

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Laura Reck Cechinel

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO EM AMBIENTE AQUÁTICO OU
TERRESTRE SOBRE MARCADORES DE ESTADO OXIDATIVO EM PLASMA
DE PACIENTES DIABÉTICOS**

Porto Alegre

2013

Laura Reck Cechinel

**EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO EM AMBIENTE AQUÁTICO OU
TERRESTRE SOBRE MARCADORES DE ESTADO OXIDATIVO EM PLASMA
DE PACIENTES DIABÉTICOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Biomedicina

Orientadora: Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Porto Alegre

2013

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.*

As facilidades nos impedem de caminhar.

Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, por todo apoio desde sempre, por acreditarem em mim, em especial minha mãe, heroína que me deu incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

A Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas em todos os momentos.

A minha orientadora Ionara, pela dedicação e conhecimento que foi transmitido ao longo dos anos de iniciação no laboratório.

A todos que passaram pelo laboratório de neuropsicofarmacologia,
muito obrigada por todo apoio, carinho, amizade.

Encontrei no laboratório amigos que me transmitiram muito mais do que conhecimento e que contribuíram muito para eu chegar aqui.

Meu agradecimento especial as melhores colegas que poderia ter encontrado,
grandes amigas que me acolheram desde meu primeiro dia de aula e
até hoje estão ao meu lado. Estes quatro anos
não teriam passado tão rápido se não fossem vocês.

Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Atividades Aquáticas e Terrestres da Faculdade de
Educação Física, pela parceria que foi fundamental para realização do trabalho,
ao Rodrigo pela disponibilidade e auxílio quando precisei.

Agradeço a todos os pacientes envolvidos no estudo pela paciência e confiança depositada em
nosso trabalho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	5
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Aspectos epidemiológicos da população	7
1.2. Diabetes Mellitus	7
1.3. Estado Oxidativo	9
1.4. Exercício Físico	12
1.5. Objetivos	15
1.5.1. Objetivo Geral	15
1.5.2. Objetivos Específicos	15
2. TRABALHO EXPERIMENTAL.....	16
2.1. Artigo Científico.....	16
3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
5. ANEXOS	37
5.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	37

RESUMO

O Diabetes Mellitus, em especial o tipo 2 (DMT2), é uma doença metabólica crônica associada a inúmeras comorbidades e complicações. Estudos recentes têm associado às complicações relacionadas ao diabetes a um estado de desequilíbrio entre as defesas antioxidantes do organismo e as espécies reativas circulantes. Atualmente propõe-se o uso de estratégias não farmacológicas a fim amenizar os sintomas do DMT2. O exercício físico vem ganhando um papel de grande destaque entre estas estratégias. No entanto estudos que avaliem os efeitos bioquímicos e fisiológicos do exercício físico nesta população ainda são escassos, principalmente em ambiente aquático. A partir disso o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do exercício em ambiente aquático ou terrestre sobre marcadores de estado oxidativo em plasma de pacientes diabéticos. Para tanto foram selecionados 24 indivíduos diabéticos tipo 2, sedentários, de ambos os sexos, para participarem de 12 semanas de treinamento aeróbio. Os indivíduos foram divididos em grupo terra ou grupo água e os protocolos mantiveram periodização de treinamento similar. As coletas das amostras foram realizadas antes e após a primeira e última sessão de treinamento. A partir destas amostras foram analisados diversos marcadores de estado oxidativo. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas tanto no grupo água quanto no grupo terra em parâmetros oxidativos como: conteúdo de radicais livres, substâncias fluorescentes solúveis em água e a oxidação de resíduos de aminoácidos. A atividade da superóxido dismutase e o potencial antioxidante total também não foram alterados. Apesar disso, foi possível observar que o ambiente no qual o treinamento é realizado pode sim impactar diferentemente na resposta obtida uma vez que os níveis de isoprostanos se mostraram reduzidos somente no grupo que realizou o exercício em terra. Embora os resultados obtidos tenham revelado somente efeito do treinamento em terra, não podemos excluir os efeitos benéficos da água sobre estes indivíduos. Podemos sugerir que o ambiente aquático possa estar envolvido na modulação de

outros mecanismos fisiológicos. Os dados obtidos suportam a ideia de que o exercício com intensidade similar, variando somente o ambiente de treinamento, possa alterar diferentemente os níveis de isoprostanos em indivíduos diabéticos tipo 2.

Palavras-chave: Água, terra, diabetes tipo 2, estado oxidativo, isoprostanos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos epidemiológicos da população

A população latino-americana está passando por mudanças em seu perfil demográfico. Nas últimas décadas houve uma diminuição na mortalidade e no número de nascidos vivos, além de um aumento na expectativa de vida. Estes fatores contribuem para o envelhecimento da população e consequente aumento da prevalência de doenças crônico-degenerativas, como diabetes, hipertensão, doenças cardíacas, osteoporose, dislipidemias, entre outras (1, 2).

As mudanças no estilo de vida da população estão relacionadas ao aumento da incidência de obesidade e sedentarismo, os quais constituem importantes fatores de risco para inúmeras doenças (3). O diabetes está entre as comorbidades com maiores taxas de crescimento entre a população. É uma condição epidêmica sem cura descrita e a causa de índices elevados de mortalidade no país (4).

1.2. Diabetes Mellitus

Doença caracterizada como uma desordem metabólica de etiologia múltipla onde os níveis glicêmicos estão, normalmente, descontrolados podendo levar a uma hiperglicemia crônica, distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, decorrentes de uma secreção ou ação insuficiente da insulina nos tecidos alvo (5, 6).

O número de indivíduos com Diabetes Mellitus (DM) cresce em grandes proporções, segundo um estudo da Federação Internacional de Diabetes, o Brasil ocupa a 4ª posição entre os países com maior prevalência de diabetes. Ainda segundo este estudo, o número de pessoas portadoras da enfermidade atinge os 13,4 milhões, o que corresponde a 6,5% da população entre 20 e 79 anos de idade (7). Além disso, o DM é a sexta causa de diagnóstico primário em internação hospitalar, contribuindo também para outras causas de internação como as doenças cardiovasculares (8).

A doença se manifesta de duas formas, o diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) e o diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). O diabetes tipo 1 é caracterizado por deficiência parcial ou total de insulina causado por destruição autoimune das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, tornando os indivíduos insulino dependentes. Já o tipo 2, se caracteriza por resistência à insulina e consequente inabilidade dos tecidos (músculo, tecido adiposo e fígado) captarem a glicose (6, 9), dentre os pacientes diagnosticados no Brasil, 90% são de DMT2. Os principais fatores de risco são: idade acima dos 50 anos, obesidade/sobrepeso, sedentarismo e histórico familiar. Acredita-se que o DMT2 ocorra em pessoas geneticamente predispostas que estejam sujeitadas a uma série de influências ambientais que precipitam o início da doença clínica (6, 10).

O diagnóstico da DMT2 é complexo, pois as alterações metabólicas não são graves e não ocorrem abruptamente como no DMT1, dificultando a identificação dos sintomas pelo próprio paciente. Um dos principais sintomas da DMT2 é a hiperglicemia. Sendo os níveis de glicose sanguínea utilizados no diagnóstico da doença, através da medida da glicemia em jejum e do teste oral de tolerância à glicose. Para a confirmação do diagnóstico são necessárias concentrações superiores à 126mg/dL em mais de uma repetição do teste de glicemia em jejum, e concentrações maiores que 100 mg/dL no teste oral de tolerância à glicose, uma vez que valores menores excluem a possibilidade da doença (10). A glicemia em pacientes diabéticos pode alcançar níveis de até 400 mg/dL e sua sintomatologia inclui poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva (9, 11).

As complicações vasculares compreendem as patologias mais comumente associadas ao DMT2, que envolvem disfunções no endotélio micro e macro vascular. Estas disfunções incluem alterações inflamatórias na parede do vaso, modificando a regulação da vasodilatação e vasoconstrição, da angiogênese e promovendo um aumento na expressão de moléculas de

adesão, citocinas e quimiocinas. Ainda observam-se alterações na função plaquetária e anticoagulante, fatores associados a doenças cardiovasculares (4, 12, 13).

As complicações microvasculares podem levar ao aparecimento de retinopatias, lesões que iniciam com microaneurismas na retina e com a progressão da doença podem evoluir para amaurose (14). Além disso, entre as complicações microvasculares estão as nefropatias, responsáveis por mais da metade dos pacientes que necessitam de hemodiálise (15). E ainda, as neuropatias, definidas como disfunções em nervos periféricos as quais são a causa de 50% das amputações não traumáticas (16). Ao contrário das complicações macrovasculares caracterizadas pela aterosclerose e tromboembolismo, que podem acometer os pacientes nos estágios iniciais, as complicações microvasculares aparecem de forma silenciosa com a progressão da doença (17). Estas complicações vasculares podem ser favorecidas pelo estado de hiperglicemia crônica, no entanto outros distúrbios sistêmicos têm sido associados com a progressão destes agravantes (14).

Inúmeros estudos têm atribuído um papel fundamental do estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão do DM e suas complicações (18). Além disso, níveis elevados de marcadores de estresse oxidativo têm sido observados em pacientes diabéticos (19).

1.3. Estado Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas e os mecanismos de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (20). As espécies reativas são átomos ou moléculas que contém um elétron desemparelhado em sua camada mais externa, caracterizadas por grande instabilidade e elevada reatividade (21). O radical ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($HO\bullet$) estão entre as espécies reativas mais bem descritas (22, 23).

No diabetes, a hiperglicemia crônica parece estar intimamente relacionada ao aumento das espécies reativas, através da produção dos ânions superóxido pela mitocôndria (24), no processo de fosforilação oxidativa (25) e a partir da oxidação da glicose. A glicose é oxidada em uma reação dependente de metais de transição como o cobre e o zinco, formando um ânion que é convertido em cetoaldeído e radical superóxido (O_2^-). O ânion superóxido é transformado em peróxido de hidrogênio, o qual se não degradado pela enzima catalase ou glutathione peroxidase, entre outras, pode levar a produção de radicais hidroxila na presença de metais de transição (19). Além da oxidação da glicose, a glicação não enzimática de proteínas e a ativação das proteínas quinase C também podem ser associadas ao aumento dos radicais livres no diabetes (26). Além disso, outras vias metabólicas importantes estão ativadas durante a produção de superóxido induzida por altos níveis glicêmicos, entre elas o aumento da atividade da via de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), ativação da isoforma proteína quinase C (PKC) e o aumento no fluxo das hexosaminas (19, 25).

A partir desta formação excessiva de espécies reativas, as moléculas biológicas, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos, tornam-se suscetíveis aos danos causados pelo estado oxidativo (21). Entre os aminoácidos, os resíduos aromáticos são os principais alvos de oxidação pelas espécies reativas, resíduos de tirosina e triptofano podem ser oxidados deliberadamente (27). O processo pelo qual as membranas biológicas são atacadas chama-se lipoperoxidação, o qual se caracteriza por uma série de reações em cadeia classificadas da seguinte forma: etapa de iniciação, de propagação e de terminação. A lipoperoxidação pode levar à perda da seletividade da membrana na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e formação de produtos citotóxicos (22).

No organismo, os fosfolipídeos presentes na membrana podem ser hidrolisados pela enzima fosfolipase, gerando ácido araquidônico, o qual pode ser oxidado através de uma via

enzimática, envolvendo as ciclooxigenases e/ou as lipoxigenases. Ainda, podem ser oxidados por uma via não enzimática, através da ação de espécies reativas de oxigênio, metais de transição ou outras espécies reativas, gerando 4-hidroxinonal, o malondialdeído e os isoprostanos que podem ser utilizados como marcadores do dano lipídico em membranas biológicas (28). Entre os produtos finais da lipoperoxidação, os isoprostanos são os mais estáveis e a análise dos seus níveis no plasma ou urina permitem uma detecção sensível de dano lipídico (29).

Para evitar ou controlar o dano causado pelas espécies reativas, como a oxidação dos resíduos de aminoácidos ou a lipoperoxidação, o organismo dispõe de um sistema de defesa, o qual inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Entre os mecanismos enzimáticos, destacam-se as enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (SOD). Já os mecanismos não enzimáticos são compostos por vitaminas A, C, E, ácido úrico, glutathione, entre outros (30). Estas defesas podem agir tanto como detoxificadoras das espécies reativas antes que elas causem dano quanto no reparo da lesão causada.

A superóxido dismutase age na detoxificação das espécies reativas, em particular do ânion superóxido, convertendo o superóxido em peróxido de hidrogênio. São uma família de enzimas que podem ser classificadas de duas maneiras, a SOD-manganês e a SOD-cobre-zinco, encontradas na mitocôndria e distribuídas pelo citoplasma, respectivamente (31). A atividade desta enzima pode ser alterada em situações de estresse oxidativo, a SOD-Mn, por exemplo, tem sua atividade aumentada uma vez que se encontra na mitocôndria, local onde a produção do radical superóxido ocorre em grande escala (32). Apesar de todos estes mecanismos, em algumas situações a produção de radicais livres supera as defesas oxidantes, levando ao estado oxidativo, encontrado em pacientes diabéticos.

Além de tratamentos farmacológicos, têm-se promovido a busca por terapias alternativas, como o exercício físico, que alterem o modo de vida do indivíduo e promovam uma melhora no estado oxidativo e conseqüentemente nas complicações pós-diabetes (33).

1.4. Exercício Físico

Atualmente, o estilo de vida sedentário acompanhado pela maior disponibilidade de alimentos tem levado a um aumento na prevalência de patologias como obesidade, síndrome metabólica e diabetes. As mudanças nos hábitos de vida que ocorreram ao longo do desenvolvimento da sociedade contemporânea, principalmente a diminuição na atividade física, estão relacionadas ao aumento na prevalência do diabetes, principalmente o DM2.

Neste contexto, diversos estudos já indicaram uma relação inversa entre o condicionamento físico e os riscos de desenvolver ou agravar a condição diabética (34). Portanto, programas de exercício físico regular têm sido utilizados como adjuvantes à terapia farmacológica para o controle das manifestações do diabetes. Apesar da grande disponibilidade de resultados comprovando os efeitos benéficos do exercício sobre o controle do diabetes, mais de 80% destes pacientes não realizam a atividade física adequada, em relação à intensidade e tipo de treinamento, deixando de obter o máximo de benefícios possíveis (35).

Muitos pesquisadores têm focado seus esforços para elucidar os mecanismos pelos quais o exercício físico exerce seus benefícios sobre os pacientes diabéticos (36, 37). Já foram propostos diversos benefícios do exercício principalmente em fatores relacionados ao controle glicêmico como o aumento da sensibilidade à insulina e captação da glicose, contribuindo para uma melhor qualidade de vida destes pacientes. Ainda, tem sido demonstrado um papel do exercício na detoxificação de espécies reativas (21, 38) melhora nos parâmetros cardiorrespiratórios, pressão arterial e diminuição de gordura visceral, entre outros. Em

relação ao controle glicêmico. Achados recentes mostram que apenas uma sessão de treinamento pode aumentar a tolerância e a captação de glicose em torno de 40% (39). Apesar destes estudos demonstrarem os efeitos benéficos do exercício em pacientes diabéticos, cabe ressaltar a importância de fatores como duração e a intensidade do treinamento, já que diferentes respostas têm sido observadas conforme o protocolo de exercício utilizado (40).

A melhora observada em consequência do exercício ocorre normalmente após períodos crônicos de treinamento regular de intensidade moderada ou após um treinamento de alta intensidade, correspondente a 70-80% do consumo máximo de oxigênio ($VO_2Máx$). Ainda que exercícios de baixa intensidade possam provocar alterações nos parâmetros metabólicos, é necessário atingir ao menos o limiar mínimo para que ocorra uma melhora na resistência cardiorrespiratória, no mínimo 50% do $VO_2Máx$ (9).

A hipótese de que diferentes protocolos de treinamento alterem as respostas obtidas já foi confirmada em diversos estudos utilizando modelos animais. Um estudo demonstrou que animais diabéticos submetidos à atividade física durante 6 semanas apresentaram melhora no perfil lipídico e glicêmico, ao contrário de outro estudo onde a sessão aguda de exercício não alterou a insulinemia em animais diabéticos (41, 42).

Em humanos, diferentes respostas são encontradas, em relação ao exercício, conforme tipo, protocolo, intensidade, variando também em resposta ao ambiente de treinamento, seja em água ou em solo. Os resultados presentes na literatura, em sua maioria, correspondem ao treinamento realizado em ambiente terrestre, uma vez que é o modo de treinamento mais comum entre os pacientes, facilitando a coleta de dados. No entanto, o treinamento aquático vem sendo muito recomendado por inúmeros autores para indivíduos idosos, obesos, com lesões em membros ou coluna por ser um exercício de baixo impacto contribuindo assim, para diminuição das chances de lesão. Além de ser um exercício de baixo impacto, o treinamento

aeróbico aquático pode melhorar o condicionamento físico dos indivíduos em níveis semelhantes aos obtidos no treinamento em solo (40).

Além disso, a intensidade e/ou tipo de exercício influenciam diretamente no padrão de respostas obtidas para os marcadores de estado oxidativo. Tem se inferido que o exercício agudo possa induzir estresse oxidativo celular, e que o exercício crônico promove uma adaptação do organismo ao estímulo, aumentando, assim, as defesas antioxidantes (37, 43).

Alguns autores já demonstraram o efeito do exercício físico realizado em solo sobre parâmetros de estado oxidativo. Oliveira e colegas (2012) mostraram um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase e catalase em pacientes diabéticos submetidos ao treinamento aeróbico terrestre (43). No entanto, estudos avaliando o efeito do treinamento aeróbico em água na população diabética são escassos. A água impõe diferenças hemodinâmicas interessantes que já puderam ser observadas em parâmetros cardiovasculares, como o aumento do débito cardíaco devido a uma redução da resistência periférica total ao fluxo sanguíneo (44). No entanto, não existem trabalhos relacionando o exercício físico realizado em diferentes meios como, por exemplo, na terra ou na água, e parâmetros de estado oxidativo em pacientes diabéticos.

Considerando as diferentes características hemodinâmicas da água em relação ao solo e as alterações cardiovasculares que o exercício físico realizado em água promove, nossa hipótese de trabalho é que o exercício aquático e terrestre modulem diferentemente os parâmetros plasmáticos de estado oxidativo em pacientes diabéticos.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do exercício em ambiente aquático ou terrestre sobre marcadores de estado oxidativo em plasma de pacientes diabéticos.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o conteúdo de espécies reativas
- Avaliar o dano em macromoléculas, lipídeos e proteínas.
- Avaliar a capacidade antioxidante, através da atividade da SOD e a capacidade antioxidante total.

2. TRABALHO EXPERIMENTAL

2.1. Artigo Científico

Intenção de submissão após uma investigação mais aprofundada para a revista:

Medicine & Science in Sports & Exercise

Aquatic and dry land training exercise protocols alter differently isoprostane levels in diabetic patients

Laura Reck Cechinel^a, Arthiese Korb^b, Louisiana Carolina Ferreira Meirelles^b, Carla Basso^a, Felipe Moysés^b, Viviane Elsner^b, Gisele Agustini Lovatel^d, Rodrigo Sudatti Dellevatti^e, Luis Fernando Martins KrueI^e, Ionara Rodrigues Siqueira^{*a,b}

^aDepartamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^bPrograma de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas; ^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^dFaculdade de Fisioterapia, Ararangua, Universidade Federal de Santa Catarina; ^ePrograma de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

*Corresponding author: Ionara Rodrigues Siqueira. Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; e-mail: ionara@ufrgs.br.

Abstract

Introduction: Exercise is known to be the best non-pharmacological intervention to prevent the type 2 diabetes mellitus symptoms. However, the physiological effect of different environments where exercise is conducted in diabetic patients yet remains poorly understood. Here, we investigated the effect of water and dry land aerobic exercise, with similar training periodization on the plasma oxidative parameters of diabetic patients. **Methods:** Twenty-four type 2 diabetic, sedentary individuals, both man and women, participated in 12 weeks of aerobic training. The subjects were divided in dry land group (n=13) or water group (n=11) and realized protocols with similar training periodization. **Results:** Both water and dry land did not induced significant changes in the content of free radicals, water-soluble fluorescence substances, the damage to macromolecules and the antioxidant parameters (SOD activity and total antioxidant potencial). However, we observed that the environments can indeed impact differently the biochemical outcomes. Our results showed a significant reduction on isoprostane levels only on dry land. **Conclusion:** Despite these results, we did not exclude the beneficial effect of water exercise. We can suggest that the water exercise might impact positively on different systems, acting for example in cardiovascular regulatory mechanisms. We also, did not support the idea that acute exercise session would induce increases in reactive species levels, due to the fact the in both environment the acute session did not augmented any parameter. Our data can suggest that similar exercise protocols with only environments being the main distinction among them, may impact differently the isoprostane levels in diabetic patients.

Key Words: TYPE 2 DIABETES MELLITUS, AEROBIC TRAINING, AQUATIC ENVIRONMENT, LAND ENVIRONMENT, OXIDATIVE STATUS

Paragraph Number 1 Introduction. Diabetes is a chronic metabolic disorder associated with numerous comorbidities and complications. Nowadays the involvement of oxidative stress in the development and progression of diabetes in its complications is widely accepted (5, 21). Several studies have demonstrated that hyperglycemia induces an excessive production of reactive species, resulting in oxidative stress in pancreatic β -cells (17). It is important to note that the imbalance between reactive species levels and scavenging systems activity may induce oxidative damage directly to biological molecules (14).

Paragraph Number 2. Exercise has been considered the most effective non pharmacological approach to prevent, as well as to treat, type 2 diabetes mellitus (T2DM). However there is growing evidence that the different training environment can also impact functional and physiological responses, works evaluating the effects of exercise training on diabetic patients in the aquatic environment are rare.

Paragraph Number 3. Although the exercise effect has been linked to oxidative status in diabetic patients (22), controversial results have been described (28), pointing to a rather complex relationship to link diabetes-induced oxidative stress with the exercise effects. It has been proposed that this beneficial effect is related to training-induced adaptations in cellular antioxidant status, since it has been suggested that acute exercise increases reactive species production (2, 22). However the effect of exercise and the environment where it is conducted on oxidative status in diabetic patients remains poorly understood.

Paragraph Number 4. Interestingly, various lipid peroxidation products, such as alkanes (mainly ethane and pentane), isoprostanes and a variety of aldehydes, including malondialdehyde, can be generated in biological samples (20). Several works demonstrated the modulation of exercise on lipid peroxidation in T2DM using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, a measurement of malondialdehyde, which is non-specific, since compounds, as aldehydes and bilirubin can react with TBA to form similar complexes. Blood

TBARS levels are reduced by aerobic exercise training (15, 30), however others authors did not find this outcome (6). Brinkmann and colleagues (2012) (4) studied erythrocyte isoprostane content in overweight/obese T2DM men and overweight/obese non-diabetic control subjects during acute exercise. However, to our knowledge there are no studies reporting the impact of exercise on water-soluble fluorescent substances in diabetic patients.

Paragraph Number 5. Therefore, the purpose of this study was to analyze the effects of exercise protocols performed in aquatic and land environments on parameters of oxidative status, reactive species content, damage to macromolecules as well as the antioxidant capacity in diabetic patients. Moreover, we also investigated the acute and chronic effects of exercise.

*Paragraph Number 6. **Material and methods. Subjects.*** The patients were selected non-randomly, as volunteers. The recruitment of the subjects was carried out by advertisement in a newspaper of general circulation. 24 patients (55-64 years) diagnosed with T2DM, including men and women, were divided into water and dry land groups. A written informed consent to participate in the study was provided by all participants after the volunteers were informed of all risks, discomforts, and benefits involved in the study. The procedures were in accordance with the guidelines and regulations for research involving human subjects, especially the resolution 196/96, from the Brazilian National Health Council (Conselho Nacional de Saúde, CNS). The Local Ethics Committee (CEP/UFRGS) approved the protocol of this study (nr. 108997).

*Paragraph Number 7. **Training.*** The exercise consisted in interval aerobic-training performed in water and on dry land. Sessions were realized 3 times a week during 12 weeks. The intensity of the exercise was determined by the second ventilatory threshold (VT2), obtained through maximal effort test. The intensity varied over the weeks as the following: week 1-3, 7cycles (3 min 85 - 90% VT2 and 2min <85% VT2); week 4-6, 7 cycles

(4 min 85 - 90% VT2 and 1min <85% SV2); week 7-9, 7cycles (4 min 90 - 95% VT2 and 1min <85% VT2); 10-12, 7 cycles (4 min 95 - 100% VT2 and 1min <85% VT2). Both programs had similar training periodization, with training environment being the main difference between them. The blood was drawn before and after the first and last exercise session in order to evaluate the acute and chronic effects of exercise.

*Paragraph Number 8. **Blood samples.*** Whole blood (4 mL) was collected in tubes containing K₃EDTA, an anticoagulant. The samples were centrifuged at 1500 x G at 4°C for 10 min. Plasma was collected, aliquoted and frozen at -80°C prior to biochemical determinations were performed.

*Paragraph Number 9. **Assays.*** Plasma indices of oxidative status were estimated in terms of reactive species content, macromolecules damage and antioxidant defenses. To evaluate the reactive species content it was used 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe (19). The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 525 nm, respectively (8, 25). The lipid peroxidation was estimated by 8-isoprostanes level and water-soluble fluorescent substances determinations. The 8-isoprostanes content was determined using 8-Isoprostanes EIA kit (Cayman Chemical Company, USA) according to the manufacturer's instructions (23). The plasma fluorescent adducts formed between peroxidation-derived aldehydes and plasma proteins were monitored fluorimetrically, as described by Tsuchida et al. (26). The fluorescence exhibited by adducts was monitored at 350 nm excitation and 460 nm emission. Oxidative modification of proteins occurs predominantly in specific residues or sequences susceptible. The intrinsic tryptophan fluorescence was determined at excitation and emission wavelengths of 280 and 345 nm, respectively (13) and intrinsic tyrosine fluorescence, the excitation and emission wavelengths were 277 and 320nm, respectively (3).

Paragraph Number 10. The total reactive antioxidant potential and superoxide dismutase (SOD) activity were also measured. The superoxide dismutase (SOD) activity was determined using a RANSOD kit (Randox Labs., USA) according to the manufacturer's instructions. Total reactive antioxidant potential (TRAP) is based on DCF oxidation induced by peroxy radicals. The reaction mixture contained 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) as the source of peroxy radicals. The DCF oxidation in the presence of ABAP and serum were measured at 504 nm during 120 minutes. Trolox (8.4 $\mu\text{mol/l}$) was used as an internal standard (27).

Paragraph Number 11. Statistics Analyses. All results were expressed as mean \pm S.D. The results were analyzed by One-Way Analysis of Variance (ANOVA). In all tests, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Paragraph Number 12. Results. Acute and chronic exercise protocols in the water or in dry land group did not change reactive species content and in diabetic patients (Table 1). To analyze the oxidative damage in lipids we evaluated the water soluble fluorescence substances which were unaltered and the 8-isoprostanes levels. In this parameter the ANOVA shows an effect of exercise in the dry land group, where the chronic exercise protocol reduced the levels of 8-isoprostane in diabetic patients after training when compared to the measurement before acute exercise and before chronic training ($p < 0.05$; Table 2). However, the exercise performed in aquatic environment was unable to alter this parameter (Table 2). Both protocols acute and chronic exercise in the water or in dry land group did not change of tryptophan and tyrosine residues, an index of damage in proteins in diabetic patients (Table 3). The results of total antioxidant capacity and the SOD activity can be seen in Table 4. The evaluated antioxidant parameters were unchanged by acute or chronic training in aquatic or land environments.

Paragraph Number 13. Discussion. We provide the first evidence for relationship between environments where exercise is conducted and their physiological effects in diabetic patients. A novel finding that emerged from our study was the positive effect of dry land exercise on oxidative status, observed by the 8-isoprostanes levels in diabetic patients. This result can suggest that protocols with similar training periodization (reflected by time, intensity and frequency factors) performed in different environments may impact differently the biochemical outcomes. Besides, our results, do not exclude the beneficial effects of water exercise it indicates an important role on isoprostane levels of exercise in dry land, without any effect of water environment. The water exercise imposes less mechanical stress due to water pressure, recruitment of different muscles and reduced effects of gravity (9). The immersion *per se* leads to an augment of the central blood flow, as a result of the blood redistribution and extracellular fluid from the inferior members to the central region, causing the elevation o blood pressure and so reduced heart frequency (29). Moreover, immersion promotes a supression of renin-angiotensin system, which has an important role on development and progression of T2DM (7, 11, 24). We might propose that water exercise impact positively on different systems, acting for example in cardiovascular regulatory mechanisms. Accordantly, the variety of outcomes obtained in water and dry land exercise has been described (18). Kanitz and colleagues (2010) (16) observed differences in the cardiorespiratory responses in healthy women induced by exercise performed in water and dry land (16).

Paragraph Number 14. Although exercise has been linked to modulations on oxidative status in diabetic patients or other pathological conditions, our findings did not support the hypothesis that the acute exercise session would induce increases in reactive species levels and, in addition, that training-induced adaptations might be protective through serum oxidative status in diabetic patients, since we did not find any significant differences in

several oxidative status parameters, reactive species content, water soluble fluorescence substances, protein oxidative damage and antioxidant capacity.

Paragraph Number 15. Considering that Gordon and colleagues, (2008) (12) did not find significant changes in lipid peroxidation parameters after 3 months of exercise, only after 6 months, of aerobic training, it is possible to suppose that, beyond kinds and intensities of physical activities protocols, the duration (time) of the training regimen can be determinant to impact oxidative status parameters. Accordantly, considering the antioxidant system, these authors found also increases of SOD activity only with longer protocol (6 months of training) (12).

Paragraph Number 16. As described above, chronic protocol in land improved lipid peroxidation parameter, specifically isoprostane level, in diabetic patients. It is interesting to comment that Arikawa and colleagues (2013) describe that four months of aerobic exercise training did not alter isoprostane levels in previously sedentary young women, however this protocol reduces this parameter in women who were in the highest quartile of baseline isoprostanes (1).

Paragraph Number 17. Although isoprostanes are generated mainly by reactive species non-enzymatic oxidation of arachidonic acid, suggesting their role as biomarkers of oxidative status, there are evidences suggesting that these compounds can also be derived, at least in part, through cyclooxygenase pathway (for review 10). Considering that the role of inflammation process has been widely suggested in T2DM and our protocols did not affect others evaluated oxidative stress parameters, we can suggest that the effect of land chronic exercise protocol alters the inflammation status, and consequently isoprostane levels, in diabetic patients.

Paragraph Number 18. Our data can suggest that exercise protocols with similar training periodization (reflected by time, intensity and frequency factors) performed in different

environments may impact differently the isoprostane levels in diabetic patients. Additional work will be required to investigate the molecular mechanisms behind these findings.

Paragraph Number 19. Acknowledgments. This work was supported by the Brazilian funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Dr. I.R. Siqueira; Dr. G.A. Lovatel; Dr. L.F.M. Kruehl; V.R. Elsner;); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (A. Korb; F. Moysés; R.S. Dellevatti); Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica-PIBIC CNPq-UFRGS (L.R. Cechinel; C. Basso).

Paragraph Number 20. Conflict of Interest. The authors declare that the research was conducted in absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest. The Local Ethics Committee (CEP/UFRGS) approved the protocol of this study (#108997)

References

1. Arikawa AY, Thomas W, Gross M et al. Aerobic training reduces systemic oxidative stress in young women with elevated levels of F2-isoprostanes. *Contemp Clin Trials*. 2013; 34(2):212-7.
2. Bassuk SS, Manson JE. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol*. 2005; 99(3):1193-204.
3. Bondy SC. [14] Evaluation of free radical-initiated oxidant events within the nervous system. In: JR Perez-Polo editor. *Methods in Neurosci*. 1996, pp. 243-59.
4. Brinkmann C, Blossfeld J, Pesch M et al. Lipid-peroxidation and peroxiredoxin-overoxidation in the erythrocytes of non-insulin-dependent type 2 diabetic men during acute exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2012; 112(6):2277-87.

5. Ceriello A. Oxidative stress and glycemc regulation. *Metabolism*. 2000; 49(2 Suppl 1):27-9.
6. Chen SC, Ueng KC, Lee SH, Sun KT, Lee MC. Effect of t'ai chi exercise on biochemical profiles and oxidative stress indicators in obese patients with type 2 diabetes. *J Alterna Complement Med*. 2010; 16(11):1153-9.
7. Coruzzi P, Novarini A, Musiari L, Rossi E, Borghetti A. Effects of 'central hypervolemia' by Water immersion on renin-aldosterone system and ACTH-cortisol axis in hemodialyzed patients. *Nephron*. 1984; 36(4):238-41.
8. Driver AS, Kodavanti PR, Mundy WR. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol*. 2000; 22(2):175-81.
9. Flaim SF, Minter WJ, Clark DP, Zelis R. Cardiovascular response to acute aquatic and treadmill exercise in the untrained rat. *J Appl Physiol*. 1979; 46(2):302-8.
10. Galano JM, Mas E, Barden A et al. Isoprostanes and neuroprostanes: Total synthesis, biological activity and biomarkers of oxidative stress in humans. *Prostaglandins Other Lipid*. 2013.
11. Goossens GH. The renin-angiotensin system in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Obesity Facts*. 2012; 5(4):611-24.
12. Gordon LA, Morrison EY, McGrowder DA et al. Effect of exercise therapy on lipid profile and oxidative stress indicators in patients with type 2 diabetes. *BMC Complement Alterna Med*. 2008; 8:21.
13. Guzow K, Szabelski M, Rzeska A, Karolczak J, Sulowska H, Wiczak W. Photophysical properties of tyrosine at low pH range. *Chem Phys Lett*. 2002; 362(5-6):519-26.
14. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990; 186:1-85.

15. Iborra RT, Ribeiro ICD, Neves MQTS et al. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scand J Med Sci Sports*. 2008; 18(6):742-50.
16. Kanitz AC, Silva EMd, Alberton CL, Krueel LFM. Comparação das respostas cardiorrespiratórias de um exercício de hidroginástica com e sem deslocamento horizontal nos meios terrestre e aquático. *Rev Bras Educ Fís Esporte*. 2010; 24:353-62.
17. Karunakaran U, Park KG. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. *Diabetes Metab J*. 2013; 37(2):106-12.
18. Krueel LF, Beilke DD, Kanitz AC et al. Cardiorespiratory responses to stationary running in water and on land. *J Sports Sci Med*. 2013; 12(3):594-600.
19. LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol App Pharmacol*. 1990; 104(1):17-24.
20. Logani MK, Davies RE. Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants--a review. *Lipids*. 1980; 15(6):485-95.
21. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003; 17(1):24-38.
22. Nojima H, Watanabe H, Yamane K et al. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2008; 57(2):170-6.
23. Proudfoot J, Barden A, Mori TA et al. Measurement of Urinary F2-Isoprostanes as Markers of in Vivo Lipid Peroxidation—A Comparison of Enzyme Immunoassay with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal Biochem*. 1999; 272(2):209-15.

24. Rodriguez D, Silva V, Prestes J et al. Hypotensive response after water-walking and land-walking exercise sessions in healthy trained and untrained women. *Int J Gen Med.* 2011; 4:549-54.
25. Sriram K, Pai KS, Boyd MR, Ravindranath V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res.* 1997; 749(1):44-52.
26. Tsuchida M, Miura T, Mizutani K, Aibara K. Fluorescent substances in mouse and human sera as a parameter of in vivo lipid peroxidation. *Biochimica et Biophys Acta.* 1985; 834(2):196-204.
27. Valkonen M, Kuusi T. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *J Lipid Res.* 1997; 38(4):823-33.
28. Venojarvi M, Korkmaz A, Wasenius N et al. 12 Weeks' aerobic and resistance training without dietary intervention did not influence oxidative stress but aerobic training decreased atherogenic index in middle-aged men with impaired glucose regulation. *Food Chem Toxicol.* 2013; 6915(13):00248-2
29. Watenpaugh DE, Pump B, Bie P, Norsk P. Does gender influence human cardiovascular and renal responses to water immersion? *J App Physiol.* 2000; 89(2):621-8.
30. Wycherley TP, Brinkworth GD, Noakes M, Buckley JD, Clifton PM. Effect of caloric restriction with and without exercise training on oxidative stress and endothelial function in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2008; 10(11):1062-73.

List of Legends

Table 1. Effects of different exercise protocols on the content of reactive species in plasma of diabetic patients. Results are expressed as mean \pm S.D. One-Way ANOVA, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Table 2. Effects of different exercise protocols on lipid peroxidation parameters, 8-isoprostanes and water soluble fluorescence substances, in plasma of diabetic patients. Results expressed as mean \pm S.D. One-Way ANOVA, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. * = significantly different from before training and before single session.

Table 3. Effects of different exercise protocols on the macromolecules damage, evaluated by oxidation of tyrosine and tryptophan residues, in plasma of diabetic patients. Results are expressed as mean \pm S.D. One-Way ANOVA, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Table 4. Effects of different exercise protocols on the antioxidant parameters, evaluated by SOD activity and TRAP, in plasma of diabetic patients. Results are expressed as mean \pm S.D. One-Way ANOVA, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Tables

Table 1. Content of reative species (DCF)

	Water				Dry Land			
	Single session		Training		Single session		Training	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
DCF (pmol DCF formed/mg protein)	0.062 ± 0.011	0.0589 ± 0.0103	0.0624 ± 0.0106	0.0584 ± 0.0122	0.0716 ± 0.0145	0.0649 ± 0.0074	0.0690 ± 0.0129	0.0622 ± 0.0111

Table 2. Measurements of lipid peroxidation

	Water				Dry Land			
	Single session		Training		Single session		Training	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
8-Isoprostane (pg/ml)	5.2793 ± 0.5987	4.9279 ± 0.4967	5.3903 ± 0.6442	4.9119 ± 0.674	5.5079 ± 0.6815	4.8865 ± 0.8765	5.369 ± 0.5718	4.5598 ± 0.7668*
Water-soluble Fluorescent Substances (fluorescence intensity/mg protein)	3.8656 ± 1.5278	4.2298 ± 1.2348	4.0628 ± 1.7755	4.4912 ± 1.5587	4.7510 ± 1.4191	4.4125 ± 2.3591	5.1765 ± 1.9482	5.4255 ± 2.0003

Table 3. Oxidative damage in proteins

	Water				Dry Land			
	Single session		Training		Single session		Training	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
Oxidation of tyrosine residues (UA / mg protein)	21518.43 ± 4659.41	21950.77 ± 6873.35	21550.40 ± 4329.97	19889.83 ± 3234.76	21770.72 ± 2238.25	24186.99 ± 4908.74	22063.13 ± 4591.87	23065.57 ± 3521.97
Oxidation of tryptophan residues (UA / mg protein)	6861.97 ± 1361.77	7030.12 ± 1585.92	6738.03 ± 1328.17	5921.05 ± 903.96	6734.81 ± 888.99	7341.39 ± 2029.49	6627.38 ± 1732.74	7182.53 ± 833.97

Table 4. Antioxidant parameters

	Water				Dry Land			
	Single session		Training		Single session		Training	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
SOD activity (U / mg protein)	0.1098 ± 0.0051	0.1114 ± 0.0034	0.1110 ± 0.0069	0.1115 ± 0.0061	0.1127 ± 0.0058	0.1122 ± 0.0051	0.1160 ± 0.0055	0.1131 ± 0.0054
TRAP (μM/L)	2738.46 ± 776.03	2790.77 ± 947.45	2935.38 ± 1000.84	2930.77 ± 909.89	2736 ± 1020.27	2856 ± 734.95	2841.81 ± 846.09	2994.54 ± 1077.81

3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho avaliamos o efeito do exercício físico sobre parâmetros de estado oxidativo em indivíduos diabéticos tipo 2. Como já foi descrito, o efeito do ambiente de treinamento e ainda a resposta de variáveis bioquímicas, é pouco estudado em pacientes diabéticos. Este trabalho acrescenta à literatura dados inovadores no que diz respeito ao meio de treinamento e ainda os parâmetros avaliados. Nossos resultados indicam um efeito benéfico do meio de treinamento terrestre sobre os níveis de isoprostanos, uma vez que ao fim do treinamento estes indivíduos apresentaram menores níveis quando comparados ao início e ao momento antes da última sessão, indicando um efeito crônico do treinamento sobre indivíduos sedentários e um efeito agudo da última sessão de exercício. Em relação aos outros parâmetros avaliados não foram observadas nenhuma diferença significativa entre os indivíduos, tanto no grupo água quanto no grupo terra.

Apesar de nossos resultados não indicarem nenhum efeito positivo no grupo que realizou o exercício em água, não podemos descartar os benefícios deste visto que pode estar envolvido com a modulação de outros sistemas, os quais não foram avaliados no presente estudo. Por fim, podemos concluir que protocolos de exercício físico similares podem responder de modo diferente quando realizados em ambientes distintos, no entanto são necessárias mais análises a fim de elucidar a modulação de outros mecanismos envolvidos. Nossas perspectivas para este trabalho serão quantificar os níveis de marcadores inflamatórios (Interleucina-6, Interleucina-10, Factor Nuclear kappa β) nestes indivíduos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bortoletto MSS. Risco de ulceração em pés de portadores de Diabete Melittus em Londrina, Paraná: Caracterização do cuidado na atenção básica, prevalência e fatores associados. Londrina, Paraná: Universidade Estadual de Londrina; 2010.
2. Carvalho JAMD, Rodríguez-Wong LL. A transição da estrutura etária da população brasileira na primeira metade do século XXI. *Cadernos de Saúde Pública*. 2008;24:597-605.
3. Cesse EAP, Carvalho EF, Souza WV, Luna CF. Tendência da mortalidade por diabetes melito no Brasil: 1950 a 2000. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2009;53:760-6.
4. Costa PZ, Soares R. Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sciences*. 2013;92(22):1037-45.
5. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2002;25(suppl 1):s5-s20.
6. Kronenberg HM, Melmed S, Polansky KS, Larsen PR. Williaams. Tratado de Endocrinologia. Rio de Janeiro, Brasil: Eselvier 2010.
7. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;94(3):311-21.
8. Lyra R, Oliveira M, Lins D, Cavalcanti N. Prevention of type 2 diabetes mellitus. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006;50(2):239-49.
9. Vancini RL, Lira CAB. Aspectos gerais do Diabetes Mellitus e exercício. Aspectos gerais do Diabetes Mellitus e exercício Universidade Federal de São Paulo 2004.
10. Burtis CA. Tietz fundamentos de química clínica. 6^a ed. Rio de Janeiro: Eselvier; 2008.

11. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJd. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46:16-26.
12. Eringa E, Serne E, Meijer R, Schalkwijk C, Houben AHM, Stehouwer CA, et al. Endothelial dysfunction in (pre)diabetes: Characteristics, causative mechanisms and pathogenic role in type 2 diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2013;14(1):39-48.
13. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International Journal of Vascular Medicine*. 2012;2012:918267.
14. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*. 1993;328(23):1676-85.
15. Nephropathy in Diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(suppl 1):s79-s83.
16. Casellini CM, Vinik AI. Clinical manifestations and current treatment options for diabetic neuropathies. *Endocrine practice : Official Journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2007;13(5):550-66.
17. Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes—part I: pathways of vascular disease in diabetes. *Vascular Pharmacology*. 2011;54(3):68-74.
18. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. 2010;107(9):1058-70.
19. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2003;17(1):24-38.

20. Dennis BA, Ergul A, Gower BA, Allison JD, Davis CL. Oxidative Stress and cardiovascular risk in overweight children in an exercise intervention program. *Childhood Obesity*. 2013;9(1):15-21.
21. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2008;52:1096-105.
22. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1997;43:61-8.
23. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The Review of Diabetic Studies*. 2010;7(1):15-25.
24. Karunakaran U, Park KG. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2013;37(2):106-12.
25. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.
26. Rosa AP. Papel da glicose-6-fosfato-desidrogenase e da NADPH oxidase na modulação do estresse oxidativo em cérebro de ratos submetidos ao modelo de hiperglicemia neonatal. Dissertação de Mestrado. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
27. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):207-18.
28. Lima E, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;37(3):293-303.

29. Feillet-Coudray C, Chone F, Michel F, Rock E, Thieblot P, Rayssiguier Y, et al. Divergence in plasmatic and urinary isoprostane levels in type 2 diabetes. *Clinica chimica acta*. 2002;324(1):25-30.
30. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press Oxford; 1999.
31. Baynes J, Dominiczak MH. *Bioquímica Médica - John Baynes & Marek H. Dominiczak*. 3ª Ed. ed. Rio de Janeiro. Brasil: Elsevier; 2011.
32. Barreiros A, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*. 2006;29(1):113.
33. Montesi L, Moscatiello S, Malavolti M, Marzocchi R, Marchesini G. Physical activity for the prevention and treatment of metabolic disorders. *Internal and Emergency Medicine*. 2013.
34. Piazza L, Menta MR, Castoldi C, Reolão JBC, Schmidt R, Calegari L. Efeitos de exercícios aquáticos sobre a aptidão cardiorrespiratória ea pressão arterial em hipertensas. *Fisioterapia e Pesquisa*. 2008;15(3):285-91.
35. Nojima H, Watanabe H, Yamane K, Kitahara Y, Sekikawa K, Yamamoto H, et al. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2008;57(2):170-6.
36. Lawson DL, Chen L, Mehta JL. Effects of Exercise-Induced Oxidative Stress on Nitric Oxide Release and Antioxidant Activity. *The American Journal of Cardiology*. 1997;80(12):1640-2.
37. Teixeira de Lemos E, Oliveira J, Páscoa Pinheiro J, Reis F. Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: benefits in type 2 diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012;2012.

38. Duncan GE, Perri MG, Theriaque DW, Hutson AD, Eckel RH, Stacpoole PW. Exercise training, without weight loss, increases insulin sensitivity and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults. *Diabetes Care*. 2003;26(3):557-62.
39. Venkatasamy VV, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. Effect of Physical activity on Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013;7(8):1764.
40. Kanitz AC, Silva EMd, Alberton CL, Krueel LFM. Comparação das respostas cardiorrespiratórias de um exercício de hidroginástica com e sem deslocamento horizontal nos meios terrestre e aquático. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*. 2010;24:353-62.
41. Rosety-Rodriguez M, Rosety I, Fornieles-Gonzalez G, Diaz-Ordenez AJ, Camacho A, Rosety MA, et al. A 6-week training program increased muscle antioxidant system in elderly diabetic fatty rats. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2012;18(9):BR346.
42. Almeida FN, Proença AR, Chimin P, Marçal AC, Bessa-Lima F, Carvalho CR. *Physical Exercise and Pancreatic Islets*. 2012.
43. Oliveira VNd, Bessa A, Jorge MLMP, Oliveira RJdS, de Mello MT, De Agostini GG, et al. The effect of different training programs on antioxidant status, oxidative stress, and metabolic control in type 2 diabetes. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2012;37(2):334-44.
44. Pendergast DR, Lundgren CE. The underwater environment: cardiopulmonary, thermal, and energetic demands. *Journal of Applied Physiology*. 2009;106(1):276-83.

5. ANEXOS

5.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando você a participar do estudo intitulado “Efeitos de dois modelos de treinamento aeróbico realizados em diferentes meios sobre parâmetros cardiorrespiratórios, hormonais e metabólicos de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 – Um ensaio clínico randomizado”, que tem como objetivo analisar os efeitos de dois programas de treinamento aeróbico realizados em diferentes meios sobre parâmetros cardiorrespiratórios, hormonais e metabólicos.

No estudo haverá dois grupos de treinamento físico, e você poderá participar em um destes dois grupos. Esta definição ocorrerá através de um **sorteio**.

O envolvimento com o estudo terá duração de 17 semanas, sendo que durante este período será necessária a sua contribuição em torno de **três vezes** por semana, por um período de, aproximadamente, **1 hora** em cada dia. Os encontros serão na Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (localizada na Rua Felizardo, 750, Jardim Botânico). As sessões de treinamento serão realizadas na pista atlética ou na piscina grande do Centro Natatório da referida escola. Em dias chuvosos, as sessões de treinamento que ocorrerão na pista atlética serão transferidas para as dependências do Centro Natatório da mesma escola.

Este estudo compreende os seguintes procedimentos:

- Realização de três testes máximos, dois que serão realizados em esteira ergométrica e um de corrida em piscina funda. Estes testes serão realizados com aumento progressivo do nível de esforço, até que você queira parar a realização do teste;
- Realização de medidas de composição corporal (peso, altura, circunferência de cintura e dobras de gordura corporal).
- Realização de coletas de sangue em jejum e duas horas após um café padronizado;
- Realização de coletas de sangue antes e após duas das sessões de treinamento;
- Realização de medidas de glicemia capilar em um dos dedos das mãos antes, durante e após todos os testes e sessões de treinamento;
- Preenchimento de questionários sobre sintomas depressivos e qualidade de vida.

O risco relacionado à sua participação nestes grupos é muito baixo, porém existindo algumas possibilidades de desconforto por cansaço. O exercício sempre será mantido em um nível de esforço seguro e será imediatamente suspenso, se necessário for e você receberá o atendimento adequado.

Os benefícios de participar deste estudo serão o conhecimento do seu estado físico e de resultados de diferentes exames importantes no controle do diabetes tipo 2 e a possibilidade de realização de atividade física orientada por um profissional de educação física.

Durante os testes máximos de esteira ergométrica e na piscina, você estará respirando através de uma máscara, na qual estará colocado um analisador de gases.

Nestes testes de esforço máximo estarão envolvidos os seguintes riscos e desconfortos: dor e cansaço muscular temporário. Há a possibilidade de alterações nos batimentos cardíacos e na pressão arterial. Porém, entende-se que seus batimentos cardíacos serão monitorados durante os testes de laboratório, e que você poderá interromper o teste a qualquer momento.

Durante os testes estará presente um médico responsável, além de estar disponível, no laboratório, uma linha telefônica para a Assistência Médica de Emergência (SAMU - 192).

Dos procedimentos de testes:

Os procedimentos escritos acima têm sido explicados para mim por Luiz Fernando Martins Krueel e/ou seus orientandos, Rodrigo Sudatti Delevatti e bolsistas selecionados. Estes irão responder qualquer dúvida que eu tenha em qualquer momento relativo a esses procedimentos. Todos os dados em relação a minha pessoa irão ficar confidenciais e disponíveis apenas sob minha solicitação escrita. Além disso, eu entendo que no momento da publicação, não irá ser feita associação entre os dados publicados e a minha pessoa.

Não haverá compensação financeira pela minha participação neste estudo, porém também não terei custos para participar do estudo. Poderei fazer contato com os pesquisadores responsáveis pelo estudo para quaisquer problemas referentes à minha participação no estudo ou se eu sentir que há uma violação dos meus direitos, através dos telefones:

(51) 3308-5820 (Laboratório de Pesquisa do Exercício)

(51) 3359-7640 (Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre)

Durante a realização do trabalho você poderá se recusar a prosseguir, seja em momento de testes ou treinamento. Todos os procedimentos a que será submetido serão

conduzidos por profissionais, professores ou bolsistas com experiência prévia em todos os procedimentos. Não haverá médico presente em todos os treinos.

Uma via deste documento ficará com você, enquanto outra via ficará guardada com os pesquisadores.

Os procedimentos expostos acima serão devidamente explicados pelos pesquisadores responsáveis pelo estudo.

Porto Alegre _____ de _____ de 2012.

Nome em letra de forma do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Nome em letra de forma do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____