etilacetato (1:1; v:v) para remoção da DNPH livre e dos contaminantes lipídicos. O precipitado final foi dissolvido em Guanidina 6M e qualquer material não solúvel foi removido por uma centrifugação adicional. O conteúdo de grupos carbonil foi calculado pela leitura do pico de absorvância entre 355 e 390nm. E a fórmula  $C/4 \text{ Abs (355-390 nm)} = 45,45 \text{ nmol/mL}$ , onde C é a concentração de DNPH/mL e 45,45 é a constante de absorvância. Os resultados foram expressos em nmol de proteínas carboniladas/mg de proteínas totais.

#### **Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação de Proteínas –**

**AOPP:** Para quantificar os produtos avançados de oxidação de proteínas utilizou-se a técnica descrita por Witko-Sarsat *et al.* (1996), com modificações. Ao sobrenadante, foi acrescentado iodeto de potássio (KI) e ácido acético. Para o branco foi utilizado PBS, KI e ácido acético. As aminas das amostras são, *in vivo*, oxidadas pelo ácido hipocloroso (HOCl, do processo inflamatório) presente no meio e convertidas em compostos organoclorados (cloraminas), que reagem com o KI a fim de produzir triiodeto, que foi detectado em leitora de microplaca a 340nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de cloramina/L.

**Quantificação de proteínas totais:** A quantificação de proteínas totais dos homogenatos foi determinada para normalização dos resultados, utilizando albumina bovina como padrão (LOWRY, 1951; MILLER, 1959).

#### **Avaliação da atrofia muscular**

Para se estabelecer um parâmetro histológico de perda de massa muscular, a área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio foi determinada. Após a inclusão em parafina, como descrito, cortes semi-seriados de 5 $\mu\text{m}$  de espessura foram realizados (5 cortes/lâmina, intervalo de 50 $\mu\text{m}$ /corte) em cada músculo. Os cortes foram corados em hematoxilina e eosina. Para medida da área de secção transversa, as identificações das lâminas

foram cobertas, e fotomicrografias foram registradas (5 campos/corte/animal), totalizando 600 fibras medidas/animal, usando um microscópio óptico (aumento de 200x) acoplado a uma câmera de alta resolução. Um sistema de análise de imagens (Image-Pro\_plus 4.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) foi utilizado para determinar a área de cada fibra medida em  $\mu\text{m}^2$ . Pela heterogeneidade natural intra-grupo no tamanho das fibras, os valores foram agrupados or procedimento (N ou D), a distribuição de frequência foi determinada baseada nos intervalos de classes (20 classes) de 0 a 10000  $\mu\text{m}^2$ .

### **Análise estatística**

Os resultados foram analisados pelos softwares Origin 8.6 e GraphPad Prism, e expressos em forma de média  $\pm$  erro padrão da média e comparados por teste t de student para dados não pareados quando a distribuição foi considerada normal pelo teste de Kormolgorov-Smirnov. Quando a distribuição não foi considerada normal, as comparações entre os grupos N e D foram expressas por meio da mediana e intervalo interquartis, e os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Na análise da morfometria do músculo estriado esquelético, histogramas de distribuição de frequência da área de secção transversa foram construídos e a frequência absoluta calculada.

## **RESULTADOS**

### **Modelo animal**

A tabela 1 mostra os parâmetros relacionados ao estabelecimento do diabetes experimental, evolução da glicemia durante os 120 dias, perda de massa muscular e do índice de caquexia. A glicemia realizada após 2 dias da indução nos animais no grupo D mostrou-se maior que 200 mg/dL, caracterizando o quadro de diabetes precocemente. Ao final do experimento os animais do grupo N apresentaram glicemia considerada normal ( $148,17 \pm 2,38$  mg/dL), enquanto que os animais do grupo D apresentaram valores de  $574,17 \pm 25,74$  mg/dL ao final do experimento ( $p < 0,05$ ). O índice de caquexia, que reflete o comportamento da massa total apresentada durante todo o período experimental em relação ao grupo controle

(GUARNIER et al., 2010), mostrou perda de  $36,71 \pm 1,49\%$  pelos animais D na comparação com N. Da mesma forma, quando a massa do gastrocnêmio foi comparada, os animais diabéticos mostraram diminuição significativa em relação ao controle ( $1127 \pm 101,0$  e  $1647 \pm 81,2$  mg, respectivamente), mostrando variação percentual próxima ao índice de caquexia de 31,6%.

### **Alterações oxidativas no músculo esquelético após 120 dias de indução**

A Tabela 2 demonstra os níveis das variáveis relacionadas ao estresse oxidativo no músculo esquelético de ratos diabéticos, 120 dias após a indução. Os valores de dialdeído malônico (MDA) estimados pela técnica de TBARS não mostraram diferenças estatisticamente significantes ( $0,340 \pm 0,19$  em N e  $0,404 \pm 0,22$  nmol de MDA/100mg de tecido em D) na comparação entre os grupos. Os níveis de antioxidantes solúveis de baixa massa molecular quantificados no ensaio de CAT também não mostrou diferenças significativas quando N ( $30,92 \pm 11,09$   $\mu$ M de trolox) e D ( $30,21 \pm 10,69$   $\mu$ M de trolox) foram comparados. Da mesma maneira, o teste t de student para dados não pareados mostrou diferenças nos perfis das curvas de Quimiluminescência, ou na avaliação da área sob a curva. Os animais do grupo N apresentaram  $13562 \pm 9325$  Unidades Relativas de Luz<sup>2</sup>, enquanto os diabéticos mostraram  $7861 \pm 2511$  Unidades Relativas de Luz<sup>2</sup>.

Nos parâmetros relacionados à oxidação de proteínas, os níveis de proteínas carboniladas não mostraram-se diferentes no grupo diabético ( $0,072 \pm 0,06$  nmol de grupos carbonil / mg de proteínas totais) quando comparados ao grupo normoglicêmico ( $0,113 \pm 0,10$  nmol de grupos carbonil / mg de proteínas totais). Ainda, quando a interação de amins primárias com oxidantes clorados através da técnica de detecção de produtos avançados da oxidação de proteínas foi avaliada, também não foram observadas diferenças entre os níveis de proteínas modificadas no grupo D ( $10,6 \pm 0,01$  nM cloramina T/mg de proteínas totais) quando comparado ao grupo N ( $9,93 \pm 0,01$  nM cloramina T/mg de proteínas totais).

A Tabela 3 demonstrou os níveis de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada oxidativo no músculo esquelético de ratos diabéticos, 120 dias após a indução. A quantificação de glutathiona no músculo esquelético mostra que os níveis de GSH no grupo D ( $0,48 [0,44-0,53]$   $\mu$ mol/mg de proteína) diminuem significativamente quando comparadas ao grupo N ( $8,36 [4,37-16,66]$   $\mu$ mol/mg de proteína,  $p < 0,0001$ ). Ao contrário do esperado, houve diminuição dos níveis de GSSG no grupo D ( $0,040 \pm 0,023$   $\mu$ mol/mg de proteína) em relação ao grupo N

( $0,056 \pm 0,023$   $\mu\text{mol/mg}$  de proteína,  $p < 0,05$ ). O cálculo da relação GSSG/2 GSH apresentou diferença significativa entre os grupos.

### **Caracterização da atrofia pela área de secção transversa do músculo gastrocnêmio**

A distribuição de frequência das áreas de secção transversas mostrou diferenças quando os dos grupos foram comparados. Imagens representativas dos músculos gastrocnêmios estão apresentadas na Figura 1 (A e B). Nos animais normoglicêmicos, o 50° percentil ( $3317\mu\text{m}^2$ ) das áreas ocorreu na sétima classe ( $3000$  a  $3500 \mu\text{m}^2$ ). Já nos animais diabéticos, o 50° percentil ( $2320 \mu\text{m}^2$ ) ocorreu na quinta classe ( $2000$  a  $2500 \mu\text{m}^2$ ). Os histogramas de distribuição de frequência completos encontram-se apresentados na figura 1.

## **DISCUSSÃO**

Modelos experimentais de indução de diabetes do tipo I parecem promover as mesmas alterações observadas em seres humanos (ZANOELLO et. al., 2011, AUGHSTEEN, et al, 2006, CHAO et al,1976). No presente estudo, a estreptozotocina foi capaz de promover a síndrome diabética nos animais do grupo D, demonstrada pelo aumento da glicemia em quase três vezes, dois dias após a indução experimental. Ao final do experimento, a diferença de glicemia em relação ao controle superou 3,5 vezes, caracterizando uma exposição à hiperglicemia de muito longa duração. Ademais, dados publicados pelo nosso grupo com o mesmo modelo experimental observaram ao longo do tempo redução no ganho de peso corporal, aumento no consumo de ração (polifagia), polidipsia e poliúria (Hermes-Uliana et al. 2013). A estreptozotocina é a substância mais utilizada para estudar DM tipo 1 em animais (Dias et al., 2004), e tem demonstrando ser um bom modelo para o estabelecimento de DM experimental (Delfino et al., 2002; Szkudelski, 2001; Zanoni et al., 2003). Confirmando a perda de massa apresentada por pacientes ao longo da doença, os animais diabéticos apresentaram índice de caquexia acima de 30%, e perda da massa do músculo gastrocnêmio de 31,5% em relação ao controle. Desta forma, parece razoável inferir que existe predominância de perda de massa magra durante o curso de desenvolvimento da doença.

As complicações sistêmicas ou comorbidades associadas ao diabetes variam de acordo com o tempo de exposição à hiperglicemia. (FORBES; COOPER, 2013). Uma comorbidade extensivamente apresentada por indivíduos diabéticos é a perda de massa muscular. O diabetes do tipo I é capaz de induzir atrofia da musculatura esquelética, que ocorre pelo aumento do catabolismo celular (KRAUSE et al, 2011; LUCIANO; MELLO, 1998). Além do aumento da disponibilização de energia por via anaeróbia, a disponibilização de oxigênio para o músculo esquelético no diabetes também está diminuída. A viscosidade sanguínea por elevação da glicose encontra-se em aumentada, o que dificulta o transporte de oxigênio, e a difusão do mesmo para os tecidos. Outras são as modificações que agravam o quadro de hipóxia muscular, como o espessamento de membrana basal; das proteínas constituintes da parede do vaso com enrijecimento do mesmo; diminuição da atividade do óxido nítrico, das prostaglandinas e aumento da endotelina -1, um potente vasoconstritor (REIS *et al.*, 2008). Este conjunto de alterações metabólicas, juntamente com o aumento de um quadro inflamatório, acabam por contribuir para o aumento do estresse oxidativo sistêmico e tecidual apresentado por pacientes diabéticos.

Evidências apresentadas a partir da metade da década de 90 demonstram que o aumento do estresse oxidativo seria capaz de modular a degradação protéica no músculo estriado esquelético (POWERS, 2010), colaborando para a indução de um quadro de atrofia e astenia em doenças crônicas. No entanto, poucas são as evidências que demonstrem mudança de padrões de estresse oxidativo e modificações adaptativas do músculo esquelético com o tempo, já que o indivíduo permanece doente e apresentando as mesmas comorbidades por muito mais de uma década. Gumieniczek et al. (2001) mostraram diferenças somente no estado antioxidante no músculo esquelético de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina 3, 6 e 12 semanas (84 dias) após a indução. O trabalho demonstrou diminuição de grupos antioxidantes SH, e de ácido ascórbico, além do aumento das atividades das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase até a 12<sup>a</sup> semana após indução.

No entanto, alguns parâmetros não apresentaram diferenças significantes em relação ao controle a partir da 6<sup>a</sup> semana após indução, como a concentração de MDA ou da glutathiona peroxidase. Reis et al. (2008) em sua revisão, mostraram diferentes parâmetros de estresse oxidativo em pacientes expostos a diversos tempos de hiperglicemia (tempo definido a partir do diagnóstico). Em suma, o estresse oxidativo parece exercer seus efeitos tóxicos em estágios precoces da doença, deixando de aparecer em estágios mais avançados (REIS et al., 2008). O fato traz à luz a participação do estresse oxidativo em processos adaptativos e não

somente em mecanismos de lesão celular. Quando a adaptação está estabelecida e o equilíbrio metabólico é alcançado, aparentemente alguns dos parâmetros deixariam de aparecer.

No presente estudo, que utilizou músculo de ratos diabéticos com longa exposição à hiperglicemia (120 dias), não foram encontradas diferenças na concentração de antioxidantes solúveis de baixa massa molecular, lipoperoxidação (MDA ou quimiluminescência estimulada por tert-butil hidroperóxido), carbonilação de proteínas, ou produtos avançados de sua oxidação. No entanto, a quantidade de glutathione reduzida mostrou-se diminuída no músculo dos animais diabéticos sem aumento dos níveis de glutathione oxidada. Trabalhos recentes avaliando concentração de GSH e GSSG muscular em modelos experimentais de doenças crônicas com componentes de perda de massa muscular mostraram diminuição dos níveis de GSH, sem aumento de GSSG. (GUARNIER et al., 2010; BERNARDES et al., 2014). Até o presente momento, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliem a exposição de longa duração à hiperglicemia.

As glutathiones são uma família de enzimas envolvidas em sistemas antioxidantes enzimáticos. A glutathione é sintetizada no citoplasma de todas as células animais, sendo o fígado o órgão mais ativo na produção (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Além do seu importante papel no balanço redox, a GSH é um cofator para diversas enzimas em diversas vias metabólicas. No músculo esquelético, os níveis de GSH e GPx (38 U/mg de proteína) são modestos. No músculo do diabético, a geração de AGE, modificação de estrutura de proteínas, ativação da glicólise e o aumento de espécies radicalares parecem ser fontes importantes de consumo de GSH. Como a direção da GSH pode tomar diferentes rumos, a tradicional relação GSSG/GSH pode não oferecer o resultado esperado quando o estresse oxidativo estiver estabelecido. Mastrocola et al. (2008), em um modelo de diabetes induzido por estreptozotocina verificaram aumento do índice GSSG/GST no músculo de ratos, 21 dias após a indução. Não são encontrados estudos na literatura que avaliem o músculo esquelético em modelos experimentais de longa duração. Em um modelo de 6 semanas de duração, Aragno et al. (2012) encontraram, no músculo esquelético de animais com diabetes induzido por estreptozotocina, níveis aumentados da razão GSSG/GSH (%) 6 semanas (aproximadamente 42 dias) após a indução. Neste estudo, a relação GSSG/2GSH, que refletiria a quantidade de GSSG formada a partir de GSH mostrou-se aumentada nos animais diabéticos. No entanto, esta referência parece refletir o real estado da condição de diminuição de GSH, já que não houve aumento proporcional de GSSG.

O diabetes do tipo I apresenta tipicamente atrofia do músculo esquelético associada ao aumento de morbidade e mortalidade (KELLEHER et al., 2010). Na morfometria quantitativa de ratos não diabéticos e diabéticos pela indução com estreptozotocina, e acompanhados por 30 dias, AUGHSTEEN et al. (2006) verificaram que os músculos dos animais diabéticos apresentavam diminuição no tamanho da fibra muscular, aumento de densidades por unidade de referência de área e conseqüente diminuição do peso do animal. Em um estudo de JERKOVIC et al. (2009) sobre o efeito do diabetes induzido por estreptozotocina sobre a capacidade regenerativa do músculo esquelético 10 dias, 4 e 8 semanas (aproximadamente 56 dias) após indução, os autores mostraram que os animais diabéticos apresentaram perda de peso e atrofia. O processo adaptativo durante a hiperglicemia crônica também induz modificação dos tipos de fibras musculares. Fewell et al., (1995) mostraram diminuição das fibras de contração rápida em músculos de animais diabéticos, 5 semanas (aproximadamente 35 dias) após indução do diabetes experimental. Medina –Sánchez et al. (1994) mostraram aumento das fibras do tipo IIB (glicolíticas) em um modelo de 12 semanas (aproximadamente 84 dias) de indução de diabetes por estreptozotocina. Jerkovic et al. (2009) mostraram em seu modelo de acompanhamento da indução do diabetes por estreptozotocina por 10 dias, 4 e 8 semanas (aproximadamente 56 dias), mudanças da redistribuição das fibras musculares dependente da duração da exposição à hiperglicemia, e afetando todos os tipos de fibras musculares.

CHAO et al., 1978, em estudos sobre as alterações morfológicas e ultraestruturais das células musculares em ratos diabéticos, utilizando modelo de indução por estreptozotocina, por um período de 90 dias até o sacrifício, mostraram troca no padrão de fibras musculares para glicolíticas tipo IIB e diversas alterações morfológicas nas mitocôndrias musculares desses animais. Apesar de não demonstrar experimentalmente mudança do tipo de massa, o presente estudo demonstrou aumento da frequência de fibras de área menor nos animais diabéticos. Esse quadro reforça os achados da literatura que demonstram atrofia precoce. No entanto, parece razoável inferir que a atrofia estabelece-se junto com o estresse oxidativo previamente sofrido, e prevalece, enquanto que o perfil metabólico se estabiliza e as espécies radicalares deixam de ser geradas em períodos mais avançados de hiperglicemia.

Assim, diante do exposto, parece razoável inferir que, após 120 dias de indução do diabetes por estreptozotocina, as mudanças oxidativas tenham deixado de ocorrer. É possível que este estado tenha sido induzido por uma adaptação à demanda metabólica

ocorrida durante o período e que os sistemas de degradação já tenham agido em resposta às modificações e que as proteínas em questão já tenham sido degradadas.

## REFERÊNCIAS

ARAGNO, M. *et. al.* **Obistatin induced recovery of myocardial dysfunction ion type I diabetic rats: underlying mechanisms.** Cardiovascular Diabetology, 11:129, 2012.

AUGHSTEEN, A. A.; KHAIR, A.; SULEIMAN, A. A. **Quantitative morphometric study of the skeletal muscles of normal and streptozotocin-diabetic rats.** JOP, v. 7, n. 4, p. 382-398, 2006.

BERNARDES SS, GUARNIER FA, MARINELLO PC, ARMANI A, SIMÃO AN, CECCHINI R, CECCHINI AL. **Reactive oxygen species play a role in muscle wasting during thyrotoxicosis.** Cell Tissue Res. 2014.

CHAO, T. *et. al.* **Ultrastructural alterations in skeletal muscle fibers of streptozotocin-diabetic rats.** Cell and tissue research, v. 168, n. 2, p. 239-246, 1976.

DELFINO, V., FIGUEIREDO, J. F., MATSUO, T., FAVERO, M. E., MATNI, A. M., MOCELIN, A. J., **Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração.** J. Bras. Nefrol. 24, 31-36. 2002

DIAS, A. S., LLESUY, S., MARRONI, C. A., MARRONI, N., **Gastrointestinal alterations in diabetes mellitus: oxidative stress and blood flow in the superior mesenteric artery-experimental study.** Arq. Gastroenterol. 41, 108-113. 2004

FEWELL J. G., MOERLAND T. S. **Responses of mouse fast and slow skeletal muscle to streptozotocin diabetes: Myosin isoenzymes and phosphorous metabolites.** Molecular and Cellular Biochemistry 148: 147-154, 1995.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. **Mechanisms of diabetic complications.** Physiological reviews, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013.

GUMIENICZEK A. , HOPKAŁA H., WOJTOWICZ Z, NIERADKO M., **Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes,** Clinica Chimica Acta 314 39–45, 2001.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. **Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle.** Free Radical Biology and Medicine, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.

GUARNIER, F. A.; et al. **Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor.** Muscle nerve. v. 42, p. 950-958, 2010.

HARDIN D. S., *et.al.*, **Muscle Group-Specific Regulation of GLUT 4 Glucose Transporters in Control, Diabetic, and Insulin-Treated Diabetic Rats,** Metabolism, Vol42,No 10 (October),1993: pp 1310-1315

HALLIWELL, B.; GUTERRIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford Biosciences, university press, v. 4, 2007.

KELLEHER, A. R.; FAIRCHILD, T. J.; KESLACY, S. **STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF- $\kappa$ B canonical cascade activation.** Acta diabetologica, v. 47, n. 4, p. 315-323, 2010.

KRAUSE, M. P.; RIDDELL, M. C.; HAWKE, T. J. **Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms.** Pediatric diabetes, v. 12, n. 4pt1, p. 345-364, 2011.

JERKOVIĆ, R. *et. al.*, **The effects of long-term experimental diabetes mellitus type I on skeletal muscle regeneration capacity.** Collegium antropologicum, v. 33, n. 4, p. 1115-1119, 2009.

LOWRY, O. H.; et al. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** The journal of biological chemistry, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. D. **Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais.** Revista Paulista de Educação Física, v. 12, n. 2, p. 202-209, 1998.

MASTROCOLA, R. et al. **Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress.** Free Radical Biology and Medicine, v. 44, n. 4, p. 584-593, 2008.

MEDINA-SÁNCHEZ M. *et.al.*, **Effect of streptozotocin-induced diabetes and islet transplantation in proximal skeletal muscle: a histochemical and morphometric analysis.** The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 1994, 123(6):921-929

OLIVEIRA, F.J.A.; CECCHINI, R.; **Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania chagasi***, J. Parasitol. v. 86, p. 1067–1072, 2000.

POWERS, S. K. *et. al.*, **Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation**, Exp Physiol 95.1 pp 1–9, 2010.

REIS, J. S. *et. al.* **Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1**. Arq. bras. endocrinol. metab, v. 52, n. 7, p. 1096-1105, 2008.

REPETTO, M. *et al.* **Oxidative stress in blood of HIV infected patients**. Clinica chimica acta, v. 255, n. 2, p. 107-117, 1996.

REZNICK AZ, PACKER L. **Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay**. Meth Enzymol 1994;233:357–363.

SHAW J.E. , SICREE R.A. , ZIMMET P.Z. **Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030**, Diabetes Research and Clinical Practice Volume 87, Issue 1, Pages 4–14, 2010

SZKUDELSKI, T., **The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas**. Physiol. Res. 50, 537-56. 2001

TIETZE, F. **Enzymic method for quantitative determination of nanogram mounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues**. Anal biochem, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.

WITKO; V. *et al.* **Advanced oxidation protein products as a novel merker of oxidative stress in uremia**. Kidney international, v. 49, p. 1304-1313, 1996

ZANOELLO, A. M. *et. al.*, **Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra Diabetes Mellitus induzido por aloxano em ratos**. Acta Farmacéutica Bonaerense, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2002.

ZANONI, J.N., BUTTOW, N.C., BAZOTTE, R.B., MIRANDA-NETO, M.H.,. **Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin- diabetic rats treated with ascorbic acid**. Auton. Neurosci. 104, 32-38. 2003.

<i>Grupo</i>	<i>Glicemia pós-indução</i>	<i>Glicemia Final</i>	<i>Índice de Caquexia</i>	<i>Gastrocnêmio</i>	
	<i>(mg/dL)</i>	<i>(mg/dl)</i>		<i>Massa</i>	<i>Varição</i>
				<i>(mg)</i>	<i>(%)</i>
<i>N</i>	-	148,30 ± 2,36	-	1647 ± 81,2	-
<i>D</i>	425 ± 41,87	543,30±23,06*	36,71 ± 1,49	1127 ± 101,0	-31,6%

**Tabela 1. Caracterização do diabetes induzido por estreptozotocina e do comprometimento da massa muscular.**

N – Grupo de animais (n = 9) normoglicêmicos, acompanhados por 120 dias; D – grupo de animais (n = 9) que sofreu indução experimental de diabetes por estreptozotocina (35 mg/kg e.v.) e foi acompanhado por 120 dias. Índice de caquexia = (massa inicial – massa final + ganho de massa do grupo controle) / (massa inicial – ganho de massa do grupo controle) x 100%. Valores expressos em média ± EP. \*p<0,05 em relação ao grupo controle utilizando teste t de student para dados não pareados. Valores negativos indicam perda quando comparados ao controle.

<i>Grupo</i>	<i>Normoglicêmicos</i>	<i>Diabéticos</i>
<i>MDA (nmol/100g de tecido)</i>	0,340 ± 0,19	0,404 ± 0,22
<i>CAT (uM trolox)</i>	30,92 ± 11,09	30,21 ± 10,69
<i>Área sob a curva de QL (Unidades Relativas de Luz<sup>2</sup>)</i>	13562 ± 9325	7861 ± 2511
<i>Proteínas Carboniladas (nmol/mg de proteínas totais)</i>	0,072 ± 0,06	0,113 ± 0,10
<i>AOPP (nmol cloramina T/mg de proteínas totais)</i>	9,93 ± 0,01	10,6 ± 0,01

**Tabela 2. Níveis das variáveis relacionadas ao estresse oxidativo no músculo esquelético de ratos diabéticos, 120 dias após a indução por estreptozotocina.**

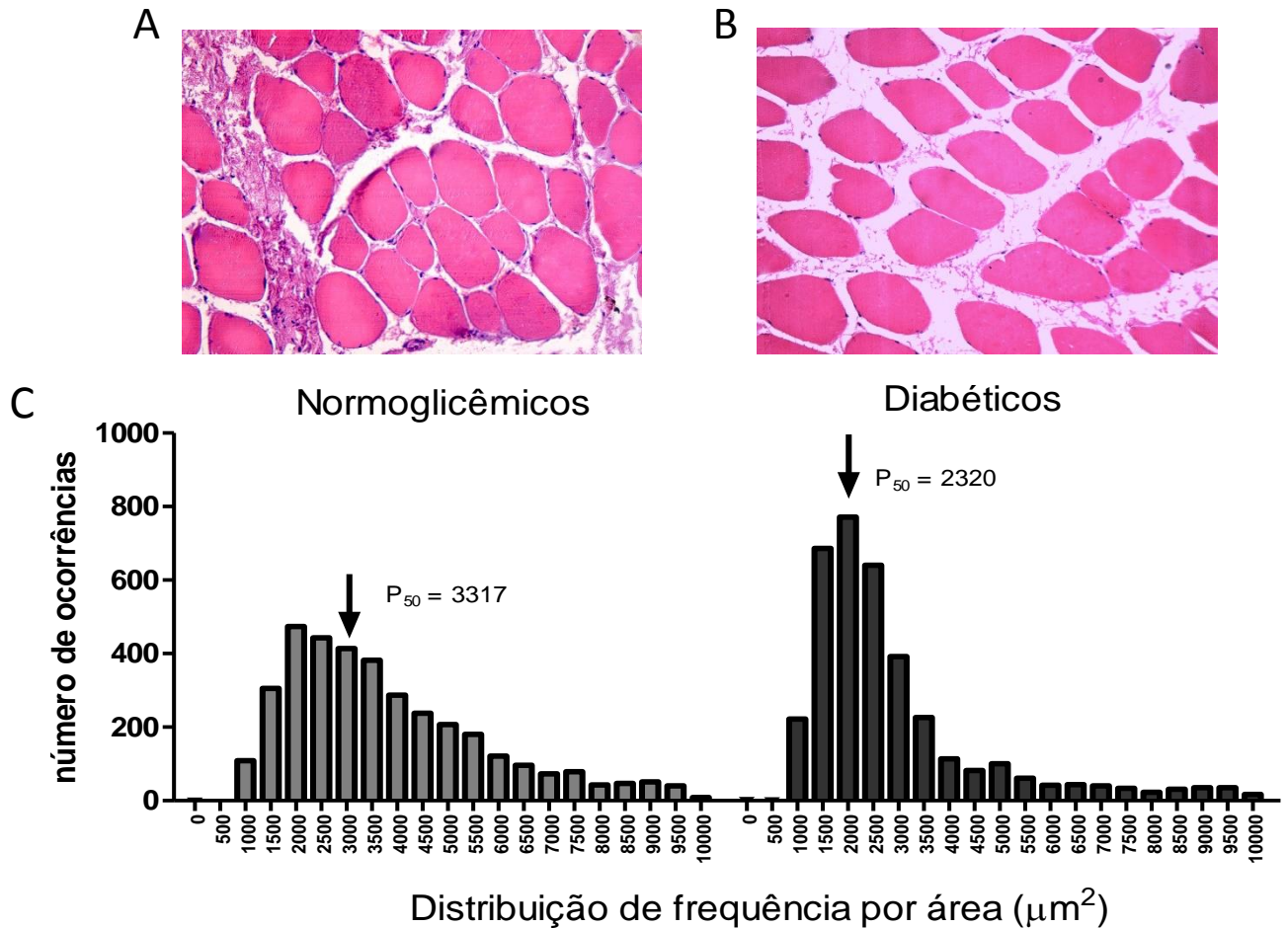
Grupo normoglicêmicos (n = 9), acompanhados por 120 dias; grupo diabéticos (n = 9) que sofreu indução experimental de diabetes por estreptozotocina (35 mg/kg e.v.) e foi acompanhado por 120 dias. Valores expressos em média ± EP.

<i>Grupo</i>	<i>Normoglicêmicos</i>	<i>Diabéticos</i>
<i>GSH (umol/mg de proteína)</i>	8,36 [4,37–16,66]	0,48 [0,44–0,53]*
<i>GSSG (umol/mg de proteína)</i>	0,056 ± 0,006	0,040 ± 0,005
<i>GSSG/2GSH</i>	0,033 [0,022–0,061]	0,280 [0,122–0,509]*

**Tabela 3. Níveis de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada oxidativo no músculo esquelético de ratos diabéticos, 120 dias após a indução por estreptozotocina.**

Grupo normoglicêmicos (n = 9), acompanhados por 120 dias; grupo diabéticos (n = 9) que sofreu indução experimental de diabetes por estreptozotocina (35 mg/kg e.v.) e foi acompanhado por 120 dias. Valores expressos em média ± EP. \*p<0,05 em relação ao grupo controle utilizando teste t de student para dados não pareados.

Figura 1



**Figura 1.** Diferenças histológicas e morfométricas em músculo esquelético de ratos 120 dias após indução de diabetes por estreptozotocina. (A) animal normoglicêmico (N): acompanhado por 120 dias; (B) animal inoculado e.v. com streptozotocina 35 mg/kg e acompanhado por 120 dias. Os animais foram sacrificados após o período, o músculo foi colhido, fixado, incluído em parafina e corado com hematoxilina e eosina. As imagens representam aumento de 200x. (C) Histograma de distribuição de frequência da área de secção transversa dos músculos gastrocnêmios, que foram seccionados em cortes semi-seriasdo/lâmina (50 µm de intervalo entre cada corte). 3 campos por corte foi capturado em fotomicrografias, e 20 áreas de secção transversa tiveram sua área medida/campo/animal, totalizando 600 medidas por animal. Os valores foram agrupados em N ou D, e a distribuição de frequência determinada.