

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBICO PERIODIZADO REALIZADO EM
DIFERENTES AMBIENTES SOBRE PARÂMETROS DE ESTADO OXIDATIVO,
INFLAMAÇÃO E MARCADORES EPIGENÉTICOS EM SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

Arthiese Korb

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBICO PERIODIZADO REALIZADO EM
DIFERENTES AMBIENTES SOBRE PARÂMETROS DE ESTADO OXIDATIVO,
INFLAMAÇÃO E MARCADORES EPIGENÉTICOS EM SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

Arthiese Korb

Orientadora: Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Korb, Arthiese

EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBICO PERIODIZADO
REALIZADO EM DIFERENTES AMBIENTES SOBRE PARÂMETROS
DE ESTADO OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E MARCADORES
EPIGENÉTICOS EM SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2 / Arthiese Korb. -- 2015.
113 f.

Orientadora: Ionara Rodrigues Siqueira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Exercício físico. 3.
Estresse oxidativo. 4. Interleucinas. 5. Histona
desacetilase. I. Rodrigues Siqueira, Ionara, orient.
II. Título.

Dedicatória

A minha mãe

Mari Maria Bellinaso Korb (in memoriam)

Ao meu amor

Almondi Fagundes

“Amar profundamente em uma direção nos torna mais amável em

todas as outras”

(Madame Swetchine).

Agradecimentos

A minha orientadora Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira, pela paciência e ensinamentos, por me proporcionar o crescimento pessoal e profissional, por acreditar e estimular mesmo nos momentos mais difíceis e por ser um grande exemplo de pesquisadora.

A meu marido Almondi, por dar um sentido especial na minha vida, por permitir que meus olhos continuem brilhando e pelo amor que encontro no seu abraço.

A minha família, meu irmão Alexei minha e cunhada Fernanda por serem o ombro amigo e verdadeiro e pela pequena Maria Catarina, em especial minha mãe (in memorian) e ao meu pai João Carlos por serem um exemplo de caráter e amor.

Aos meus queridos colegas e amigos do laboratório de neuropsicofarmacologia, Gisele, Karine, Viviane, Louisiana, Laura, Carla, Felipe, Christiano, Bruna, Amanda, Wagner. Por todos os momentos que passaram e ainda aqueles que estão por vir. “Amigo é coisa para se guardar do lado esquerdo do peito”.

Ao grupo de pesquisa do Prof.Dr. Luis Fernando Martins Kruel, em especial ao Rodrigo Sudatti Delevatti, agradeço a parceria de trabalho, a disponibilidade e aos ensinamentos.

Aos pacientes que foram essenciais nessa pesquisa.

A UFRGS, ao PPGCM e a CAPES.

*“O real não está na saída nem na chegada...
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia”*

João Guimarães Rosa

*“Conhecer e pensar não é chegar a uma verdade absolutamente certa...
mas dialogar com a incerteza” Edgar Morin*

Resumo

O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito do treinamento aeróbico periodizado realizado em ambientes aquático ou terrestre sobre parâmetros de estado oxidativo, inflamatórios e epigenéticos em sangue periférico de sujeitos adultos com diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). Pacientes com DMT2 sedentários (55-64 anos de idade) randomizados foram alocados em dois grupos, um grupo realizou treinamento aeróbico aquático e outro grupo realizou treinamento aeróbico terrestre. Os programas de treinamento aeróbico intervalado foram realizados três vezes por semana com duração de 45 minutos cada sessão por 12 semanas, que consistiu em caminhada e/ou corrida em piscina funda realizada pelos indivíduos do grupo de exercícios aquáticos ou caminhada e/ou corrida em pista atlética realizada pelos indivíduos do grupo de treinamento terrestre. Os treinamentos em ambos os meios apresentaram uma periodização similar; as intensidades foram determinadas a partir do segundo limiar ventilatório (LV2) de cada indivíduo. O protocolo consistiu de quatro mesociclos com três semanas cada um, durante três meses. O sangue periférico foi coletado antes e imediatamente depois da primeira e da última sessão de exercício, assim foram avaliados os efeitos agudo da primeira sessão, agudo em indivíduos treinados, além do treinamento crônico.

Foram avaliados parâmetros de estado oxidativo, por meio do conteúdo de espécies reativas, do dano aos lipídeos através do nível de 8-isoprostanos e formação de substâncias fluorescentes, assim como danos às proteínas a partir do conteúdo dos resíduos de triptofano e tirosina. Além disso, a capacidade antioxidante total (TRAP) foi avaliada, assim como a atividade de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX). Ainda, foram avaliados parâmetros inflamatórios através dos níveis das interleucinas 6 (IL6), interleucina 1 β (IL1 β) e interleucina 10 (IL10). Foi avaliada a atividade global da enzima histona desacetilase (HDAC).

Houve uma diminuição do conteúdo das espécies reativas e do nível de isoprostanos após a primeira sessão de exercício, assim como após a última sessão de exercício, indicando um efeito agudo do exercício mesmo nos indivíduos treinados. Em relação à atividade das enzimas antioxidantes, ocorreu uma redução da atividade da GPX após as 12 semanas de treinamento e as atividades da SOD e da CAT diminuíram após a primeira sessão de exercício e após as 12

semanas de treinamento, sem nenhum efeito sobre o conteúdo das espécies reativas. Não houve diferença significativa entre os grupos água ou terra.

Após 12 semanas de treinamento em ambos os ambientes, foi observado um aumento de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. A atividade global da enzima HDAC aumentou agudamente após a primeira e última sessão de exercício, e ocorreu uma diminuição após as 12 semanas de treinamento tanto no grupo água como no grupo terra. Em relação aos outros parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças significativas.

A partir dos resultados obtidos, podemos sugerir que o treinamento periodizado, que respeita as características individuais, tanto em meio aquático como em terrestre, é capaz de alterar parâmetros de estado oxidativo, epigenéticos e inflamatórios em sangue periférico de pacientes com DMT2.

Palavras Chaves: Diabetes mellitus tipo2, exercício, estresse oxidativo, interleucinas, histona desacetilase.

Abstract

The aim of this study was to analyze the effects of aerobic training periodization performed in aquatic or dry land environment on oxidative stress, inflammatory and epigenetic parameters in blood of subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Sedentary patients (55-64 years) diagnosed with T2DM with no regular physical activity were allocated in a water group or a dry land group through a blinded randomization. The exercise programs consisted in aerobic interval training sessions three times a week during 12 weeks involving deep-water walking or running in swimming pool with a life vest (water group) or walking or running on a track (land group). The intensities were determined by individual second ventilatory threshold, obtained through maximal effort test, performed in their specific training environment. Our protocol consists of a periodised training with four mesocycles of three weeks each during 3 months. The effects of first and last sessions, as well as, of 12 weeks training (without any effect of acute exercise) were investigated.

Firstly, we evaluated several oxidative state parameters, specifically the reactive species content, the lipid peroxidation through the 8-isoprostane levels and the fluorescent substances formation, the protein damage by the content of tryptophan and tyrosine residues. Moreover, the total antioxidant capacity (TRAP) was evaluated, as well as the antioxidant enzyme activities, namely glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). There were decreases in the reactive species and isoprostane levels after the first and the last exercise session, indicating an acute effect of exercise even in trained subjects. The exercise reduced antioxidant enzyme activities without any effect on TRAP values. Interestingly, there were no significant differences between land group and water groups.

Yet, it was studied the effect of our exercise protocol on blood global HDAC activity and cytokines, interleukin 6 (IL6), interleukin 1 β (IL1 β) and interleukin 10 (IL10), levels in type 2 diabetes patients. After 12 weeks of training in both environments, we observed an increase in IL-10, an anti-inflammatory cytokine. Interestingly, the HDAC enzyme global activity increased acutely after first and last exercise session and there was a decrease after 12 weeks of training in both water and land groups.

The results suggest that the periodization exercise performed in water and dry land environments is able to improve oxidative status, inflammatory and epigenetic parameters in subjects with type 2 diabetes.

Key Words: Type 2 diabetes mellitus , exercise, , oxidative stress, interleukin, histone deacetylase.

Lista de Figuras

Artigo 1

Figure 1 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on reactive species content in plasma	71
Figure 2 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on 8-isoprostane level in plasma.....	71
Figure 3 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetic patients in water or dry land on GPX activity in erythrocytes	72
Figure 4 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on CAT activity in erythrocyte	72
Figure 5 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on SOD activity in erythrocyte	73

Artigo 2

Figure 1 Participants flow diagram	96
Figure 2 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on HDAC activity in PMBCs	97
Figure 3 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetic patients in water or dry land on (IL-10) content in plasma	97

Lista de Tabelas

Table 1 Baseline characteristics subjects.....	70
Table 2 Aerobic Training program.....	96

Lista de símbolos e abreviaturas

H4-hidroxinonenal (4-HNE)
Ácido desoxirribonucleico (DNA)
Ácido hipocloroso (hoCl)
Alcoxil (RO•)
Ativação da proteína quinase C (PKC)
Capacidade antioxidante total (TRAP)
Catalase (CAT)
Cloreto de nitrila (NO₂Cl)
Conteúdo de espécies reativas (DCF)
Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)
Dióxido de nitrogênio (NO₂)
Enzima histona desacetilase (HDAC)
Espécies reativas de nitrogênio (ERN)
Espécies reativas de oxigênio (eros)
Fator de necrose tumoral (TNF- α)
Fator de transcrição (MEF2)
Fator de transcrição (NF- κ b)
Transportador de glicose (GLUT-4)
Glutaciona dissulfeto (GSSG)
Glutaciona peroxidase (GPX)
Glutaciona redutase (GR)
Glutaciona reduzida (GSH)
Heart rate at anaerobic threshold (ATHR)
Histone acetyltransferases (HAT)
Inflammation nuclear factor (NF)- κ B
Interferons (IFN)
Interleucina 10 (IL10)
Interleucina 1 β (IL1 β)
Interleucina-13 (IL-13)
Interleucina-2 (IL-2)
Interleucina-4 (IL-4)
Interleucina-8 (IL-8)
Interleucinas 6 (IL6)
Malondialdeído (MDA)
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato(NADPH)
Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)
Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
Radical ânion superóxido (O₂^{-•})
Óxido nítrico (NO•)
Peripheral blood mononuclear cells (pbmcs)
Peroxinitrito (ONOO⁻)
Produtos finais da glicação (AGEs)
Radical hidroxil (HO•)

Radical peroxil (RO[•]2)
Receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra)
Segundo limiar ventilatório (LV2)

Sumário

1. Introdução	14
2. Revisão de Literatura	17
2.1 Diabetes.....	17
2.1.1 Diabetes tipo 2.....	17
2.1.2 Estresse Oxidativo e o Diabetes	18
2.1.3 Inflamação e Diabetes	21
2.1.4 Mecanismos epigenéticos e diabetes.....	23
2.2 Exercício físico.....	25
2.2.1 Exercício físico e diabetes.....	25
2.2.2 Exercício físico e o estado oxidativo.....	26
2.2.4 Exercício físico e epigenética.....	29
3. Objetivos	31
3.1 Objetivo Primário.....	31
3.2 Objetivos secundários	31
4. Referencias Bibliográficas	33
5 Artigos em Inglês	51
5.1 Artigo 1	51
5.2 Artigo 2	74
6.1 Conclusão.....	98
6.2 Perspectivas.....	100
7 Anexos.....	101
7.1 ANAMNESE.....	101
7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	107
7.3 FICHA DE COLETA DE CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÊNIO E COMPOSIÇÃO CORPORAL.	110
7.4 Teste progressivo máximo em esteira rolante	112

1. Introdução

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas de causa múltipla, comum em humanos e de incidência crescente. Apresenta como característica principal a hiperglicemia, decorrente da deficiência na secreção de insulina pelas células β do pâncreas, ou de resistência à ação da insulina, ou ambos (1).

Existem diferentes tipos de diabetes, entre eles destacam-se, o diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) anteriormente conhecido como insulino dependente, o qual compreende cerca de 10% do total de casos, caracteriza-se por insuficiente produção de insulina, devido à destruição das células β pancreáticas, de natureza autoimune ou idiopática, já o diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), anteriormente conhecido como diabetes não-insulino-dependente, compreende cerca de 90% do total de casos e ocorre devido à resistência a insulina (2, 3).

A resistência à insulina é caracterizada pela secreção inadequada desde hormônio, bem como respostas teciduais diminuídas à sua ação, o que ocorre devido a alterações na translocação para a membrana plasmática da proteína GLUT-4, um dos transportadores de glicose do meio extra para o meio intracelular (4) prejudicando a captação de glicose pelas células, levando a hiperglicemia crônica (5).

A hiperglicemia causa o fenômeno de glicação não-enzimática e causa a formação de produtos finais da glicação (6). Os produtos finais de glicação participam da formação das espécies reativas de oxigênio e também das citocinas inflamatórias (7). Além disso, o estresse oxidativo pode modular mecanismos epigenéticos através da acetilação das histonas, o que pode levar ao aumento na expressão do gene pró-inflamatório que por sua vez, conduz a uma resposta inflamatória crônica (8), característica no diabetes.

Os pacientes diabéticos apresentam níveis elevados de marcadores do estado oxidativo o que pode estar associado às alterações da atividade antioxidante nesses indivíduos (9, 10) Ainda, foi demonstrada a associação do DMT2 a danos oxidativos aos lipídeos, as proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA) celular (10, 11). Como consequência, o estresse oxidativo pode acelerar as complicações associadas à patologia (9).

Além disso, conforme previamente citado, uma importante resposta inflamatória patológica está presente no DMT2 (12). Esses indivíduos apresentam um estado de inflamação

crônico que envolve moléculas e vias de sinalizações semelhantes ao processo de inflamação classicamente conhecido (13). Este estado inflamatório é caracterizado pela elevação nas concentrações plasmáticas da interleucina-6 IL-6 e IL-1 β e diminuição da IL-10 (14, 15).

Ainda, estudos indicam que alterações em marcadores epigenéticos tem um importante papel na etiologia de doenças comuns em humanos dentre elas o diabetes. A epigenética vem sendo considerada uma importante interface entre os componentes genéticos, o ambiente externo e o estilo de vida (16). A acetilação de histona é um mecanismo chave para o controle da sinalização celular e expressão gênica. A HDAC é uma das enzimas responsáveis por regular a acetilação de histonas e os fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação do metabolismo da glicose (17).

Cabe destacar que o treinamento físico tem sido proposto como modalidade terapêutica não farmacológica importante no tratamento do DMT2 (18,19). O exercício físico regular parece ser eficaz tanto na prevenção quanto no adiamento da manifestação da patologia e de suas complicações, pois proporciona um importante controle metabólico e hormonal (20, 21).

Estudos envolvendo diferentes protocolos de exercício demonstraram o impacto sobre os sistemas cardiorespiratórios e musculoesquelético (22), bem como sugerem que o mecanismo de ação protetora do exercício físico esteja relacionado aos efeitos no estado oxidativo celular (23), em parâmetros inflamatórios (24) e ainda sobre mecanismos epigenéticos (25). Contudo, é importante levar em consideração que as respostas associadas ao exercício físico dependem de diversos fatores, dentre eles o meio realizado, o protocolo de treinamento utilizado, dependendo também da frequência, da duração e da intensidade do esforço (26).

Os exercícios físicos prescritos para diabéticos são realizados em grande parte em ambiente terrestre (27-29), porém, a realização de atividade física aquática vem sendo amplamente recomendada, principalmente para populações com idade avançada e com patologias crônicas, devido aos benefícios cardiorrespiratórios, metabólicos, na composição corporal e na força muscular (30), além disso, é considerado um exercício de baixo impacto diminuindo as chances de lesão nos seus praticantes (31, 32)

Assim, o exercício em ambiente aquático pode ser considerado uma estratégia relevante para diminuir as complicações causadas pelo diabetes, assim como melhorar a qualidade de vida destes indivíduos, contudo estudos que comparem os efeitos dos ambientes aquáticos e terrestres

e que avaliem os mecanismos bioquímicos da execução de exercício em ambiente aquático são raros.

2. Revisão de Literatura

Na revisão de literatura, buscamos ressaltar os principais assuntos da pesquisa. Utilizando o cruzamento das seguintes palavras chaves: diabetes or type 2 diabetes mellitus, lipid peroxidation or isoprostanes, antioxidant enzymes or oxidative stress, inflammation or inflammatory cytokines or interleukin 6 or interleucina1 β or interleukin 10, epigenetics or histones or HDAC, periodized training or water training or land training. As bases de dados Pub Med, Science Direct foram consultadas para o levantamento bibliográfico.

O número de artigos encontrados na busca foram cerca de 12.000, considerando a busca partir do ano de 2000, sendo citados antes desse ano somente aqueles com informações relevantes principalmente métodos. Pesquisados foram cerca de 550, sendo que o número de artigos utilizados e citados na introdução e revisão bibliográfica foram 173, no artigo 1 foram 54 e no artigo 2 foram 25.

2.1 Diabetes

2.1.1 Diabetes tipo 2

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, caracterizado por uma hiperglicemia crônica que pode acarretar danos em diferentes órgãos e sistemas (34). Níveis glicêmicos maiores que 126mg/dL em jejum, ou acima de 200 mg/dL em qualquer momento do dia (glicemia casual) ou duas horas após a ingestão de 75g de glicose dissolvida em água (teste de tolerância à glicose) confirmam o diagnóstico (1).

Os sintomas clássicos de diabetes são: poliúria, polidipsia, polifagia e perda involuntária de peso. Outros sintomas que levantam a suspeita clínica são: fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, e infecções de repetição. Algumas vezes o diagnóstico é realizado a partir de complicações como neuropatia, retinopatia ou doença cardiovascular aterosclerótica, podendo ser também assintomático em proporção significativa dos casos (35).

O DMT2 é uma doença crônica, com índice elevado de mortalidade (36, 37). O risco de mortalidade atribuído ao diabetes mellitus aumenta com o avanço da idade, assim como a

prevalência da doença. Isto se deve às complicações que o diabético apresenta em longo prazo (37). Cabe descrever que a prevalência da doença está aumentando e estima-se que cerca de 382 milhões de pessoas vivam com diabetes (38). Além disso, as projeções são que em 2035 existam aproximadamente 592 milhões de pessoas com a doença no mundo (39), no Brasil, acredita-se que este número alcance cerca de 11,3 milhões de indivíduos (40). Ainda, nos países em desenvolvimento os indivíduos com diabetes encontram-se em idades produtivas, na faixa etária de 45 a 64 anos, e nos países desenvolvidos é superior aos 64 anos (34, 39).

Cabe destacar que o DMT2 é a forma mais comum da doença, sendo a grande responsável pelo aumento exponencial da prevalência de diabetes no mundo, tornando-se uma epidemia generalizada (41). Embora a predisposição genética seja considerada um fator essencial para desenvolver diabetes, a associação de condições ambientais e fatores comportamentais também podem influenciar o aparecimento da patologia (42). Dentre estes fatores estão a obesidade, a inatividade física juntamente com aumento da expectativa de vida e do processo de urbanização atual (43-45). Além disso, outras condições como a gordura abdominal, a dislipidemia e a hipertensão arterial podem estar associadas (46).

Como citado anteriormente existem importantes mecanismos moleculares associados diretamente à patologia do DMT2 e entre eles está o estado oxidativo.

2.1.2 Estresse Oxidativo e o Diabetes

As espécies reativas de oxigênio e as espécies reativas de nitrogênio, entre outras espécies reativas, são produzidas constantemente como parte dos processos metabólicos (47). Além disso, as espécies reativas podem ser divididas em 2 grupos: os radicais livres que são quaisquer espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados e um estado altamente reativo de existência independente e os não radicais, que se formam quando dois radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados de existência independente (48). Entre as principais espécies reativas, estão o peróxido de hidrogênio H_2O_2 , o radical ânion superóxido ($O^{\cdot-}$), o radical hidroxil (HO^{\cdot}), os radicais peroxil (RO_2^{\cdot}) e alcoxil (RO^{\cdot}), o óxido nítrico (NO^{\cdot}), o dióxido de nitrogênio (NO_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$), o cloreto de nitrila (NO_2Cl), o ácido hipocloroso ($HOCl$) entre outros (49). Em baixas concentrações, essas espécies são essenciais para as funções celulares, como por exemplo, a função imune e a vasodilatação (50). Entretanto,

quando acontece um desequilíbrio na produção com a remoção dos compostos oxidantes, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo (51).

O importante papel que o estado oxidativo exerce na patogênese e na progressão do diabetes é amplamente aceito e seus biomarcadores têm sido utilizados na avaliação de risco de pacientes diabéticos (52). Além disso, a hiperglicemia crônica, característica do diabetes, está relacionada ao aumento das espécies reativas (53). Os principais mecanismos propostos para explicar a relação entre a hiperglicemia crônica e a produção acentuada das espécies reativas no interior das células estão associados ao aumento do fluxo na via dos polióis, à ativação da proteína quinase C (PKC) e ao aumento da formação produtos finais de glicação, a partir da auto-oxidação da glicose (54). A auto-oxidação da glicose é causada pela hiperglicemia, sendo que os açúcares oxidados reagem com componentes lipoprotéicos e receptores da membrana, estimulando a formação de ânions superóxido e peróxidos de hidrogênio (55,54).

A presença do estresse oxidativo crônico em pacientes diabéticos está relacionada à manifestação da peroxidação lipídica. Estudos apontam a relação do diabetes mellitus tipo2 e danos oxidativos aos lipídeos, as proteínas, os carboidratos, e ao DNA celular, sendo que o aparecimento da peroxidação lipídica pode ser atribuído à redução da atividade das enzimas antioxidantes (56, 57).

A lipoperoxidação é um evento fisiológico, contudo pode desencadear uma série de lesões nas membranas celulares (58). Os ácidos graxos poliinsaturados são extremamente sensíveis à oxidação, resultando no acúmulo de hidroperóxidos de lipídicos (LOOH) os quais podem ser degradados na presença de íons ferro ou cobre gerando radicais alcóxila ($RO\bullet$) e peróxila ($ROO\bullet$). Estes radicais ($RO\bullet$ e $ROO\bullet$) podem danificar proteínas de membrana e também atacar outras moléculas de lipídio, propagando a peroxidação lipídica (59, 60).

A lipoperoxidação caracteriza-se por reações em cadeia dividida em diferentes etapas: etapa de iniciação, de propagação e de terminação (61). Além disso, é um processo no qual ocorre à oxidação das cadeias de ácidos graxos polinsaturadas, incluindo aqueles que compõem a membrana das células ou organelas, devido à ação dos radicais livres (62). Como consequência, ocasiona modificações tanto na permeabilidade das membranas celulares quanto em sua estrutura, causando alterações nas funções exercidas pela membrana plasmática como a seletividade e o transporte, extravasamento do conteúdo de certas organelas e até mesmo morte celular (59, 60). Os fosfolipídios de membrana podem ser hidrolisados pela enzima fosfolipase,

gerando produtos como o ácido araquidônico, que pode ser oxidado através da via enzimática, envolvendo as ciclooxigenases e/ou as lipoxigenases, ou então através da via não enzimática, pela ação de espécies reativas e/ou de metais de transição (63). Quando a oxidação ocorre pela via não enzimática, podem ser gerados produtos da lipoperoxidação, como: 4-hidroxinonal (4-HNE), malondialdeído (MDA) e os isoprostanos. Os produtos da reação não enzimática são frequentemente utilizados como marcadores do dano lipídico (62). Além disso, a resistência insulínica promove o aumento dos níveis plasmáticos de triglicérides e de colesterol total, moléculas susceptíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio, favorecendo o dano oxidativo a essas lipoproteínas não só a nível tecidual, mas também plasmático (64).

Entre os produtos finais da lipoperoxidação, destacam-se os isoprostanos, pois são quimicamente estáveis e a análise de seus níveis no plasma ou urina permite uma detecção sensível e específica do dano lipídico (65-66). Estudos têm demonstrado que indivíduos com DMT2 apresentam níveis elevados de isoprostanos devido ao alto índice de lipoperoxidação a que são submetidos (63, 67).

Além de que, produtos da lipoperoxidação, como o MDA, podem causar danos também às proteínas, resultando em modificações de inúmeros resíduos de aminoácidos (68). Os aminoácidos das proteínas podem ser danificados por radicais livres altamente reativos, podendo causar alterações ou inativação das enzimas (69). Os resíduos aromáticos são os principais alvos de oxidação pelas espécies reativas, resíduos de tirosina e triptofano são alvos preferenciais da oxidação (70).

Como mecanismo de remoção das espécies reativas, os organismos possuem um sistema antioxidante, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema não enzimático é constituído em grande parte por compostos obtidos na dieta. O sistema enzimático constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do radical ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio (71). A enzima SOD é a primeira enzima na eliminação do ânion superóxido. Essa enzima possui duas isoformas, a CuZnSOD, ligada aos íons cobre e zinco e encontrada principalmente no citoplasma das células, e a MnSOD, ligada ao íon manganês, encontrada na matriz mitocondrial. A função de converter $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 é comum às duas formas. A enzima CAT é uma enzima presente nos peroxisomas, cuja função é converter H_2O_2 em H_2O e O_2 (72, 73). A GPX pode ser

localizada no citosol e na matriz mitocondrial e é responsável por catalisar a redução do H_2O_2 e de hidroperóxidos orgânicos, no processo de oxirredução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, e formando glutathione dissulfeto (GSSG), que será por sua vez, regenerada por ação da glutathione redutase (GR) com consumo de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). (73, 74).

O ensaio do Potencial Antioxidante Total (TRAP) é a medida global da capacidade antioxidante, a qual considera todos os antioxidantes presentes bem como os seus sinergismos (75).

A regulação da atividade antioxidante depende de fatores como idade, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores (73), além disso, glicação não-enzimática causada pela elevada concentração de glicose no diabetes, pode causar o decréscimo na atividade antioxidante, aumentando a suscetibilidade do organismo ao estresse oxidativo (76, 77), e também pode estar relacionada a inflamação sistêmica crônica nos indivíduos diabéticos.

2.1.3 Inflamação e Diabetes

O DMT2 tem como uma das suas principais características a inflamação sistêmica crônica, onde fatores metabólicos, genéticos e ambientais estão associados (78).

A resposta inflamatória, em geral, ocorre através da ativação coordenada de vias de sinalização que regulam a expressão, tanto de mediadores pró-inflamatórios, como anti-inflamatórios (79). O estado inflamatório, inicialmente, apresenta elevação nas concentrações plasmáticas das citocinas pró-inflamatórias as quais apresentam uma relação com as proteínas de fase aguda (80, 81). A persistência dessas proteínas em níveis acima do normal representa um estado de inflamação crônica (82).

As citocinas são classificadas de acordo com a função podendo ser pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Citocinas pró-inflamatórias são aquelas que aumentam o processo inflamatório como: interleucina- 1β (IL- 1β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) fator de necrose tumoral (TNF- α), interferons (IFN), interleucina-2 (IL-2) (83, 84). Já as citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) assim como, o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) têm a função de sinalizar a diminuição do

processo agudo inflamatório, regulando a inflamação pela restrição de citocinas pró-inflamatórias (85, 84).

A inflamação é considerada um fator importante no desenvolvimento da resistência à insulina, o que leva ao aumento nos níveis de glicemia (13). Entre os mecanismos que podem estar ligados a o desenvolvimento da resistência à insulina causado pela inflamação, podemos citar as mudanças em vias de sinalização que promovem a produção de espécies reativas (86) e alterações na fosforilação de receptores de insulina denominados IRS-1 que leva à inibição da sua sinalização (87).

A hiperglicemia causa formação dos produtos finais da glicação, o que pode estar associado a um aumento do fator de transcrição NF- κ B (88), levando, conseqüentemente, a altos níveis circulantes das citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α (89).

Ainda, a inflamação esta associada à fisiopatologia do diabetes e os mecanismos envolvidos na manutenção desta doença também são responsáveis pela ativação de vias pró-inflamatórias o que leva a perpetuação deste ciclo. Estudos mostraram que citocinas pró-inflamatórias são ativadas e também são capazes de ativar as vias de sinalização como NF- κ B gerando um ciclo inflamatório crônico (90, 91). Ainda neste contexto, sugere-se que aumento dos níveis de IL-6 e IL-1 β circulantes representam um risco significativamente elevado de desenvolver DMT2 (92).

Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias como, por exemplo, a IL-10, exercem um papel crucial na proteção desta doença (93). Foi demonstrado que indivíduos que apresentam uma diminuição nos níveis da IL-10 estão mais propensos a desenvolver diabetes e/ou síndrome metabólica (14), uma vez que, os níveis da IL-10 circulante parecem estar positivamente associados ao aumento à sensibilidade à insulina (94). Portanto, a elevada produção de citocinas pró-inflamatórias juntamente com a diminuição de citocinas anti-inflamatórias em pacientes diabéticos podem estar associadas com o desenvolvimento da patologia quanto com a sua progressão e complicações crônicas características (95). Somado a isso, a regulação dos mecanismos inflamatórios no DMT2 parece estar relacionada com modificações epigenéticas.

2.1.4 Mecanismos epigenéticos e diabetes

A epigenética refere-se ao processo de alterações dinâmicas na estrutura da cromatina que podem modificar a expressão de genes específicos sem que haja mudança na sequência do DNA (96, 97).

O DNA é compactado em cromatina, a qual pode estar organizada em heterocromatina ou em eucromatina, apresentando baixa ou alta atividade transcricional, respectivamente. O nucleossomo é a unidade básica da cromatina e consiste em uma unidade de DNA dividida em duas espirais, as quais se enrolam em torno de um octâmero protéico formado por quatro pares de histonas: H2A, H2B, H3 e H4 (98, 99). As diferentes modificações pós-traducionais envolvendo essas moléculas, são importantes mecanismos epigenéticos no controle da expressão gênica (99). As principais alterações epigenéticas são acetilação, a fosforilação, a metilação e a ubiquitinação das histonas e a metilação do DNA (96, 97). A estrutura da cromatina formada por histonas envolvidas por duas moléculas de DNA assim como o octâmero formado por quatro pares de Histonas.

A acetilação das histonas é catalisada por dois grupos enzimáticos denominados histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HDACs). As HATs usam o acetil-CoA como doador de grupamento acetil para as histonas. A acetilação neutraliza a carga positiva da histona enfraquecendo as interações eletrostáticas da histona com o DNA, o que torna a cromatina menos compacta e facilita a transcrição gênica. Enquanto que, as HDACs desacetilam estas lisinas, retirando o grupamento acetil, deixando a estrutura da cromatina mais compacta, e assim, reprimindo o processo de transcrição gênica (100, 101).

Em seres humanos, quatro classes de HDAC foram identificados. Classe I inclui HDAC 1, 2, 3 e 8, classe II inclui HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10, e classe IV incluem HDAC11. A terceira classe de HDAC, a família das sirtuínas, que não são estruturalmente relacionadas com outras classes de HDAC (102).

Os desequilíbrios nos mecanismos epigenéticos podem resultar na ativação ou inibição inadequada de vários genes e alterar a fisiologia celular normal, levando ao desenvolvimento de doenças (103, 104). Recentemente, mecanismos epigenéticos foram associados à patologia do diabetes (105, 106). Além disto, a acetilação de histonas parece ser um importante fator associado ao desenvolvimento do diabetes e suas complicações (107).

Estudos experimentais demonstraram que a restrição do crescimento fetal, relacionada ao desenvolvimento do diabetes, podem induzir modificações epigenéticas através da ação da enzima HDAC no gene do transportador de glicose (GLUT 4), reduzindo sua transcrição nos músculos esqueléticos (108). Além disso, a hiperglicemia pode estimular a expressão do gene da insulina através da hiperacetilação da histona H4, portanto a alteração dos níveis de acetilação de histonas pode ser uma das causas de insuficiência de insulina (109).

Neste contexto, as modificações das HDACs em modelos animais induzem uma redução na acetilação das histonas H3 e H4 no fator de transcrição homeobox pancreático e duodenal 1 (Pdx-1), o qual exerce importante papel no desenvolvimento e função das células β pancreáticas, levando a defeitos na homeostase da glicose, assim como, na resistência à insulina (109, 110).

Os diferentes tipos de HDAC podem influenciar na patologia do diabetes de maneiras distintas por exemplo a HDAC1 está relacionada com a resistência à insulina, a HDAC 3 está envolvida na ligação do NFkB ao DNA, a qual é induzida por citocinas e ainda, ambas HDAC 1 e 3 são necessárias para a morte das células β pancreáticas induzida por citocinas (110, 111). A atividade da enzima HDAC global pode modular as respostas pró-inflamatórias através da transcrição do NFkB (112). Além disto, a HDAC11 foi associada à repressão da expressão do gene da interleucina anti-inflamatória (IL-10) (113).

A HDAC tem sido o novo alvo molecular no controle da obesidade e DMT2 (114), um grande número de inibidores da HDAC estão sendo pesquisados, na busca de novos tratamentos para o diabetes (106). Supõe-se que a inibição da HDAC atua na expressão do gene pré-insulina ou de genes envolvidos na secreção de insulina, protegendo contra a redução na secreção de insulina induzida por citocinas pró-inflamatórias (115). Ainda neste contexto, a inibição da HDAC pode proteger as células β pancreáticas da ação nociva das citocinas pró-inflamatórias. Além disso, foi demonstrado que inibição desta enzima pode ser eficiente no tratamento das complicações do diabetes, como nefropatia e retinopatia (115-117).

2.2 Exercício físico

2.2.1 Exercício físico e diabetes

O exercício físico, sobretudo o exercício aeróbico e regular, protege contra o desenvolvimento e a progressão de inúmeras doenças crônicas, entre elas a hipertensão, obesidade e DMT2 (118-120). Ainda, a inatividade física é um dos principais fatores de risco para o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis (121). O exercício físico influencia de maneira positiva a composição corporal, preservando ou aumentando a massa magra e estimulando a perda de massa gorda, além de exercer efeitos no balanço inflamatório, na sensibilidade à insulina e no perfil lipídico (122-124).

Os programas de treinamento para os indivíduos diabéticos visam primeiramente o controle glicêmico, lipídico e pressórico, para prevenir e retardar as complicações crônicas características da doença (41). Além disso, Wisse e colaboradores (125) demonstraram que a prescrição de uma atividade física para indivíduos diabéticos tipo 2 não é suficiente para melhorar o perfil glicêmico, sugerindo que para obter os resultados desejados existe a necessidade de cuidados na prescrição do treinamento. Assim, as variáveis como frequência, duração e intensidade devem ser manipuladas cuidadosamente de forma progressiva, gradual e respeitando as características individuais, para evitar o “overtraining”, que ocorre quando o organismo é submetido a uma sobrecarga exagerada impedindo as adaptações fisiológicas, causando estagnação ou perda significativa de desempenho (126), o que normalmente afasta o praticante precocemente do treinamento (127, 128).

A periodização é a divisão organizada do treinamento com objetivos traçados previamente e consiste em uma divisão do tempo em pequenos segmentos, denominados fases (129-131). Existem diferentes tipos de periodização, entre eles estão o método de aumento de carga por degrau (elevação em forma de escada); ondulatório (aumento de carga em ondas crescentes); linear (aumento de carga contínuo até o máximo e manutenção) e o contínuo (sempre a mesma carga) (128, 132).

O exercício periodizado permite que um grupo de indivíduos que apresentam diferentes estados de condicionamento realize o treinamento em conjunto, pois como considera de forma

individual, enquanto alguns realizam o treinamento caminhando outros podem estar correndo, de acordo com a frequência cardíaca indicada.

Além disso, é importante que o exercício para indivíduos diabéticos tipo 2 seja prescrito conforme o segundo limiar ventilatório, o qual é obtido no teste de esforço máximo, pois esse intervalo de treinamento apresenta menor risco de complicações.

Outros fatores importantes na prescrição do treino são o tipo de exercício e o ambiente onde será realizado. Exercícios realizados em ambiente terrestre, encontram-se como uma das principais alternativas prescritas para os indivíduos diabéticos. Este meio representa uma vantagem pela facilidade de acesso, além de apresentarem efeitos benéficos no sistema cardiorrespiratório e metabólico (27, 28, 133). No entanto, além dos exercícios em ambiente terrestre os exercícios em meio aquático também aparecem como uma possibilidade para essa população, principalmente para os indivíduos acometidos por dor, problemas de equilíbrio e limitações locomotoras (134, 135). Cabe destacar que as propriedades físicas da água proporcionam uma menor força de compressão com menor impacto sobre o sistema musculoesquelético podendo minimizar as lesões (31, 32).). Dentre os exercícios em ambiente aquático a natação tem sido a modalidade mais praticada, no entanto existem os que são realizados em posição vertical, como a caminhada em piscina rasa ou esteiras subaquáticas, a hidroginástica e a corrida em piscina funda (33).

A corrida em piscina funda se caracteriza em uma corrida simulada em uma piscina funda, estando os indivíduos auxiliados por um dispositivo flutuador (colete) que fornece a flutuabilidade necessária para que a imersão seja até o nível do processo xifóide (136). Além disso, supõe-se que as propriedades físicas da água alterem parâmetros moleculares ligados a patologia do DMT2 como o estado oxidativo (137), contribuindo com a prevenção das manifestações dessa patologia.

2.2.2 Exercício físico e o estado oxidativo

Foi demonstrado que o exercício físico representa uma estratégia terapêutica na redução da incidência de doenças crônicas degenerativas, como o DMT2 (121). O exercício físico é capaz de modificar o estado oxidativo celular, indicando este como um possível mecanismo de ação do efeito benéfico do exercício (138). O exercício pode alterar este estado oxidativo de formas

distintas envolvendo desde a produção de espécies reativas, os quais podem agir sobre a integridade da membrana celular com mudanças na lipoperoxidação e na ação de enzimas antioxidantes que influenciam no equilíbrio deste sistema (10).

Foi proposto que o exercício físico agudo atua como um fator de estresse que estimula o consumo de O₂ pelos tecidos aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (139, 140). Entretanto, o treinamento crônico, caracterizado por exposições repetidas ao exercício, pode induzir adaptações benéficas resultando no aumento da capacidade antioxidante (138, 141). No entanto, outros estudos têm mostrado que o exercício pode não alterar marcadores do estado oxidativo celular tanto em exercício agudo como crônico (142-144). Brinkmann e colaboradores (145) observaram um aumento no nível de marcadores de dano oxidativo, como os isoprostanos em obesos/diabéticos durante uma única sessão de exercício, retornando a níveis basais logo após o término da sessão. Entretanto, também foi descrito que o treinamento crônico pode reduzir a lipoperoxidação em indivíduos diabéticos ou sedentários (19, 146). Assim, os achados na literatura sobre os efeitos do exercício físico crônico e agudo sobre os marcadores do estado oxidativo celular são contraditórios.

Além dos marcadores de dano oxidativo, as defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas também podem sofrer adaptações frente ao exercício, tanto agudo quanto crônico, sobretudo as enzimas SOD, CAT e a GPX (147). Foi demonstrado que a atividade eritrocitária e músculo-esquelética das enzimas SOD e GPX e a TRAP plasmática são superiores em indivíduos atletas comparados aos indivíduos destreinados (148). Outro estudo, sugere um decréscimo na atividade das enzimas antioxidantes após realização de exercício em mulheres saudáveis (149). Atalay (150) relatou que o exercício moderado não causa alteração na atividade das enzimas antioxidantes em homens jovens diabéticos. Entretanto o exercício aeróbico agudo ou crônico aumentou a atividades das enzimas antioxidantes em diabéticos (10, 151). Uma interpretação sobre as divergentes respostas ao exercício sobre a atividade antioxidante é o fato de que o estado basal dos indivíduos pode influenciar na resposta ao exercício.

As divergências dos resultados apontam para uma relação bastante complexa entre o exercício e a atividade antioxidante o que nos indica que é indispensável uma melhor compreensão desses mecanismos.

Ainda, apesar dos inúmeros estudos que relatam o efeito benéfico do exercício nesses pacientes, poucos investigam o efeito da periodização assim como o efeito do ambiente aquático sobre os mecanismos moleculares que medeiam este processo.

2.2.3 Exercício físico e inflamação

Foi relatado que o efeito benéfico do exercício físico em pacientes diabéticos pode estar associado à modulação sobre marcadores inflamatórios (152).

A duração e intensidade do exercício são fatores primordiais para um perfil da resposta das citocinas pós-exercício. Uma única sessão de exercício pode levar ao aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (153-155). Sugere-se que esta resposta é acompanhada por um mecanismo de adaptação que induz um aumento das citocinas anti-inflamatórias (156). As citocinas podem responder de forma distinta aos estímulos, a IL-1 parece ser mais sensível à intensidade do exercício, enquanto TNF- α e IL-6 são mais sensíveis à duração do exercício (157) (158).

Estudos descrevem que o exercício regular reduz as citocinas pró-inflamatórias e aumenta as citocinas anti-inflamatórias (81, 159). O suposto efeito do exercício crônico e regular sobre os níveis dos marcadores inflamatórios tem sido utilizado como um importante fator para a recomendação do exercício físico como uma terapia nas doenças inflamatórias, como o diabetes (152).

Sugere-se que a IL-6 é a primeira citocina a ter suas concentrações aumentadas em resposta ao exercício, que pode ser seguida por aumento nas concentrações de TNF e IL-1 (160-162). Entretanto a IL-6 pode exercer uma atividade pró-inflamatória assim como anti-inflamatória, dependendo das circunstâncias que é liberada, que pode ser do músculo esquelético ou do tecido adiposo (92, 155), além disso, o aumento da sua concentração em resposta exercício pode ser transitório, retornando a níveis basais logo após o término da atividade (161).

A resposta pró-inflamatória ao exercício pode ser seguida de um aumento nas concentrações de IL-10, que exerce um papel anti-inflamatório (163). Neste contexto, podemos citar o estudo de Kadoglou e colaboradores (164), onde foi observado o aumento no nível de IL-

10 após 6 meses de treinamento aeróbico moderado realizado por indivíduos diabéticos. Cabe destacar que a IL-10 é considerada um importante supressor das respostas inflamatórias e imunológicas, pois inibe a produção IL-1 e TNF (161, 165). Ainda, mudanças na cromatina podem estar associadas à ativação do gene da IL-10, incluído a acetilação de regiões promotoras específicas (166).

2.2.4 Exercício físico e epigenética

Tem sido proposto que o exercício físico provoca alterações na expressão de genes no músculo esquelético humano, como um mecanismo de adaptação. Muitas dessas mudanças na expressão gênica podem ocorrer através da alteração de parâmetros epigenéticos os quais estão relacionados aos processos metabólicos (25).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstram o efeito do exercício físico sobre parâmetros epigenéticos, como a acetilação de histonas em encéfalo de ratos Wistar (167, 168). Foi demonstrado que uma única sessão de exercício reduz a atividade global da enzima HDAC nesses animais (167). No entanto, apesar destas evidências e da recente associação entre os mecanismos epigenéticos e o desenvolvimento do diabetes (105, 106), estudos avaliando o impacto do exercício sobre a atividade global da enzima HDAC em diabéticos são raros.

A ação da enzima HDAC, no diabetes, pode estar ligada a redução da transcrição do gene do GLUT 4 nos músculos esqueléticos causando aumento da glicose sanguínea (108, 109). Nesse contexto, supõe-se que a HDAC5 regula a expressão do transportador de glicose GLUT-4 no músculo esquelético, interagindo com o fator de transcrição MEF2e causando uma desacetilação de GLUT4 o que resulta na redução da sua expressão em repouso (169, 170). Entretanto, o exercício físico pode inibir a HDAC5 estimulando a expressão do transportador de glicose GLUT4 (25, 171).

Cabe descrever que outra enzima da classe HDACs II, a HDAC 4 pode estar associada com a modulação metabólica regulando a expressão do GLUT 4 (172). Além disso, foi demonstrado que a enzima HDAC4 está diminuída em obesos resistentes a insulina, entretanto a prática de exercício físico pode levar ao aumento na expressão desta enzima, através da inibição do NF-kB e conseqüentemente diminuir a resistência à insulina nestes indivíduos (173).

Apesar destes achados, de nosso conhecimento, existem poucos estudos que avaliem o efeito do exercício físico em diferentes ambientes em pacientes diabéticos (137), assim como também o treinamento periodizado.

Além disso, existe a necessidade de estimular a adesão desses indivíduos aos tratamentos não farmacológicos, como o exercício físico. Neste contexto, torna-se fundamental elucidar de que forma o exercício físico realizado em diferentes meios, pode influenciar, de maneira aguda ou crônica, os relacionados ao desenvolvimento do DMT2 e suas complicações.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Primário

Analisar o efeito do treinamento aeróbico periodizado realizado em ambiente aquático e terrestre sobre parâmetros do estado oxidativo, inflamatórios e epigenéticos em sangue periférico de sujeitos com diabetes mellitus tipo 2.

3.2 Objetivos secundários

1 Avaliar o efeito agudo da sessão única de exercício, o efeito crônico do treinamento aeróbico periodizado e o efeito agudo do treinamento sobre o conteúdo plasmático de espécies reativas em pacientes com DMT2.

2 Avaliar o efeito agudo da sessão única de exercício, o efeito crônico do treinamento aeróbico periodizado e o efeito agudo do treinamento sobre a lipoperoxidação, através da quantificação de 8-isoprostanos e de substâncias fluorescentes, em plasma de pacientes com DMT2.

3 Avaliar o efeito agudo da sessão única de exercício, o efeito crônico do treinamento aeróbico periodizado e o efeito agudo do treinamento sobre o dano oxidativo em proteínas, avaliado através da quantificação dos resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina, em plasma de pacientes com DMT2.

4 Avaliar o efeito agudo da sessão única de exercício, o efeito crônico do treinamento aeróbico periodizado e o efeito agudo do treinamento sobre a capacidade antioxidante, especificamente da atividade das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase, assim como, a capacidade antioxidante total, em eritrócitos de pacientes com DMT2.

5 Avaliar o efeito agudo da sessão única, o efeito crônico do treinamento aeróbico periodizado e o efeito agudo do treinamento sobre os níveis de interleucina 6, interleucina 1 β e interleucina 10 em plasma de pacientes com DMT2.

6 Avaliar o efeito agudo da sessão única de exercício, o efeito crônico do treinamento aeróbico periodizado e o efeito agudo do treinamento sobre a atividade global da enzima histona desacetilase em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com DMT2.

4. Referencias Bibliográficas

1. Association AD. Standards of medical care in diabetes--2008. *Diabetes care*. 2008;31:S12.
2. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(4):473-81.
3. Skyler JS. Effects of glycemic control on diabetes complications and on the prevention of diabetes. *Clinical diabetes*. 2004;22(4):162-6.
4. Machado UF, Schaan BD, Seraphim PM. Glucose transporters in the metabolic syndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006;50(2):177-89.
5. Barone B, Rodacki M, Cenci MCP, Zajdenverg L, Milech A, Oliveira JEPd. Cetoacidose diabética em adultos: atualização de uma complicação antiga:[revisão]. *Arq bras endocrinol metab*. 2007;51(9):1434-47.
6. Wright E, Scism-Bacon J, Glass L. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *International journal of clinical practice*. 2006;60(3):308-14.
7. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *European journal of clinical investigation*. 2004;34(12):785-96.
8. Rahman I, Marwick J, Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and pro-inflammatory gene expression. *Biochemical pharmacology*. 2004;68(6):1255-67.
9. Maritim A, Sanders R, Watkins rJ. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2003;17(1):24-38.

10. Kostic N, Caparevic Z, Marina D, Ilic S, Radojkovic J, Cosic Z, et al. Clinical evaluation of oxidative stress in patients with diabetes mellitus type II -- impact of acute exercise. *Vojnosanit Pregl.* 2009 Jun;66(6):459-64.
11. Pan HZ, Zhang H, Chang D, Li H, Sui H. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2008 Apr;92(4):548-51.
12. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;28(3):10-9.
13. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in immunology.* 2004;25(1):4-7.
14. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frölich M, Bootsma-van der Wiel A, Westendorp RG. Low Production Capacity of Interleukin-10 Associates With the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes The Leiden 85-Plus Study. *Diabetes.* 2002;51(4):1088-92.
15. Donath MY, Schumann DM, Faulenbach M, Ellingsgaard H, Perren A, Ehses JA. Islet Inflammation in Type 2 Diabetes From metabolic stress to therapy. *Diabetes care.* 2008;31(Supplement 2):S161-S4.
16. Ji H, Khurana Hershey GK. Genetic and epigenetic influence on the response to environmental particulate matter. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2012;129(1):33-41.
17. Wang X, Wei X, Pang Q, Yi F. Histone deacetylases and their inhibitors: molecular mechanisms and therapeutic implications in diabetes mellitus. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2012;2(4):387-95.
18. Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen LK, Mustonen J, Sen CK, Lakka TA, et al. Aerobic exercise and the lipid profile in type 1 diabetic men: a randomized controlled trial. *Medicine and science in sports and exercise.* 2000;32(9):1541-8.

19. Gordon LA, Morrison EY, McGrowder DA, Young R, Fraser YT, Zamora EM, et al. Effect of exercise therapy on lipid profile and oxidative stress indicators in patients with type 2 diabetes. *BMC Complement Altern Med.* 2008;8:21.
20. Derouich M, Boutayeb A. The effect of physical exercise on the dynamics of glucose and insulin. *Journal of Biomechanics.* 2002;35(7):911-7.
21. Cuff DJ, Meneilly GS, Martin A, Ignaszewski A, Tildesley HD, Frohlich JJ. Effective exercise modality to reduce insulin resistance in women with type 2 diabetes. *Diabetes care.* 2003;26(11):2977-82.
22. Dubow JS, Kelly JP. Epilepsy in sports and recreation. *Sports Medicine.* 2003;33(7):499-516.
23. Golbidi S, Mesdaghinia A, Laher I. Exercise in the metabolic syndrome. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2012;2012.
24. Pedersen BK. Exercise and cytokines. *Immunology and cell biology.* 2000;78(5):532-5.
25. McGee SL, Hargreaves M. Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. *Clinical and experimental pharmacology and physiology.* 2006;33(4):395-9.
26. Narath E, Skalicky M, Viidik A. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Experimental gerontology.* 2001;36(10):1699-711.
27. Monteiro LZ, Fiani CRV, Freitas MCFd, Zanetti ML, Foss MC. Decrease in blood pressure, body mass index and glycemia after aerobic training in elderly women with type 2 diabetes. *Arquivos brasileiros de cardiologia.* 2010;95(5):563-70.
28. Belli T, Ribeiro LFP, Ackermann MA, Baldissera V, Gobatto CA, Galdino da Silva R. Effects of 12-week overground walking training at ventilatory threshold velocity in type 2 diabetic women. *Diabetes research and clinical practice.* 2011;93(3):337-43.

29. Bello AI, Owusu-Boakye E, Adegoke BO, Adjei DN. Effects of aerobic exercise on selected physiological parameters and quality of life in patients with type 2 diabetes mellitus. *International journal of general medicine*. 2011;4:723.
30. Silva EMD, Krueel LFM. Caminhada em ambiente aquático e terrestre: revisão de literatura sobre a comparação das respostas neuromusculares e cardiorrespiratórias. *Rev Bras Med Esporte*. 2008;14(6).
31. Alberton CL, Finatto P, Pinto SS, Antunes AH, Cadore EL, Krueel LFM. Comparação das respostas cardiorrespiratórias de repouso entre os meios terrestre e aquático. *Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde*. 2013;18(3):387.
32. Bgeginski R, Finkelstein I, Alberton CL, Tartaruga MP, Krueel LFM. Effects of water-gymnastics training on hemodynamic variables in pregnant women at rest. *International Journal of Aquatic Research and Education*. 2009;3:151-61.
33. Alberton CL, Krueel LFM. Influência da imersão nas respostas cardiorrespiratórias em repouso. *Revista brasileira de medicina do esporte São Paulo* Vol 15, n 3 (maio/jun 2009), p 228-232. 2009.
34. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*. 2004;27(5):1047-53.
35. Costa GLd, Andrade ESd, Guilherme FJdA, Ferreira RKR. A CRIAÇÃO DE UMA CARTILHA EDUCATIVA PARA ESTIMULAR A ADESÃO AO TRATAMENTO DO PORTADOR DE DIABETES MELLITUS TIPO 2. *Revista Rede de Cuidados em Saúde*. 2014;8(2).
36. Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA*. 2001;286(10):1218-27.
37. Cambri LT, Souza Md, Mannrich G, Cruz ROd, Gevaerd MdS. Perfil lipídico, dislipidemias e exercícios físicos. *Rev bras cineantropom desempenho hum*. 2006;8(3).

38. Association AD. Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes care*. 2012;35:S11.
39. Atlas ID. 6th edn. International Diabetes Federation--Brussels, Belgium. 2013:160.
40. Arsa G, Lima L, Almeida S, Moreira SR, Campbell CSG, Simões HG. Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum*. 2009;11(1):103-11.
41. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, et al. Exercise and type 2 diabetes the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes care*. 2010;33(12):e147-e67.
42. Alberti KGM, Zimmet P, Shaw J. International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention. *Diabetic medicine*. 2007;24(5):451-63.
43. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*. 2005;365(9467):1333-46.
44. Lyra R, Oliveira M, Lins D, Cavalcanti N. Prevention of type 2 diabetes mellitus. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006;50(2):239-49.
45. Schaan BDA, Silva AMVd, Irigoyen MC. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus and insulin resistance states: role of oxidative stress and potential therapeutic opportunities. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2010;54(6):514-5.
46. Marcondes JAM. Diabete melito: Fisiopatologia e tratamento. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba ISSN (impresso) 1517-8242 (eletrônico) 1984-4840*. 2003;5(1):18-26.
47. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189(1):41-54.
48. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012 Jan;5(1):9-19.

49. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JdF, Manfredini V, Benfato MdS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30(5):1323-38.
50. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular diabetology*. 2005;4(1):5.
51. Sies H. What is oxidative stress? *Oxidative stress and vascular disease*: Springer; 2000. p. 1-8.
52. Golbidi S, Alireza Ebadi S, Laher I. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Current diabetes reviews*. 2011;7(2):106-25.
53. Karunakaran U, Park K-G. 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.
54. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. 2010;107(9):1058-70.
55. Wajchenberg BL. Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2. *Arq bras endocrinol metab*. 2002;46(5):514-9.
56. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism*. 1995;44(3):363-8.
57. Kostić N, Čaparević Z, Marina Đ, Ilić S, Radojković J, Ćosić Z, et al. Clinical evaluation of oxidative stress in patients with diabetes mellitus type II--impact of acute exercise. *Vojnosanitetski Pregled: Military Medical & Pharmaceutical Journal of Serbia & Montenegro*. 2009;66(6).
58. Lima E, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;37(3):293-303.

59. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. 1993;57(5):715S-24S.
60. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(1):668-76.
61. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free radical research*. 2010;44(10):1098-124.
62. Sachdev S, Davies KJ. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;44(2):215-23.
63. Kaviarasan S, Muniandy S, Qvist R, Ismail IS. F2-isoprostanes as novel biomarkers for type 2 diabetes: a review. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2009;45(1):1.
64. Cimbaljevic B, Vasilijevic A, Cimbaljevic S, Buzadzic B, Korac A, Petrovic V, et al. Interrelationship of antioxidative status, lipid peroxidation, and lipid profile in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetic patients. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2007;85(10):997-1003.
65. 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.
66. Milatovic D, Montine TJ, Aschner M. Prostanoid signaling: Dual role for prostaglandin E₂ in neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2011;32(3):312-9.
67. Davy G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F_{2a} and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999;99:224-9.
68. Halliwell B, Gutteridge J. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology and medicine*. 2007;4.

69. Requena JR, Chao C-C, Levine RL, Stadtman ER. Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(1):69-74.
70. Stadtman E, Levine R. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids*. 2003;25(3-4):207-18.
71. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 2006;141(2):312-22.
72. Matés J. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;153(1-3):83-104.
73. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*. 2004;36(1):1-9.
74. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003;57(3):145-55.
75. Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;18(1):29-36.
76. Peerapatdit T, Sriratanasathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *J Med Assoc Thai*. 2010;93(6):682-93.
77. Feng B, Ruiz MA, Chakrabarti S. Oxidative-stress-induced epigenetic changes in chronic diabetic complications 1. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2012;91(3):213-20.
78. Garcia C, Fève B, Ferre P, Halimi S, Baizri H, Bordier L, et al. Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes & metabolism*. 2010;36(5):327-38.

79. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a001651.
80. Burger D, DAYER JM. Cytokines, Acute-Phase Proteins, and Hormones. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2002;966(1):464-73.
81. Hopps E, Canino B, Caimi G. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. *Acta diabetologica.* 2011;48(3):183-9.
82. Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Katakami N, Ohtoshi K, Gorogawa S-I, Kuroda A, et al. Elevated C-reactive protein associates with early-stage carotid atherosclerosis in young subjects with type 1 diabetes. *Diabetes care.* 2002;25(8):1432-8.
83. Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Medicine.* 2001;31(2):115-44.
84. Belotto M, Magdalon J, Rodrigues H, Vinolo M, Curi R, Pithon-Curi T, et al. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clinical & Experimental Immunology.* 2010;162(2):237-43.
85. Smith LL. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Medicine and science in sports and exercise.* 2000;32(2):317-31.
86. Newsholme P, Krause M. Nutritional regulation of insulin secretion: implications for diabetes. *The Clinical Biochemist Reviews.* 2012;33(2):35.
87. Carvalho MHCd, Colaço AL, Fortes ZB. Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2006;50(2):304-12.
88. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circulation research.* 2003;93(12):1159-69.

89. Kajitani N, Shikata K, Nakamura A, Nakatou T, Hiramatsu M, Makino H. Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;88(2):171-6.
90. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(5):1111-9.
91. Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*. 2009;4(47):1-13.
92. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*. 2003;52(3):812-7.
93. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*. 2001;19(1):683-765.
94. Strackowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Krukowska A, Gorska M. Plasma interleukin-10 concentration is positively related to insulin sensitivity in young healthy individuals. *Diabetes care*. 2005;28(8):2036-7.
95. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of periodontology*. 2008;79(8S):1527-34.
96. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007;447(7143):396-8.
97. Cortés-Mendoza J, Díaz de León-Guerrero S, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L. Shaping synaptic plasticity: the role of activity-mediated epigenetic regulation on gene transcription. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2013;31(6):359-69.
98. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-5.

99. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
100. Gräff J, Mansuy IM. Epigenetic codes in cognition and behaviour. *Behavioural brain research*. 2008;192(1):70-87.
101. Fagiolini M, Jensen CL, Champagne FA. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Current opinion in neurobiology*. 2009;19(2):207-12.
102. Oiso H, Furukawa N, Suefuji M, Shimoda S, Ito A, Furumai R, et al. The role of class I histone deacetylase (HDAC) on gluconeogenesis in liver. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(1):166-72.
103. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
104. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36.
105. Gray SG, De Meyts P. Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2005;21(5):416-33.
106. Christensen DP, Dahllöf M, Lundh M, Rasmussen DN, Nielsen MD, Billestrup N, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Molecular Medicine*. 2011;17(5-6):378.
107. Villeneuve LM, Natarajan R. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010;299(1):F14-F25.
108. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamotharan M, Devaskar SU. Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J Biol Chem*. 2008 May 16;283(20):13611-26.
109. Mosley AL, Ozcan S. Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4. *J Biol Chem*. 2003 May 30;278(22):19660-6.

110. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of *Pdx1*. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(6):2316-24.
111. Lundh M, Christensen DP, Damgaard Nielsen M, Richardson SJ, Dahllof MS, Skovgaard T, et al. Histone deacetylases 1 and 3 but not 2 mediate cytokine-induced beta cell apoptosis in INS-1 cells and dispersed primary islets from rats and are differentially regulated in the islets of type 1 diabetic children. *Diabetologia*. 2012 Sep;55(9):2421-31.
112. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(1):7-11.
113. Villagra A, Cheng F, Wang H-W, Suarez I, Glozak M, Maurin M, et al. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nature immunology*. 2008;10(1):92-100.
114. Ye J. Improving insulin sensitivity with HDAC inhibitor. *Diabetes*. 2013 Mar;62(3):685-7.
115. Larsen L, Tonnesen M, Ronn S, Størling J, Jørgensen S, Mascagni P, et al. Inhibition of histone deacetylases prevents cytokine-induced toxicity in beta cells. *Diabetologia*. 2007;50(4):779-89.
116. Lee H, Noh H, Seo J, Yu M, Ha H. Histone deacetylase inhibitors: a novel class of therapeutic agents in diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2007;72:S61-S6.
117. Zhong Q, Kowluru RA. Role of histone acetylation in the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon. *J Cell Biochem*. 2010 Aug 15;110(6):1306-13.
118. Hansen KC, Zhang Z, Gomez T, Adams AK, Schoeller DA. Exercise increases the proportion of fat utilization during short-term consumption of a high-fat diet. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85(1):109-16.

119. Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, Fernando F, Cavallo S, Cardelli P, et al. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2010;20(8):608-17.
120. Myers J. Exercise and cardiovascular health. *Circulation*. 2003;107(1):e2-e5.
121. Vadstrup ES, Frølich A, Perrild H, Borg E, Røder M. Lifestyle intervention for type 2 diabetes patients—trial protocol of The Copenhagen Type 2 Diabetes Rehabilitation Project. *BMC Public Health*. 2009;9(1):166.
122. Bassuk SS, Manson JE. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Journal of Applied Physiology*. 2005;99(3):1193-204.
123. Iborra R, Ribeiro I, Neves M, Charf A, Lottenberg S, Negrão C, et al. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2008;18(6):742-50.
124. Church TS, Blair SN, Cocroham S, Johannsen N, Johnson W, Kramer K, et al. Effects of aerobic and resistance training on hemoglobin A1c levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Nov 24;304(20):2253-62.
125. Wisse W, Rookhuizen MB, de Kruif MD, van Rossum J, Jordans I, ten Cate H, et al. Prescription of physical activity is not sufficient to change sedentary behavior and improve glycemic control in type 2 diabetes patients. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;88(2):e10-e3.
126. Kuipers H. How much is too much? Performance aspects of overtraining. *Research Quarterly for Exercise and Sport*. 1996;67(sup3):S-65-S-9.
127. Haskell WL, Lee I-M, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*. 2007;116(9):1081.

128. Perez AJ. Effects of different periodization models of aerobic training on cardiovascular parameters, metabolic and body composition in military firefighters. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*. 2013;27(3):363-76.
129. Bompa TO, Haff G. *Periodization: Theory and methodology of training: Human Kinetics* Champaign, IL; 1999.
130. Bompa T. *Periodização. Teoria e metodologia do treinamento 4ª edição* Guarulhos: Phorte editora. 2002.
131. Kiely J. Periodization paradigms in the 21st century: evidence-led or tradition-driven. *Int J Sports Physiol Perform*. 2012;7(3):242-50.
132. Issurin VB. New horizons for the methodology and physiology of training periodization. *Sports Med*. 2010 Mar 1;40(3):189-206.
133. Karstoft K, Winding K, Knudsen SH, Nielsen JS, Thomsen C, Pedersen BK, et al. The Effects of Free-Living Interval-Walking Training on Glycemic Control, Body Composition, and Physical Fitness in Type 2 Diabetic Patients A randomized, controlled trial. *Diabetes care*. 2013;36(2):228-36.
134. Sheldahl L, Wann L, Clifford P, Tristani F, Wolf L, Kalbfleisch J. Effect of central hypervolemia on cardiac performance during exercise. *Journal of Applied Physiology*. 1984;57(6):1662-7.
135. Miyoshi T, Shirota T, Yamamoto S-I, Nakazawa K, Akai M. Effect of the walking speed to the lower limb joint angular displacements, joint moments and ground reaction forces during walking in water. *Disability & Rehabilitation*. 2004;26(12):724-32.
136. Kruegel LF, Beilke DD, Kanitz AC, Alberton CL, Antunes AH, Pantoja PD, et al. Cardiorespiratory responses to stationary running in water and on land. *J Sports Sci Med*. 2013;12(3):594-600.
137. Nuttamonwarakul A, Amatyakul S, Suksom D. Effects of Water-Based Versus Land-Based Exercise Training on Cutaneous Microvascular Reactivity and C-Reactive Protein in

Older Women with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Exercise Physiology Online*. 2014;17(4).

138. Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and cellular biochemistry*. 2003;253(1-2):307-12.

139. Cooper C, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson M. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 2002;30(2):280-4.

140. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *European journal of clinical investigation*. 2003;33(10):924-30.

141. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;44(2):153-9.

142. Mori TA, Dunstan DW, Burke V, Croft KD, Rivera JH, Beilin LJ, et al. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F₂-isoprostane excretion in non—insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*. 1999;48(11):1402-8.

143. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress. *Sports Medicine*. 2005;35(12):1045-62.

144. Arikawa AY, Thomas W, Gross M, Smith A, Phipps WR, Kurzer MS, et al. Aerobic training reduces systemic oxidative stress in young women with elevated levels of F₂-isoprostanes. *Contemporary clinical trials*. 2013;34(2):212-7.

145. Brinkmann C, Blossfeld J, Pesch M, Krone B, Wiesiollek K, Capin D, et al. Lipid-peroxidation and peroxiredoxin-overoxidation in the erythrocytes of non-insulin-dependent type 2 diabetic men during acute exercise. *European journal of applied physiology*. 2012;112(6):2277-87.

146. Campbell PT, Gross MD, Potter JD, Schmitz KH, Duggan C, McTiernan A, et al. Effect of exercise on oxidative stress: a 12-month randomized, controlled trial. *Medicine and science in sports and exercise*. 2010;42(8):1448.

147. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Experimental Biology and medicine*. 1999;222(3):283-92.
148. Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Belló-Klein A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. *Canadian journal of applied physiology*. 2005;30(6):723-34.
149. Akova B, Sürmen-Gür E, Gür H, Dirican M, Sarandöl E, Küçükoglu S. Exercise-induced oxidative stress and muscle performance in healthy women: role of vitamin E supplementation and endogenous oestradiol. *European journal of applied physiology*. 2001;84(1-2):141-7.
150. Atalay M, Laaksonen D, Niskanen L, Uusitupa M, Hänninen O, Sen C. Altered antioxidant enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1997;161(2):195-201.
151. 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 2012/04/01;37(2):334-44.
152. 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.
153. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological reviews*. 2000;80(3):1055-81.
154. Kasapis C, Thompson PD. The Effects of Physical Activity on Serum C-Reactive Protein and Inflammatory MarkersA Systematic Review. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45(10):1563-9.
155. Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103(2):693-9.

156. Fallon K, Fallon S, Boston T. The acute phase response and exercise: court and field sports. *British Journal of Sports Medicine*. 2001;35(3):170-3.
157. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance. *Exerc Immunol Rev*. 2006;12(6).
158. Steinacker JM, Lormes W, Reissnecker S, Liu Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. *European journal of applied physiology*. 2004;91(4):382-91.
159. Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio MA, Pedersen BK. IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2002;283(6):E1272-E8.
160. Keller C, Steensberg A, Hansen AK, Fischer CP, Plomgaard P, Pedersen BK. Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2005;99(6):2075-9.
161. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2005;98(4):1154-62.
162. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews*. 2008;88(4):1379-406.
163. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2003;285(2):E433-E7.
164. Kadoglou NP, Iliadis F, Angelopoulou N, Perrea D, Ampatzidis G, Liapis CD, et al. The anti-inflammatory effects of exercise training in patients with type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2007;14(6):837-43.
165. Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M. The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *European journal of applied physiology*. 2013;113(7):1839-48.

166. McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 2009;587(24):5951-8.
167. Elsner V, Lovatel G, Bertoldi K, Vanzella C, Santos F, Spindler C, et al. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience*. 2011;192:580-7.
168. Spindler C, Cechinel LR, Basso C, Moysés F, Bertoldi K, Roesler R, et al. Treadmill Exercise Alters Histone Acetyltransferases and Histone Deacetylases Activities in Frontal Cortices from Wistar Rats. *Cellular and molecular neurobiology*. 2014;34(8):1097-101.
169. Holmes B, Dohm GL. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise. *MEDICINE AND SCIENCE IN SPORTS AND EXERCISE*. 2004;36(7):1202-6.
170. Holmes BF, Sparling DP, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2005;289(6):E1071-E6.
171. Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(4):1711-6.
172. Weems JC, Griesel BA, Olson AL. Class II histone deacetylases downregulate GLUT4 transcription in response to increased cAMP signaling in cultured adipocytes and fasting mice. *Diabetes*. 2012;61(6):1404-14.
173. Abu-Farha M, Tiss A, Abubaker J, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, et al. Proteomics analysis of human obesity reveals the epigenetic factor HDAC4 as a potential target for obesity. *PLoS One*. 2013;8(9):e75342

5 Artigos em Inglês

5.1 Artigo 1

Acute and chronic effects of aerobic periodized exercise performed in different environments on oxidative status parameters in patients with type 2 diabetes

Arthiese Korb^a, Laura Reck Cechinel^b, Karine Bertoldi^b, Rodrigo Sudatti Dellevatti^c, Felipe dos Santos Moysés^b, Carla Basso^b, Luis Fernando Martins Kruehl^c, Ionara Rodrigues Siqueira^{*a,b,d}

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^cPrograma de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul; ^dDepartamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do 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

The effect of periodized exercise performed in different environments on blood oxidative status in patients with type 2 diabetes yet remains poorly understood. Our purpose was to elucidate the acute and chronic effects of aerobic periodized training performed in aquatic and land environments on oxidative status parameters in patients with type 2 diabetes. Twenty-one type 2 diabetes patients were randomized and submitted to exercise in water or dry land environments by 12 weeks of periodized training consisting of four mesocycles. The intensities were determined by individual second ventilatory threshold, obtained through maximal effort test, performed in their specific training environment. Blood samples were collected before and after both first and last exercise sessions. We evaluated the reactive species content (evaluated by the DCF test), lipid peroxidation (assessed by 8-isoprostane levels and water-soluble fluorescent substance formation), protein damage (through tryptophan and tyrosine residues content) in plasma of patients with type 2 diabetes and the antioxidant enzyme activities were measured in erythrocytes of the same subjects. The total reactive antioxidant potential (TRAP) was measured in both plasma and erythrocytes samples. The results showed that exercise reduced acutely, after first and last session, the reactive species content and 8-isoprostane levels even in trained subjects in both environments. Exercise reduced antioxidant enzyme activities, without any effect on the total antioxidant potential. In conclusion, our data showed that periodised exercise performed in water and dry land environments decreases acutely free radical and 8-isoprostane levels in patients with type 2 diabetes.

Trial registration number NCT01956375. clinicaltrials.gov.

Key Words: TYPE 2 DIABETES MELLITUS; AEROBIC TRAINING; AQUATIC ENVIRONMENT; LAND ENVIRONMENT; OXIDATIVE STATUS; ISOPROSTANES; ANTIOXIDAT ENZYME.

Abbreviations:

ABAP	2,2'azobis(2-amidinopropanedihydrochloride
ANOVA	Analysis of Variance
CAT	Catalase
CNS	Brazilian National Health Council
CEP/UFRGS	Local Ethics Committee
DCFH-DA	2'-7'-dichlorofluorescein diacetate
DCF	Fluorescent derivative
DMT2	Type 2 diabetes mellitus
GPX	Glutatione peroxidase
K ₃ EDTA	Tripotassium ethylene diamine tetraacetic acid
SOD	Superoxide dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TRAP	Total reactive antioxidant potential
VT2	Second ventilatory threshold

Introduction

Exercise has been widely considered an effective non pharmacological approach to prevent, as well as to treat, type 2 diabetes mellitus, since it is able to reduce morbidity and health-care costs and can improve quality of life of patients (1, 2)

Although, the aerobic training has been usually prescribed for diabetes management (3), the effects of different modalities of exercise, such as aerobic, resistance training, or combination of both on biochemical and metabolic profile in patients with type 2 diabetes have been investigated (4-6).

However, despite a number of published manuscripts showing the exercise effects on cardiometabolic variables in patients with Type 2 diabetes (4-6) the frequency, mode, and intensity of training needed to optimize the outcomes are rarely evaluated. In this context, periodised training protocols may enhance gains, since individual variation is considered. This approach is characterized by increases in intensity over time. Despite periodised protocols are widely used in sports and fitness, studies on periodised training in type 2 diabetes are limited.

The aerobic exercise performed in land is commonly prescribed to patients with type 2 diabetes (7-10), nevertheless, aquatic exercise would generate a very minimal impact force and reduce effects of gravity (11). It is important to describe that studies evaluating the benefits of exercise performed in aquatic environment have described on variables of type 2 diabetes. Interestingly, patients exercised 3 times/week in swimming pool had significantly decreased the glycated hemoglobin (Hba1c), what can be associated with cardiovascular disease events (12-14). Although the mechanisms by which aquatic exercise alters metabolic profile in patients with type 2 diabetes are not clear, Nuttamonwarakul and colleagues (14) suggested the modulation on oxidative stress.

Free radicals may produce oxidative damage directly to biological molecules, generating several lipid peroxidation products, such as alkanes (mainly ethane and pentane), isoprostanes and aldehydes, including malondialdehyde, in biological samples (15). Several studies have demonstrated that aerobic exercise training is able to reduce lipid peroxidation evaluated using thiobarbituric acid reactive substances assay, a measurement of malondialdehyde in T2DM (14, 16, 17); however other authors did not find this outcome (Chen et al. 2010). The plasma fluorescent adducts formed by peroxidation-derived aldehydes and proteins, such malondialdehyde and LDL have been linked to type 2 diabetes (18). On the other hand, to our knowledge there are no studies reporting the impact of exercise on water-soluble fluorescent substances in patients with diabetes.

Brinkmann and colleagues (19), showed that erythrocyte 8-iso prostaglandin F₂ α , and isoprostane generated by non-enzymatic peroxidation of arachidonic acid increased during a single bouts of exercise and decreased in the recovery phase in overweight/obese patients with diabetes, then the impact of acute and chronic exercise on these parameters must be better investigated.

It has been hypothesized that beneficial effects of exercise are related to training-induced adaptations in cellular antioxidant status, since acute exercise could increase reactive species production (20) inducing an up regulation of antioxidant enzymes (21). On the other hand, controversial results have been found; Akova and colleagues (22) showed decreases on erythrocyte antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) activities post-exercise in healthy women.

Several studies have reported that the imbalance between antioxidants and mechanisms oxidants has a central role in the pathogenesis of diabetes (23, 24). Moreover, higher glucose blood levels contribute to glycation and consequently can alter antioxidant enzymes activities (25). In this

context, the effect of exercise on antioxidant enzymes activities has been evaluated, however the results are contradictory (26-28) pointing to a rather complex relationship to link exercise and the type 2 diabetes.

In order to elucidate the biochemical mechanisms involved in benefits induced by periodised exercise, the purpose of this study was to analyze the effects of periodised exercise on parameters of oxidative status, reactive species content and damage to macromolecules as well as the antioxidant capacity in patients with type 2 diabetes. Moreover, we also investigated the time course of the exercise effects, specifically, acute and chronic effects of exercise performed in aquatic and land environments.

Material and methods

Subjects. The patients were selected, as volunteers. The recruitment of the subjects was carried out by advertisement in a newspaper of general circulation, all subjects were sedentary with no regular physical activity (55-64 years) diagnosed with T2DM. Originally 35 patients were included in the study, were allocated in a water group (n=17) or a dry land group (n=18) through a blinded randomization performed by blocks and stratified by sex. The remaining in study only patients who complete more than 80% of the aerobic exercise sessions, water group (n = 11) and dry land group (n=10), 10 men and 11 women; mean age: 57.87 ± 8.5 years. 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).

Training. Patients underwent 12-week training programs with three weekly sessions, the exercise consisted in interval aerobic-training programs involving deep-water walking or running in swimming pool with a life vest (water group) or walking or running on a track (land group). In the aquatic environment, the water temperature ranged from 31–32°C and the immersion was up to the xiphoid process level (29). On land, the temperature ranged from 21–26°C. The intensity of the exercise was determined by the second ventilatory threshold (VT2) (29), obtained through maximal effort test, performed in each group in their specific training environment. The intensity varied over the weeks as the following: week 1-3, 7 cycles (3 min 85 - 90% VT2 and 2 min <85% VT2); week 4-6, 7 cycles (4 min 85 - 90% VT2 and 1 min <85% VT2); week 7-9, 7 cycles (4 min 90 - 95% VT2 and 1 min <85% VT2); 10-12, 7 cycles (4 min 95 - 100% VT2 and 1 min <85% VT2). Participants were asked to wear HR monitors (RSX 300, Polar) during exercise to control training intensity. Each individual was asked to read and report their heart rates to one of the three teachers who supervised the water- and land-based exercise sessions. Each teacher then used a table containing subjects' training heart rate ranges to provide a feedback on the recommended exercise intensity for each patient. Both programs had similar training periodization, with training environment being the main difference between them.

Table 1 presents the baseline characterization of subjects. Significant differences between the two groups were found only for body mass, BMI and Σ 8SF.

Blood samples. Whole blood was collected in tubes containing K₃EDTA or heparine, 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. The erythrocytes were washed 3 times with cold phosphate-buffered saline 0.9 N. For analyses of enzymatic antioxidant activity, HCl 1mM and MgSO₄ 4mM buffer diluted 50:500 (vol/vol) were added to erythrocytes (30), the

samples were frozen at -80°C (31), 100 μl of washed erythrocytes were lysated by hypotonic shock using 1 ml of distilled water to evaluate the total reactive antioxidant potential (TRAP).

In order to investigate the acute effect of a single session, samples were obtained before and after first session, besides the acute effect of last exercise session was evaluated, comparing results of samples collected of trained subjects before and after this session. In addition, chronic effect of 12 weeks training was investigated using samples collected before last session, without any effect of acute exercise.

Assays. To evaluate the reactive species content, it was used 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488 nm and 525 nm, respectively (32).

The lipid peroxidation was estimated by 8-isoprostane levels and water-soluble fluorescent substance determinations. The 8-isoprostanes content was determined using 8-Isoprostanes EIA kit (Cayman Chemical Company, USA) according to the manufacturer's instructions. The plasma fluorescent adducts formed between peroxidation-derived aldehydes and proteins were monitored fluorimetrically as described by Masako and colleagues (33). 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 (34) and intrinsic tyrosine fluorescence, the excitation and emission wavelengths were 277 and 320nm, respectively (35).

The glutathione peroxidase (GPX) activity was measured using tert-butyl-hydroperoxide as substrate at 340nm (36) Catalase (CAT) activity was assayed spectrophotometrically by

monitoring hydrogen peroxide decomposition at 240 nm (37). 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 generated by 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP). 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 a standard (38).

Protein determination. Protein was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard (39).

Statistics Analyses. All results were expressed as mean \pm S.D. Normality of distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variances were tested by Levene's tests. When data was not normally distributed, the results were transformed into base-10 logarithm. The results were analyzed by two -way analyses repeat measure of variance (ANOVA) followed by post-hoc least significant difference LSD. In all tests, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. Baseline differences were compared using Fischer exact test for categorical variables and unpaired t test for continuous variables. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 18.0.

Results

The effects of periodised training protocol performed in aquatic and land environments on oxidative status were investigated in patients with type 2 diabetes. In an effort to compare our findings with hypothesis reported in the literature that suggest an exercise-induced increases in free radical content, we investigated acute effect of a single session, comparing results of samples

obtained before and after first session. Additionally, the acute effect of exercise in trained subjects was investigated, since it was compared the effect of the last session in individuals submitted to 12 weeks training.

Surprisingly, reactive species content (DCF) was reduced after first session when compared to baseline levels in both environments. Besides, the last session of periodised training also acutely diminished this parameter (Figure 1). The exercise performed in water or dry land environments may impact similarly DCF levels in patients with type 2 diabetes.

ANOVA indicated an effect of exercise in the water and dry land group, where the exercise reduced acutely, after first and last session, the levels of 8-isoprostane in diabetic patients (Figure 2).

Results obtained before last session, without acute interference, was taken as the chronic effect of 12 weeks training. Chronic training reduced erythrocyte GPX activity in both environments comparing to baseline and single session measurements (Figure 3). The single session and chronic training reduced CAT and SOD activities (respectively, Figure 4 and Figure 5) in both environments.

The plasma fluorescent adducts content was unaltered by exercise in both environments, as well as tryptophan and tyrosine residues content, an index of protein damage, in patients with type 2 diabetes (data not show). The total antioxidant capacity (TRAP) was unchanged in both plasma and erythrocytes samples (data not show).

Discussion

To our knowledge, we describe here, for the first time, the impact of periodised exercise comparing aquatic and land environments on oxidative status in patients with type 2 diabetes.

The results presented here suggest acute exercise-induced benefits on oxidative parameters in both sedentary and trained patients with type 2 diabetes, since reactive species content and 8-isoprostane levels were reduced immediately after first and last session in both environments. This is relevant since the involvement of oxidative stress in the development and progression of diabetes and its complications is widely accepted (40).

It is possible to suggest that these declines can be related to a diminished reactive species production, instead of altering the antioxidant system, given that the acute exercise did not improve the total reactive antioxidant potential (TRAP) and antioxidant enzyme activities. These results did not agree with the hypothesis that acute exercise is able to increase reactive species content, at least in patients with diabetes (20), as well as the lipid peroxidation products levels inducing the oxidative stress (41).

This reduction on isoprostane levels is relevant because it was described higher levels of this marker in patients with type 2 diabetes (42). Although isoprostanes are generated mainly through non-enzymatic oxidation of arachidonic acid by reactive species, supporting their role as biomarkers of oxidative status, there are evidences suggesting that these compounds can also be derived, at least in part, from cyclooxygenase pathway (43). Considering that the role of inflammation process has been widely suggested in T2DM, we could infer that our exercise protocols can alter the inflammation status, and consequently isoprostane levels, in diabetic patients.

Our results showed that the periodised protocol, an individualized approach, can optimize the exercise-induced improvement on blood oxidative stress in patients with type 2 diabetes. It is

interesting to note that frequently exercise protocols with longest training durations induce better results on metabolic and oxidative status profiles, while short-term training period is unable to affect these parameters. 2 or 4 months of aerobic exercise did not alter isoprostane levels, respectively, in adults with type 2 diabetes and sedentary young women (44-45). Gordon e colleagues (46) described that 6 months of aerobic training reduced the lipid peroxidation, without any effect after 3 months of exercise, in patients with type 2 diabetes.

Although the chronic effects of exercise have been linked to training-induced adaptations in antioxidant system, inducing an up regulation of antioxidant enzymes (21), these results are contradictory, pointing to a rather complex relationship between the exercise benefits on antioxidant capacity and diabetes. Atalay (26) demonstrated that moderate intensity physical exercise (VO₂ 60% for 40 min) did not cause significant changes in antioxidant enzymes activity in erythrocyte of young diabetic men. However, acute and chronic exercise in cycle-ergometer increased the antioxidant enzyme activities (27, 28). The potential explanation for the discrepancies can be the heterogeneity of cellular oxidative status in different ethnic groups (47-50) In this context, the oxidative stress markers in exercised Brazilian patients with type 2 diabetes have received little attention. It is interesting to note that our exercise protocol consisting of a periodised training during 3 months reduced GPX activity after chronic training and reduced SOD, CAT activities after single session as well as after chronic training in patients with type 2 diabetes, without any effect on the total antioxidant capacity evaluated by TRAP assay. This method evaluates enzymatic and non-enzymatic defenses (51). TRAP levels indicate the antioxidant concentration in the sample (52), what is important because a substantial amount of antioxidants may be composed by unidentified compounds (51). It is interesting to note that the fact of TRAP levels were unaltered might be explained by lesser antioxidant activity, which can mask an increase of other antioxidant level.

Another finding that emerged from our study was the similar effect of periodised exercise performed in water and dry land environments on blood oxidative status in patients with type 2 diabetes. This is relevant since water may reduce risk related to joint loading and may induce greater engagement than land-based exercise. Consequently, if the aquatic environment is available, this approach can be used minimizing injuries and ulcerations in patients with type 2 diabetes, given that the effects on metabolic and oxidative status profiles were similar to land environment (12, 13).

Conclusions

Our data suggests that exercise protocols performed in water and dry land environments with similar training periodization (reflected by time, intensity and frequency factors) may reduce the oxidative stress markers, specifically isoprostane and reactive species contents. Despite, our results disagree with the hypothesis that acute exercise increases free radical levels and induces an adaptation in cellular antioxidant system, since periodised exercise acutely reduced reactive species content.

Acknowledgments.

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

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. Myers J. Exercise and cardiovascular health. *Circulation*. 2003;107(1):e2-e5.
2. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006 Mar 14;174(6):801-9.
3. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, et al. Exercise and type 2 diabetes the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes care*. 2010;33(12):e147-e67.
4. O'Hagan C, De Vito G, Boreham CA. Exercise Prescription in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Sports Medicine*. 2013;43(1):39-49.
5. Mairinck RdS, Baia DP, Sousa NMFd. EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO NO CONTROLE GLICÊMICO EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS. *Revista Brasileira de Reabilitação e Atividade Física*. 2013;2(1).
6. Riddell M, Pollack S, Shojaei H, Kalish J, Zisser H. Physical Activity and Exercise. *Diabetes technology & therapeutics*. 2014;16(S1):S-92-S-9.
7. Monteiro LZ, Fiani CRV, Freitas MCFd, Zanetti ML, Foss MC. Decrease in blood pressure, body mass index and glycemia after aerobic training in elderly women with type 2 diabetes. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2010;95(5):563-70.
8. Vancea DMM, Vancea JN, Pires MIF, Reis MA, Moura RB, Dib SA. Effect of frequency of physical exercise on glycemic control and body composition in type 2 diabetic patients. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2009;92(1):23-30.
9. Belli T, Ribeiro LFP, Ackermann MA, Baldissera V, Gobatto CA, Galdino da Silva R. Effects of 12-week overground walking training at ventilatory threshold velocity in type 2 diabetic women. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;93(3):337-43.
10. Karstoft K, Winding K, Knudsen SH, Nielsen JS, Thomsen C, Pedersen BK, et al. The Effects of Free-Living Interval-Walking Training on Glycemic Control, Body Composition, and Physical Fitness in Type 2 Diabetic Patients A randomized, controlled trial. *Diabetes care*. 2013;36(2):228-36.
11. FLAIM SF, MINTEER WJ, CLARK DP, ZELIS R. Cardiovascular res se t treadmill exercise in the untrain. 1979.
12. Åsa C, Maria S, Katharina SS, Bert A. Aquatic exercise is effective in improving exercise performance in patients with heart failure and type 2 diabetes mellitus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012.
13. Nuttamonwarakul A, Amatyakul S, Suksom D. Twelve Weeks of Aqua-Aerobic Exercise Improve Health-Related Physical Fitness and Glycemic Control in Elderly Patients with Type 2 Diabetes.
14. Nuttamonwarakul A, Amatyakul S, Suksom D. Effects of Water-Based Versus Land-Based Exercise Training on Cutaneous Microvascular Reactivity and C-Reactive Protein in Older Women with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Exercise Physiology Online*. 2014;17(4).
15. Logani M, Davies R. Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants—a review. *Lipids*. 1980;15(6):485-95.
16. Iborra R, Ribeiro I, Neves M, Charf A, Lottenberg S, Negrão C, et al. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid

- peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2008;18(6):742-50.
17. 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, Obesity and Metabolism*. 2008;10(11):1062-73.
 18. Vehkala L, Ukkola O, Kesäniemi YA, Kähönen M, Nieminen MS, Salomaa V, et al. Plasma IgA antibody levels to malondialdehyde acetaldehyde-adducts are associated with inflammatory mediators, obesity and type 2 diabetes. *Annals of medicine*. 2013;45(8):501-10.
 19. Brinkmann C, Blossfeld J, Pesch M, Krone B, Wiesiollek K, Capin D, et al. Lipid-peroxidation and peroxiredoxin-overoxidation in the erythrocytes of non-insulin-dependent type 2 diabetic men during acute exercise. *European journal of applied physiology*. 2012;112(6):2277-87.
 20. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med*. 2009;8:1.
 21. Gomez-Cabrera M-C, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;44(2):126-31.
 22. Akova B, Sürmen-Gür E, Gür H, Dirican M, Sarandöl E, Küçükoglu S. Exercise-induced oxidative stress and muscle performance in healthy women: role of vitamin E supplementation and endogenous oestradiol. *European journal of applied physiology*. 2001;84(1-2):141-7.
 23. Čolak E, Dimitrijević-Srećković V, Djordjević PB, Stanković S, Glišić B, Srećković B, et al. Biomarkers of enzymatic and non-enzymatic antioxidative defense in type 2 diabetes mellitus-comparative analysis. *Biochemia Medica*. 2008;18(1):42-51.
 24. Kasznicki J, Kosmowski M, Sliwinska A, Mrowicka M, Stanczyk M, Majsterek I, et al. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Molecular biology reports*. 2012;39(9):8669-78.
 25. Peerapatdit T, Sriratanasathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *J Med Assoc Thai*. 2010;93(6):682-93.
 26. Atalay M, Laaksonen D, Niskanen L, Uusitupa M, Hänninen O, Sen C. Altered antioxidant enzyme defences in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1997;161(2):195-201.
 27. Kostić N, Čaparević Z, Marina Đ, Ilić S, Radojković J, Čosić Z, et al. Clinical evaluation of oxidative stress in patients with diabetes mellitus type II--impact of acute exercise. *Vojnosanitetski Pregled: Military Medical & Pharmaceutical Journal of Serbia & Montenegro*. 2009;66(6).
 28. 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*. 2012/04/01;37(2):334-44.
 29. Krueel LF, Beilke DD, Kanitz AC, Alberton CL, Antunes AH, Pantoja PD, et al. Cardiorespiratory responses to stationary running in water and on land. *J Sports Sci Med*. 2013;12(3):594-600.
 30. Kolberg C, Horst A, Moraes MS, Kolberg A, Belló-Klein A, Partata WA. Effect of High-Velocity, Low-Amplitude Treatment on Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Activities in Erythrocytes From Men With Neck Pain. *Journal of manipulative and physiological therapeutics*. 2012;35(4):295-300.

31. Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, et al. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jan 20;1688(1):26-32.
32. Driver AS, Kodavanti PRS, Mundy WR. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicology and teratology*. 2000;22(2):175-81.
33. Masako T, Toshiyuki M, Kaoru M, Kageaki A. Fluorescent substances in mouse and human sera as a parameter of in vivo lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1985;834(2):196-204.
34. Guzow K, Szabelski M, Rzeska A, Karolczak J, Sulowska H, Wiczak W. Photophysical properties of tyrosine at low pH range. *Chemical physics letters*. 2002;362(5):519-26.
35. Bondy SC. Evaluation of free radical-initiated oxidant events within the nervous system. *Methods in Neurosciences*. 1996;30:243-59.
36. Wendel A, Feuerstein S. Drug-induced lipid peroxidation in mice—I Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochemical pharmacology*. 1981;30(18):2513-20.
37. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984 1984;105:121-6.
38. Valkonen M, Kuusi T. Spectrophotometric assay for total peroxyl radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of lipid research*. 1997;38(4):823-33.
39. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1):248-54.
40. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(5):816-23.
41. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress. *Sports Medicine*. 2005;35(12):1045-62.
42. Kaviarasan S, Muniandy S, Qvist R, Ismail IS. F2-isoprostanes as novel biomarkers for type 2 diabetes: a review. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2009;45(1):1.
43. Galano J-M, Mas E, Barden A, Mori TA, Signorini C, De Felice C, et al. Isoprostanes and neuroprostanes: total synthesis, biological activity and biomarkers of oxidative stress in humans. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2013;107:95-102.
44. Mori TA, Dunstan DW, Burke V, Croft KD, Rivera JH, Beilin LJ, et al. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F₂-isoprostane excretion in non—insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*. 1999;48(11):1402-8.
45. Arikawa AY, Thomas W, Gross M, Smith A, Phipps WR, Kurzer MS, et al. Aerobic training reduces systemic oxidative stress in young women with elevated levels of F₂-isoprostanes. *Contemporary clinical trials*. 2013;34(2):212-7.
46. Gordon LA, Morrison EY, McGrowder DA, Young R, Fraser YT, Zamora EM, et al. Effect of exercise therapy on lipid profile and oxidative stress indicators in patients with type 2 diabetes. *BMC complementary and alternative medicine*. 2008;8(1):21.
49. Galassetti P. Inflammation and oxidative stress in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Journal of Diabetes Research*. 2012;2012.
50. Chen S-J, Yen C-H, Huang Y-C, Lee B-J, Hsia S, Lin P-T. Relationships between inflammation, adiponectin, and oxidative stress in metabolic syndrome. *PLoS One*. 2012;7(9):e45693.

51. Yokota T, Kinugawa S, Yamato M, Hirabayashi K, Suga T, Takada S, et al. Systemic oxidative stress is associated with lower aerobic capacity and impaired skeletal muscle energy metabolism in patients with metabolic syndrome. *Diabetes care*. 2013;36(5):1341-6.
52. Vávrová L, Kodydkova J, Zeman M, Dušejovská M, Macášek J, Staňková B, et al. Altered activities of antioxidant enzymes in patients with metabolic syndrome. *Obesity facts*. 2013;6(1):39-47.
53. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of Biochemistry and biophysics*. 2001;388(2):261-6.
54. Desmarchelier C, Repetto M, Coussio J, Llesuy S, Ciccía G. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *Pharmaceutical Biology*. 1997;35(4):288-96.

Table 1 Baseline characteristics subjects

Table 1: Baseline characteristics of subjects

	Water group (n = 11)	Dry land group (n = 10)	P value
Age (years)	55.64 ± 9.43	60.10 ± 7.72	0.262
Body mass (kg)	93.38 ± 14.80	78.45 ± 12.50	0.020*
BMI (kg/m ²)	34.27 ± 3.99	30.14 ± 3.82	0.028*
Waist circumference (cm)	111.74 ± 11.82	104.38 ± 12.24	0.154
WHR	0.68 ± 0.07	0.65 ± 0.07	0.152
∑8SF (mm)	270.20 ± 49.90	226.22 ± 62.78	0.067
Fat percentage	37.78 ± 4.11	35.07 ± 6.14	0.130
Gender (F/M)	6/5	5/5	> 0.999
Medical treatment			
Metformin (n)	11	10	> 0.999
Sulphonylurea (n)	4	2	0.635
DPP-4 inhibitors (n)	1	2	0.586
Insulin	1	1	> 0.999

Table 1. WHR: waist to height ratio; $\sum 8SF$: sum of 8 skin folds. Data are expressed as mean \pm SD; categorical variables are presented as numbers of patients (n). Student's t-test and Fischer exact test; * indicates statistically significant difference between groups.

List of Legends

Figure 1 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on reactive species content in plasma. Repeated measures analysis of variance ANOVA followed by LSD test. * indicates significant differences between after (acute) and before first session (baseline) in both environments groups, # indicates significant differences of after the last session (acute effect on chronic training) compared with of before first session (baseline) and before the last session (chronic training). $P < 0.05$.

Figure 2 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on 8-isoprostane level in plasma. Repeated measures analysis of variance ANOVA followed by LSD test. * indicates significant differences between after (acute) and before first session (baseline) in both environments groups, # indicates significant differences of after the last session (acute effect on chronic training) compared with of before first session (baseline) and before the last session (chronic training). $P < 0.05$.

Figure 3. Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetic patients in water or dry land on GPX activity in erythrocytes. Repeated measures analysis of variance followed by LSD test. * Indicates significant difference before last session (chronic training) compared with before first (baseline) and after first session (acute) in both environments groups. $P < 0.05$.

Figure 4 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on CAT activity in erythrocyte . Repeated measures analysis of variance ANOVA followed by LSD test. * indicates significant differences between after (acute) and before first session (baseline) in both environments groups, # indicates significant differences of before the last session (chronic training) compared with before first session(baseline) in both environments groups (baseline) $P < 0.05$.

Figure 5 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on SOD activity in erythrocyte . Repeated measures analysis of variance ANOVA followed by LSD test. * indicates significant differences between after (acute) and before first session (baseline) in both environments groups, # indicates significant differences of before the last session (chronic training) compared with before first session(baseline) in both environments groups (baseline) $P < 0.05$.

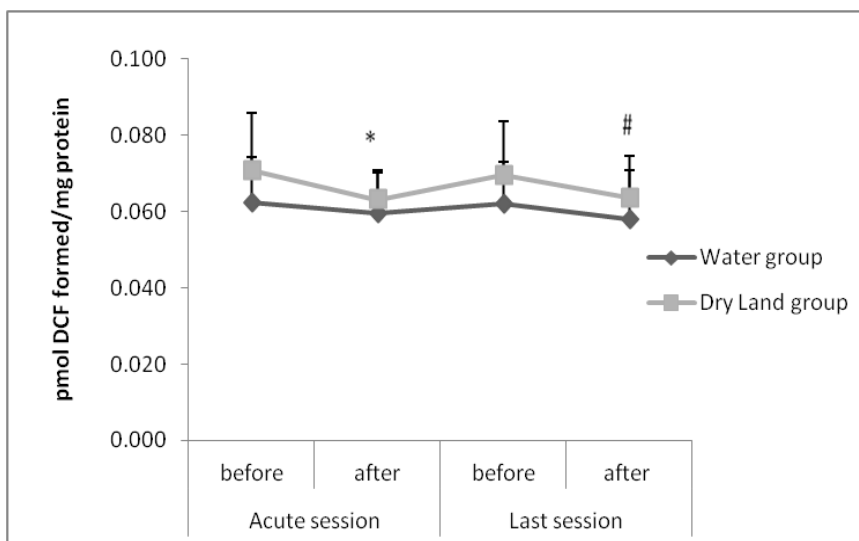


Figure 1 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on reactive species content in plasma

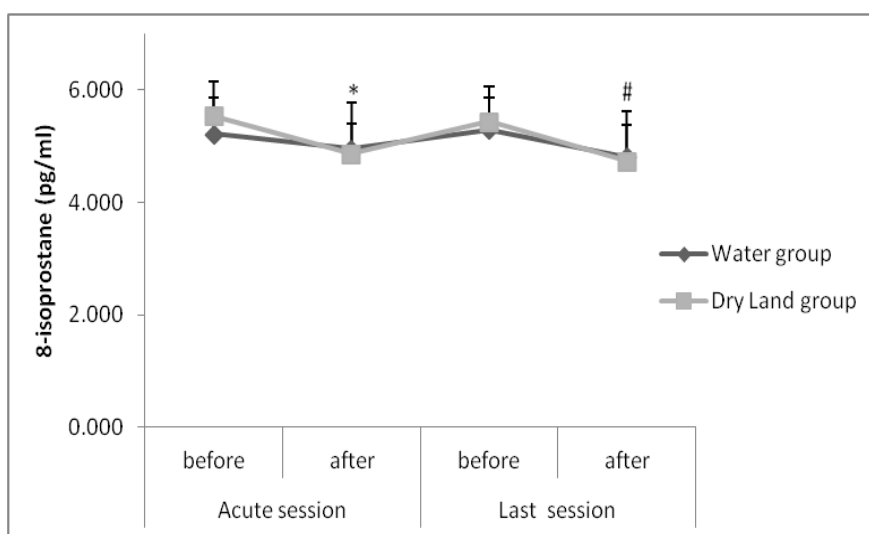


Figure 2 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on 8-isoprostane level in plasma

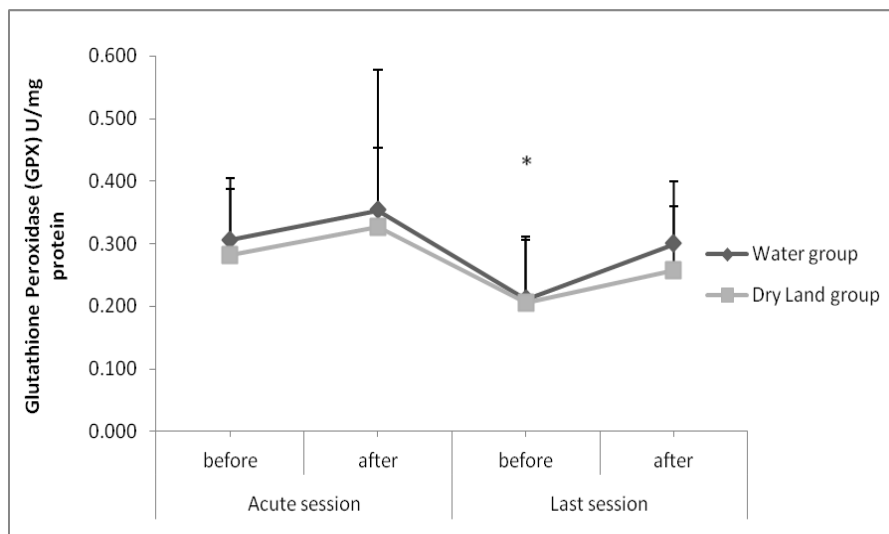


Figure 3 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetic patients in water or dry land on GPX activity in erythrocytes

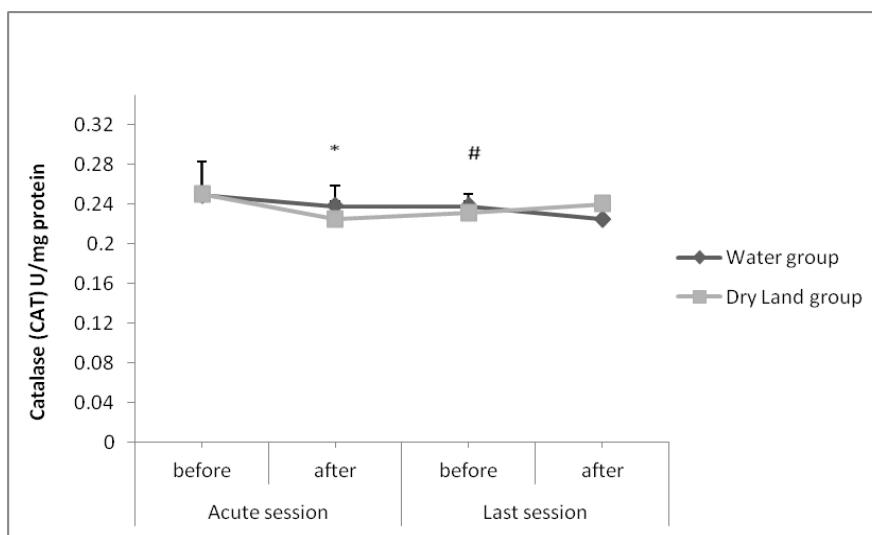


Figure 4 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on CAT activity in erythrocyte

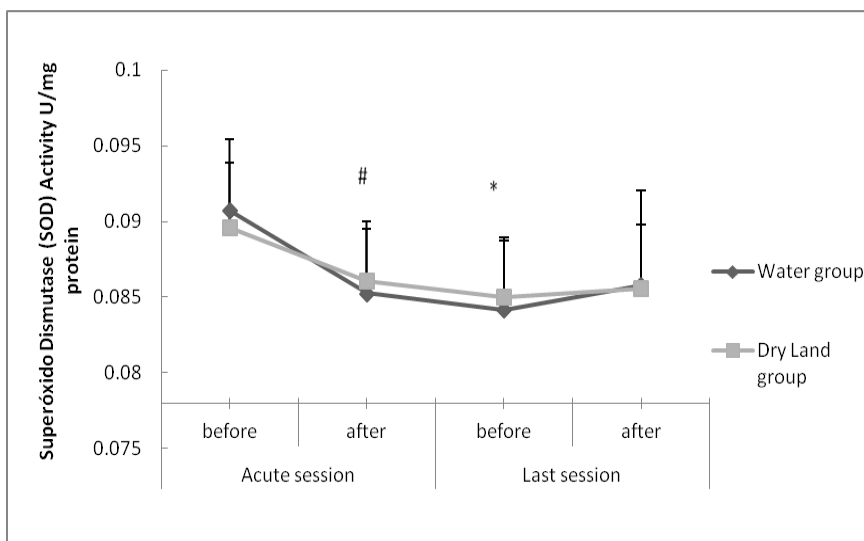


Figure 5 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on SOD activity in erythrocyte

5.2 Artigo 2

Acute exercise and periodized training in different environments affect blood epigenetic and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes

Arthiese Korb^a, Karine Bertoldi^c, Gisele Agustini Lovatel^d, Rodrigo Sudatti Dellevatti^e, Viviane Rostirolla Elsner^{c, f}, Louisiana Carolina Ferreira Meirelles^c, Luis Fernando Martins Kruehl^e, Ionara Rodrigues Siqueira^{*a, b, c}

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^bDepartamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ^dFaculdade de Fisioterapia, Universidade Federal de Santa Catarina; ^ePrograma de Pós-Graduação em Ciência do Movimento Humano, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul; ^f Programa de Pós-Graduação em Biociências e Reabilitação, Centro Universitário Metodista IPA, 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

Background and Aims: Inflammation and epigenetic markers have been associated with type 2 diabetes; however, the effects of regular exercise, specifically periodized training applied in different environments, on the pro- and anti-inflammatory cytokine levels and epigenetic parameters in diabetic patients have rarely been investigated. Our purpose was to elucidate the acute and chronic effects of aerobic periodized training in aquatic and land environments on the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) global histone deacetylase (HDAC) activities and the plasma cytokines levels of patients with type 2 diabetes.

Methods and Results: Twenty-one type 2 diabetes patients were randomized and submitted to acute exercise sessions on dry land or in water environments followed by 12 weeks of periodized training consisting of four mesocycles. Blood samples were obtained immediately before and after both the first and last sessions. The exercise in both environments affected acute and chronic epigenetic modifications and specifically affected HDAC, which removes acetyl groups from histones; however, the periodized training reduced and the acute exercise increased HDAC activity in PBMCs. Additionally, the periodized training increased the plasma level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 (IL-10). We did not observe any differences in plasma interleukin-6 (IL-6) or interleukin-1 β (IL-1 β) contents.

Conclusions: Our data support the hypothesis that the modulations of histone acetylation and inflammatory status might be at least partially related to the effects of exercise effects on type 2 diabetes because the periodized training performed in the aquatic and land environments altered the HDAC activities and IL10 levels of patients with type 2 diabetes.

The trial registration number is NCT01956375 at clinicaltrials.gov

Keywords: type 2 Diabetes, aerobic training, aquatic environment, land environment, histone deacetylase, interleukin

Abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
ATHR	Anaerobic threshold
BMI	Body mass index
GLUT 4	Transmembrane glucose transporter
HAT	Histone Acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
HDACi	Histone deacetylase inhibitor
Hs-CRP	High-sensitivity C reactive protein
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
K ³ EDTA	Tripotassium ethylene diamine tetraacetic acid
LSD	Least significant difference
MDRD-GRF	Estimated glomerular filtration rate using modification of diet in renal disease
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences software
Vo ₂ máx	Maximal oxygen uptake

Introduction

Recently, epigenetic mechanisms have been linked to the pathogenesis of diabetes [1]. Histone acetylation is the most extensively studied epigenetic mechanism and has been widely associated with enhanced transcriptional activity that is mediated via increases in the accessibility of a gene to the transcriptional machinery; in contrast, deacetylation is typically related to transcriptional repression. Histone tail acetylation is a dynamic process in which histone acetyltransferases (HATs) are responsible for the addition of acetyl groups to lysine residues of the amino-terminal tails of the histones; conversely, histone deacetylases (HDAC) remove these acetyl groups [2]. Experimental studies have demonstrated that intrauterine growth restriction, a type 2 diabetes model, increases the recruitment of HDAC1 in pancreatic β -cells and leads to the deacetylation of histones and insulin resistance [3]. Indeed, this animal model induces epigenetic modifications of the transmembrane glucose transporter (GLUT 4) gene that are mediated by DNA methyltransferase and HDACs and reduce its transcription in muscles [4]. In this context, HDAC inhibitors have been studied as potential therapeutic approaches for patients with type 2 diabetes[1].

Furthermore, HDAC plays an important role in pro-inflammatory responses via nuclear factor (NF)- κ B, which mediates the synthesis of cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) [5]. Interestingly, chromatin changes have been observed during the activation of the interleukin-10 (IL-10) gene promoter, including the acetylation of specific promoter regions [6]. Additionally, HDAC inhibitors can protect β -cells from the effects of cytokines [7].

Importantly, there are studies that have reported on the effects of exercise on acetylation parameters in various brain areas in rodents [8]. Our group has demonstrated that a single exercise session and a moderate daily exercise protocol on a treadmill are able to transiently reduce global HDAC activity in various brain areas of Wistar rats [8]. Although epigenetic modifications have recently been linked to the pathogenesis of diabetes and to the benefits of exercise on brain function, to our knowledge, there are no works that have evaluated the effects of exercise on HDAC activity in type 2 diabetes patients.

There are several lines of evidence indicating that regular exercise improves pro- and anti-inflammatory cytokines profiles [9], and single sessions seem to be accompanied by a pro-inflammatory response [10]. These findings are relevant because patients with diabetes have higher levels of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin IL-6 and IL-1 β [11]. Spranger and colleagues [12] reported that higher levels of these cytokines increase the risk of developing type 2 diabetes. The role of IL-6 is controversial and has been classified as both pro- and anti-inflammatory cytokine [10,12]. Additionally, exercise transiently increases plasma IL-6 concentrations and subsequently enhances the levels of IL-10, which is an anti-inflammatory cytokine [13].

Although exercise-induced increases in IL-10 levels have been linked to reduced immune and inflammatory responses [14], to our knowledge, there are no works that have evaluated the effects of aquatic exercise on cytokines, particularly IL-10, in type 2 diabetes patients. It is important to note that the water and dry land exercises have been found to induce different effects in healthy subjects [15].

Therefore, the purpose of this study was to analyze the effects of periodized exercise performed in aquatic and land environments on global blood HDAC activities and cytokines levels in type 2 diabetes patients. Regarding the optimum exercise dosage, we used a periodization approach that is characterized by progressive increases in intensity over time that allow for individual variation in outcomes.

Materials and Methods

Subjects. The recruitment of the subjects was accomplished via an advertisement in a general circulation newspaper. Eligible patients were between 37 and 71 years old, had type 2 diabetes diagnoses, had not performed any physical exercise in the previous three months and were receiving their usual medical treatment. These patients were selected non-randomly as volunteers. Patients with the following conditions were excluded from the sample: uncontrolled hypertension, autonomic neuropathy, severe peripheral neuropathy, proliferative diabetes retinopathy, severe nonproliferative diabetes retinopathy, decompensated heart failure, limb amputation, chronic renal failure (MDRD-GFR < 30 ml/min), or any muscle or joint impairment that prevented the individual from engaging in physical exercise. The presence of these conditions was confirmed based on medical history and clinical and laboratory examinations. All patients had undergone effort electrocardiograms in the six months preceding the study.

Research design. The study included 21 subjects (10 men and 11 women; mean age: 57.87 ± 8.5 years). The baseline characteristics of subjects are detailed in Table 1. Initially, 35 patients (15 men and 20 women) were included in the study and were assigned to a water group (n=17) or a

dry land group (n=18) via a blinded randomization that was performed in blocks and stratified by sex.

However, three patients in the water group and seven in dry land group dropped out of the study. Additionally, fourteen patients completed the training protocol in water group, but three exhibited low compliance with the exercise sessions. In the dry land group, eleven patients completed the training protocol, and one exhibited low compliance with the exercise sessions. The remaining patients (water group, n = 11 and dry land group, n=10) attended more than 80% of the aerobic exercise sessions and were included in the per-protocol analysis.

All participants were fully informed about the procedures involved in the study and provided written consent prior to participation. The study was approved by the Research Ethics Committees of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number 108.997).

Intervention. The patients underwent twelve-week training programs that including deep-water walking or running in a swimming pool with a life vest (water group) or walking or running on a track (dry land group). In the aquatic environment, the patients were immersed up to the level of the xiphoid process, and the water temperature ranged from 30–31°C. The temperature ranged from 21-26°C in the land environment [15].

Both groups underwent exercise programs that consisted of periodized training in four mesocycles of three weeks each as detailed in Table 2. The training was conducted three times per week (Monday, Wednesday and Friday), and the sessions were divided into a warm-up period (5 min), a main training program (35 min) and a cool-down section (5 min).

The exercise intensity was adjusted according to the individual's heart rate deflection point through the heart rate at anaerobic threshold (ATHR) this approach is non-invasive and associated with the second ventilatory threshold [15]. The heart rates were evaluated by the patients themselves using HR monitors (RSX 300, Polar) under the supervision of at least three teachers. The characterizations of the subjects were performed via measures of anthropometrical variables including height, body mass, waist circumference and the sum of eight skinfolds (Σ SF). These values were used to calculate the body mass index (BMI) and the waist/height ratio. Significant differences at baseline were found for body mass and BMI (Table 1); however, Balducci and colleagues [16] reported that exercise alters inflammatory profiles in a manner that is independent of weight loss in type 2 diabetes patients.

Blood samples. The blood samples were collected from the cubital vein into vacuum tubes (Vacutainer®) immediately before (baseline) and soon after the first session and immediately before and soon after the last exercise session. The blood was drawn after first session to evaluate the acute effects of a single session, the chronic effects of our exercise programs were studied immediately before last session, and the acute effects of chronic training were examined with the samples taken after the last session.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared from 8 ml of blood collected in K₃EDTA using the Histopaque density gradient (1077-Sigma- St. Louis-USA) centrifugation method according to the manufacturer's instructions.

The samples were collected in heparinized vacuum tubes and then centrifuged at 1500 x G at 4°C for 10 min. The plasma was immediately removed and frozen at -80°C for later cytokine determinations.

Global HDAC activity. HDAC activity was determined using HDAC ELISA Assay kits (Fluorometric Detection, catalog number 17-372, Upstate Biotechnology, USA) according to the manufacturer's instructions. The HDAC activities are expressed as U/mg protein.

Plasma cytokines levels. The IL-6, IL-1 β and IL-10 levels were determined using Human ELISA Assay kits (Colorimetric Detection, catalog number 88-7106; 88-7066; 88-7010, eBioscience Ready-SET-Go, USA; 555198, BD OptEIA, USA, respectively) according to the manufacturer's instructions. The cytokine contents are expressed as U/mg protein.

The protein determinations were accomplished with the Coomassie blue method using bovine serum albumin as the standard[17].

Sample calculation.

The sample consisted of 21 patients (Table 1). Based on a previous report that compared plasma IL-10 activity levels between sedentary control subjects and exercising subjects with type 2 diabetes or metabolic syndrome [16], sample size calculations revealed that an estimated 10 subjects per group were needed to detect a 20% difference with a statistical power of 90% at the 0.05 significance level.

Statistical analyses

All results are expressed as the mean \pm the S.D. The normalities of the distributions were assessed with Shapiro-Wilk tests, and the homogeneities of the variances were tested with

Levene's tests. Data that were not normally distributed were logarithmically transformed (base-10). Fischer's exact tests or unpaired t tests were used to compare the anthropometric parameters at baseline. The results were analyzed with two-way repeat measures analyses of variance (ANOVAs, time effect) with training group as a between-subject factor followed by post-hoc least significant difference (LSD) tests. In all tests, $p < 0.05$ was considered indicative of statistical significance. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software, version 18.0.

Results

The acute and chronic effects of exercise performed in the aquatic and land environments on the global PBMC HDAC activities and plasma cytokine levels in the type 2 diabetes patients were investigated. To examine the acute effect of single sessions, samples were obtained after the first session; additionally, the chronic effects of 12 weeks of training were investigated before the last session. Moreover, the acute effects of chronic trainings were evaluated using samples collected soon after the last exercise session.

An ANOVA indicated that the exercises performed in both the water and dry land environments acutely increased global HDAC activities, and this acute effect was observed after both the first and last sessions. Additionally, 12 weeks of chronic exercise reduced global HDAC activity (Figure 2).

The exercises performed in both environments increased plasma IL-10 levels after chronic training in the type 2 diabetes patients compared to the measurements taken at baseline and after the first session (Figure 3). We did not observe any changes in the plasma IL-6 or IL-1 β contents

(data not shown). We did not observe any differences in the evaluated inflammatory profile parameters before and after the last session of chronic training.

Importantly, there no differences between the outcomes of the aquatic and land environment exercise programs.

Discussion

The present study demonstrated that exercise performed in both water and dry land environments similarly affected the biochemical outcomes of patients with type 2 diabetes.

Our findings revealed a relationship between global HDAC activity and the temporal patterns of the acute and chronic effects that were induced by exercise in the patients with type 2 diabetes. Acute exercise, even after the last session, increased global the HDAC activities of the PBMCs of the patients with type 2 diabetes. These findings can be related to those obtained by Abu-Fahra and colleagues [18] who reported that treadmill or cycling exercise increases HDAC4 activity in PBMCs and adipose in obese subjects. In this study, obese subjects exhibited reduced baseline expression of the HDAC4 protein and negative correlations of the HDAC4 levels in PBMCs with body mass index and body fat percentage. This approach is relevant because visceral adiposity plays an important role in the progressions of cardiovascular diseases, insulin resistance and type 2 diabetes [19]. Taken together, this finding lead us to speculate that acute exercise positively affects HDAC4 activity.

It is possible to suggest that the beneficial effects are related to training-induced adaptations in epigenetic modifications because acute exercise increased global HDAC activity, while the

chronic protocols in both environments reduced HDAC activity. The decreased global HDAC activity induced by chronic exercise is indicative of a global hyperacetylation state that is related to enhanced transcriptional activities in PBMCs.

Accordingly, Mcgee and colleagues [20] suggested that the inhibition of HDAC5 in response to exercise can induce the expression of GLUT4, which is a critical glucose transporter, in human skeletal muscle. This finding is relevant because this effect might counteract the abovementioned epigenetic modifications of the GLUT4 gene that are mediated by DNA methyltransferase and HDACs and are induced by diabetes in the muscles [4]. In this context, HDAC1 seems to be involved in the silencing of important genes, such as Pdx1, that leads to pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance [3]; thus, the reduction in global HDAC activity elicited by chronic exercise might increase the expressions of these genes.

Remarkably, exercise-induced inhibition of HDAC might play a central role in the protective effects against the development and progression of diabetes and its complications. Interestingly, HDAC inhibitors have been suggested as promising strategies for the treatment of inflammatory diseases such as type 2 diabetes [1]. It has been demonstrated that HDAC inhibitors protect against the cytotoxic effects of cytokines and increase histone H4 acetylation in insulinoma cell lines and also increase insulin gene transcription [1,21].

Notably, the chronic trainings performed in either environment were able to increase plasma IL-10 levels; therefore, we suggest that the increased plasma IL-10 levels and reduced HDAC activities presented in our study might be related to IL-10 gene promoter hyperacetylation [6], which can increase the expression of this gene. The limited works regarding the effects of exercise on dry land on IL-10 in type 2 diabetes patients have produced contradictory results.

Kadoglou and colleagues [22] demonstrated that a 6-month aerobic training protocol (50-75% VO₂max) involving four sessions per week increased IL-10 levels in patients with type 2 diabetes. However, Balducci and colleagues [16] reported that a twice-per-week regime of aerobic and high-intensity resistance exercise over 12 months increased the levels of the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10, but no effects were observed in the first 3 months of training or with low-intensity protocols. We suggest that these differences are related to the different types of and intensities of exercise protocols. Furthermore, our protocol, which involved periodized training over 3 months, was able to reduce the duration of the training program required to achieve anti-inflammatory effects. Additionally, this report is the first to investigate the effects of exercises performed in water on cytokine levels.

We did not observe any change in IL-6 plasma levels following the single session or after the chronic training exercise protocols, which corroborates the findings of Oberbach and colleagues [23], who reported that 4 weeks of exercise did not alter the plasma IL-6 concentrations of type 2 diabetes patients. In contrast, these data do not exclude the involvement of IL-6 as an important component of the molecular mechanisms that are induced by exercise because IL-6 has been reported to increase during exercise and return to resting levels after exercise [13], and we did not assess any markers during exercise.

Our findings regarding the IL-1 β levels are in accordance with the data that has previously been obtained; circulating concentrations of this cytokine have been reported to remain unchanged following exercise [24]. It is surprising that aquatic exercise was unable to alter inflammatory cytokine levels because we would not expect water immersion per se to contribute to this effect. It is possible to explain our findings based on the assumption that cold or warm water immersion

changes plasma IL-6 and IL-1 β concentrations including those after exercise [25]; in our study, the water temperature ranged from 30–31°C.

The present work provides new insights into the effects of exercise in different environments on biochemical modulations in peripheral blood. In summary, our results support the hypothesis that epigenetic mechanisms, specifically HDAC activity, are linked to exercise-induced benefits in patients with type 2 diabetes. Additionally, training induces adaptations of the epigenetic modifications because acute increases in HDAC activity can result in chronic down-regulations of these enzymes. Periodized chronic protocols might induce histone hyperacetylation statuses via HDAC, which can increase the expression of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10. Furthermore, periodized chronic protocols might reduce the duration of training programs required to achieve anti-inflammatory effects. Additional research to investigate the molecular mechanism behind this phenomenon is warranted.

Acknowledgments

This work received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (grant # n°476634/2013-0). The authors received research fellowships awarded by the following Brazilian funding agencies: CNPq (Dr. I.R. Siqueira; Dr. L.F.M. Kruel; K. Bertoldi, R.S. Dellevatti, V.R. Elsner), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES (A. Korb).

Conflict of Interest

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

References

1. Christensen DP, Dahllöf M, Lundh M, Rasmussen DN, Nielsen MD, et al. (2011) Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Molecular Medicine* 17: 378.
2. Bolger AP, Sharma R, von Haehling S, Doehner W, Oliver B, et al. (2002) Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. *The American journal of cardiology* 90: 384-389.
3. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA (2008) Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of *Pdx1*. *The Journal of clinical investigation* 118: 2316-2324.
4. Raychaudhuri N, Raychaudhuri S, Thamocharan M, Devaskar SU (2008) Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. *J Biol Chem* 283: 13611-13626.
5. Tak PP, Firestein GS (2001) NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation* 107: 7-11.
6. Villagra A, Cheng F, Wang H-W, Suarez I, Glozak M, et al. (2008) The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nature immunology* 10: 92-100.
7. Larsen L, Tonnesen M, Ronn S, Størling J, Jørgensen S, et al. (2007) Inhibition of histone deacetylases prevents cytokine-induced toxicity in beta cells. *Diabetologia* 50: 779-789.
8. Elsner V, Lovatel G, Bertoldi K, Vanzella C, Santos F, et al. (2011) Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience* 192: 580-587.
9. Hopps E, Canino B, Caimi G (2011) Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. *Acta diabetologica* 48: 183-189.
10. Gleeson M (2007) Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology* 103: 693-699.
11. Donath MY, Schumann DM, Faulenbach M, Ellingsgaard H, Perren A, et al. (2008) Islet Inflammation in Type 2 Diabetes From metabolic stress to therapy. *Diabetes care* 31: S161-S164.

12. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, et al. (2003) Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52: 812-817.
13. Petersen AMW, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* 98: 1154-1162.
14. Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M (2013) The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *European journal of applied physiology* 113: 1839-1848.
15. Kruel LF, Beilke DD, Kanitz AC, Alberton CL, Antunes AH, et al. (2013) Cardiorespiratory responses to stationary running in water and on land. *J Sports Sci Med* 12: 594-600.
16. Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, Fernando F, Cavallo S, et al. (2010) Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 20: 608-617.
17. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
18. Abu-Farha M, Tiss A, Abubaker J, Khadir A, Al-Ghimlas F, et al. (2013) Proteomics analysis of human obesity reveals the epigenetic factor HDAC4 as a potential target for obesity. *PLoS One* 8: e75342.
19. Gustafson B (2010) Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 17: 332-341.
20. McGee SL, Hargreaves M (2006) Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 33: 395-399.
21. Mosley AL, Ozcan S (2003) Glucose regulates insulin gene transcription by hyperacetylation of histone h4. *J Biol Chem* 278: 19660-19666.
22. Kadoglou NP, Iliadis F, Angelopoulou N, Perrea D, Ampatzidis G, et al. (2007) The anti-inflammatory effects of exercise training in patients with type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 14: 837-843.

23. Oberbach A, Tönjes A, Klötting N, Fasshauer M, Kratzsch J, et al. (2006) Effect of a 4 week physical training program on plasma concentrations of inflammatory markers in patients with abnormal glucose tolerance. *European Journal of Endocrinology* 154: 577-585.
24. Stewart LK, Flynn MG, Campbell WW, Craig BA, Robinson JP, et al. (2007) The influence of exercise training on inflammatory cytokines and C-reactive protein. *Medicine and science in sports and exercise* 39: 1714.
25. Lee EC, Watson G, Casa D, Armstrong LE, Kraemer W, et al. (2012) Interleukin-6 responses to water immersion therapy after acute exercise heat stress: a pilot investigation. *Journal of athletic training* 47: 655.

Figure Legends

Figure 1 Participants flow diagram

Figure 2 Effects of aerobic training over a period of 12 weeks performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on HDAC activity in PMBCs. Repeated-measures analysis of variance ANOVA followed by LSD test. * indicates significant differences between the values after (acute) and before the first session (baseline) in both environments, # indicates significant differences before the last session (chronic training) compared to before (baseline) and after the first session (acute), + indicates significant differences between after the last session (acute effect on chronic training) and before the last session (chronic training) in both groups. $P < 0.05$.

Figure 3. Effects of aerobic training during over a period of 12 weeks performed by type 2 diabetic patients in water or on dry land on the IL-10 contents in the plasma. Repeated-measures analysis of variance followed by LSD test. * indicates a significant difference before the last session (chronic training) compared to before (baseline) and after the first session (acute) in both environments. $P < 0.05$.

Tables

Table 1: Baseline characteristics of subjects

	Water group (<i>n</i> = 11)	Dry land group (<i>n</i> = 10)	P value
Age (years)	55.64 ± 9.43	60.10 ± 7.72	0.262
Body mass (kg)	93.38 ± 14.80	78.45 ± 12.50	0.020*
BMI (kg/m ²)	34.27 ± 3.99	30.14 ± 3.82	0.028*
Waist circumference (cm)	111.74 ± 11.82	104.38 ± 12.24	0.154
WHR	0.68 ± 0.07	0.65 ± 0.07	0.152
∑8SF (mm)	270.20 ± 49.90	226.22 ± 62.78	0.067
Fat percentage	37.78 ± 4.11	35.07 ± 6.14	0.130
Gender (F/M)	6/5	5/5	> 0.999
Medical treatment			
Metformin (n)	11	10	> 0.999
Sulphonylurea (n)	4	2	0.635
DPP-4 inhibitors (n)	1	2	0.586
Insulin	1	1	> 0.999

Table 1. WHR: waist-to-height ratio; ∑8SF: sum of 8 skin folds.

The data are expressed as the means ± the SDs; categorical variables are presented as the numbers of patients (*n*). Student's t-test and Fischer exact test; * indicates statistically significant differences between groups.

Table 2. Aerobic training program

Mesocycle	Week	Training sessions	Duration (main part)
1	1 – 3	7 sets (3 min at 85 at 90% ATHR ^a and 2 min intervals at <85% ATHR ^a)	35 min
2	4 -6	7 sets (4 min 85 at 90% ATHR ^a and 1min intervals at <85% ATHR ^a)	35 min
3	7 – 9	7 sets (4 min 90 at 95% ATHR ^a and 1min intervals at <85% ATHR ^a)	35 min
4	10 – 12	7 sets (4 min 95 at 100% ATHR ^a and 1min intervals at <85% ATHR ^a)	35 min

ATHR: Anaerobic threshold heart rate

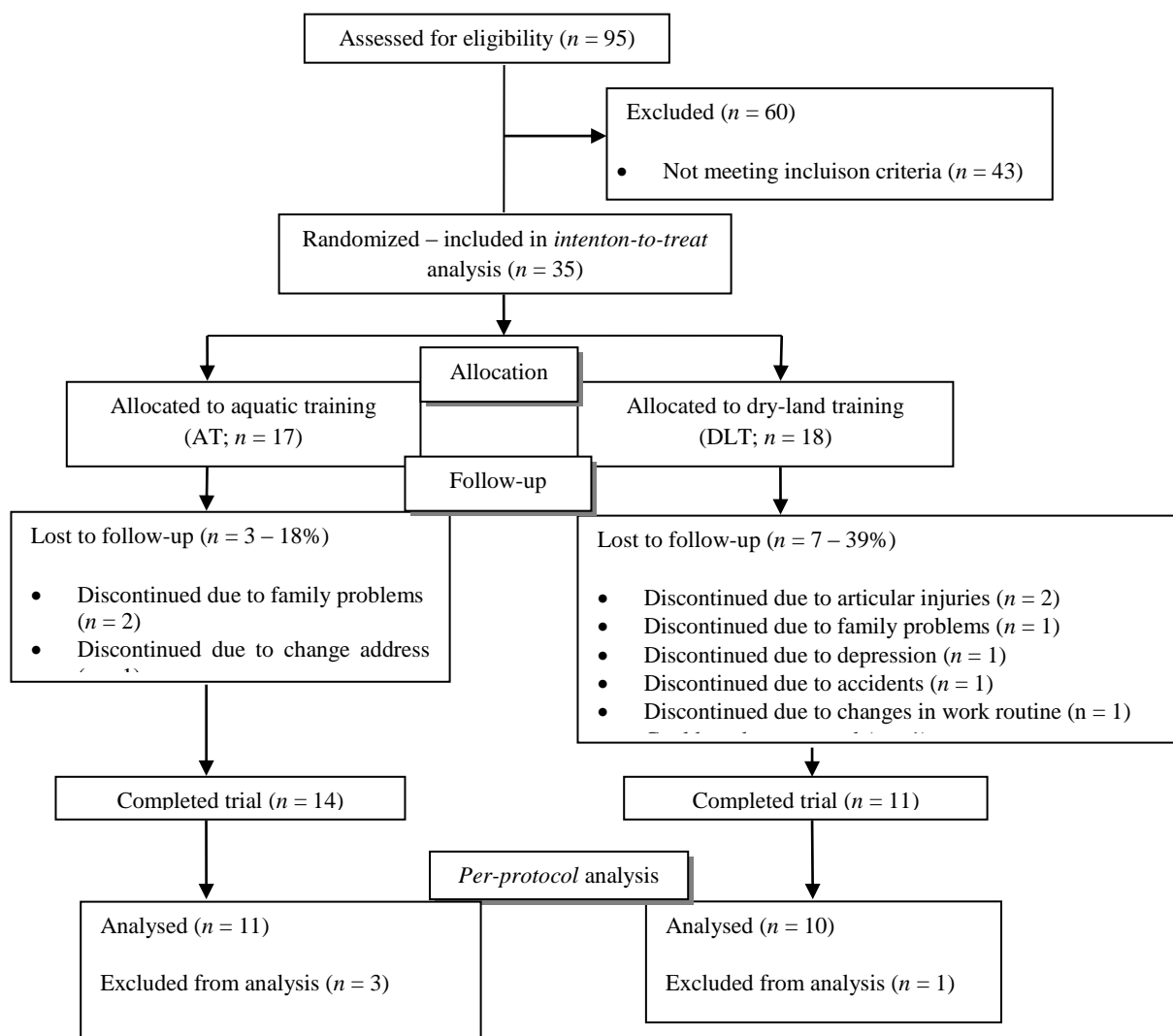


Figure 1 Participants flow diagram

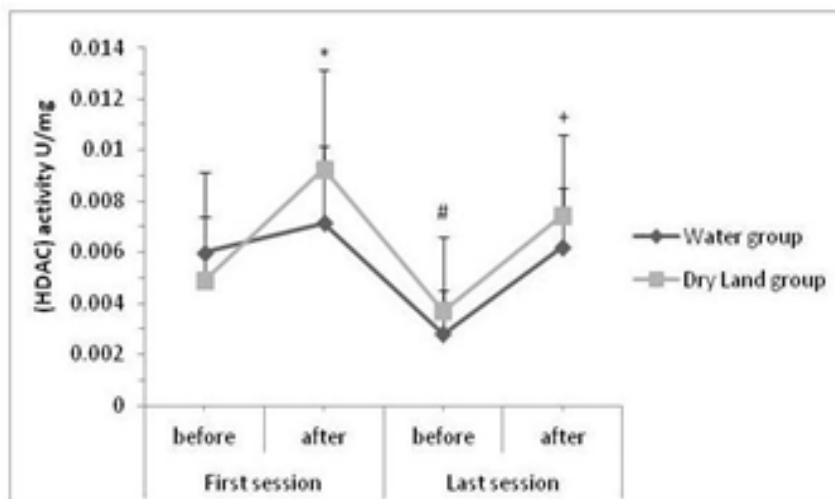


Figure 2 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetes patients in water or dry land environments on HDAC activity in PMBCs

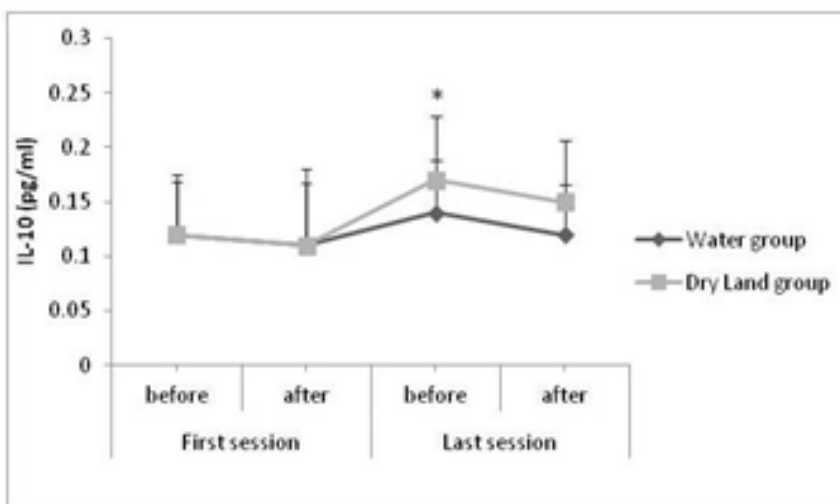


Figure 3 Effects of aerobic training during the period (12 weeks) performed by type 2 diabetic patients in water or dry land on (IL-10) content in plasma

6 Considerações Finais

6.1 Conclusão

Os resultados encontrados no presente trabalho contrariam a hipótese que o exercício físico aumenta agudamente os níveis de radicais livres e induz adaptações no sistema antioxidante, uma vez que a primeira e a última sessões reduziram os níveis de marcadores do estado oxidativo, especificamente o conteúdo das espécies reativas e de isoprostanos, em pacientes diabéticos tipo 2. Esta divergência pode ser explicada pelo uso do protocolo periodizado neste trabalho, que respeita as características individuais dos pacientes, com aumento progressivo e gradual da intensidade, e possivelmente, em protocolos não-periodizados, a intensidade pode ultrapassar o nível de aptidão física, resultando em fadiga e conseqüentemente no estresse oxidativo. Podemos sugerir que o nosso protocolo de exercício reduz agudamente os níveis de espécies reativas e de lipoperoxidação, avaliada pelos isoprostanos, tanto em indivíduos sedentários, quanto após o treinamento de 12 semanas. Além de que, estes efeitos podem estar pelo menos em parte, relacionados com os efeitos protetores do exercício no DM.

É interessante notar que o nosso protocolo de exercício reduziu a atividade das enzimas antioxidantes sem efeito sobre a capacidade antioxidante total. É possível sugerir que o exercício aumentou compostos antioxidantes não-identificados individualmente, já que reduziu a atividade das enzimas, sem impacto sobre a capacidade antioxidante total, e que a redução da atividade das enzimas antioxidantes pode ter mascarado o aumento desses outros antioxidantes.

Considerando o aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória, IL-10, após 12 semanas de treinamento periodizado, podemos sugerir que o nosso protocolo de exercício foi capaz de melhorar o estado inflamatório, o que é relevante considerando o papel da inflamação na patologia do DM2. Além de que, o nosso protocolo de exercício periodizado parece otimizar a duração do programa de exercício necessário para alcançar o efeito anti-inflamatório, já que dados da literatura indicam a necessidade de, pelo menos, seis meses de treinamento aeróbico para alterar os níveis desta citocina.

Recentemente, os mecanismos epigenéticos têm sido relacionados tanto à fisiopatologia do diabetes quanto aos efeitos do exercício físico. Contudo, o efeito do exercício sobre parâmetros epigenéticos em sangue de indivíduos diabéticos não havia sido estudado.

Agudamente, o exercício aumentou a atividade global das desacetiladoras de histonas, HDACs, enquanto que, o treinamento periodizado (sem impacto do exercício agudo) reduziu a atividade destas enzimas. Podemos sugerir que o aumento da atividade induzido agudamente pelo exercício pode causar adaptações na maquinaria de acetilação de histonas, levando a uma dessensibilização destas enzimas. Além disso, pode-se postular que haja um efeito diferenciado nas diferentes isoenzimas ligadas a modulação metabólica. Estes achados são importantes, uma vez que a HDAC tem sido um novo alvo molecular no controle da obesidade e DMT2, assim, a modulação crônica destas enzimas pode estar envolvida com os efeitos benéficos do exercício.

Ainda, outro aspecto relevante a ser considerado é que não observamos diferenças significativas entre os protocolos realizados nos meios aquático ou terrestre. É interessante relatar que o exercício aquático impõe menos estresse mecânico devido aos efeitos reduzidos da gravidade, minimizando lesões e ulcerações comuns em pacientes com DMT2. Portanto o ambiente aquático aparece como uma possibilidade terapêutica importante para esses indivíduos.

6.2 Perspectivas

A partir dos resultados obtidos nesta Tese, pretende-se investigar outros mecanismos moleculares que possam estar ligados aos benefícios do exercício crônico periodizado por pacientes com DMT2. Dentre eles, pode-se destacar:

- Avaliação da atividade e expressão das enzimas HDAC 4, HDAC 5 e HDAC 11,
- Avaliação de parâmetros de metilação do DNA, através da atividade das enzimas DNMT1 e DNMT3b,
- Avaliação dos níveis de acetilação das histonas H3-K9 e H3-K4
- Avaliação do IL-1Ra

7 Anexos

7.1 ANAMNESE

Data: _____/_____/_____

Nº:

DADOS PESSOAIS

Nome Completo:	Sexo: Fem(1) Masc(2)
Mulheres – pré menopáusica (1) - pós menopáusica (2)	
Data de Nasc. :	Idade:
Endereço:	
Telefone:	Telefone para emergência:

Grupo étnico (impressão do entrevistador): (1) Caucaóide (2) Negróide (3) Outro

Tempo de diabetes: _____anos.

Fumante: (1) Sim (2) Não

Tempo: _____ **Quantidade (dia):** _____

1) O senhor(a) pratica exercícios físico? (1) Sim (2) Não (3) Às vezes

Número de dias: _____ (semana) Tempo:
_____ (horas/dia)

2) Alguma vez seu médico disse que você possui algum problema de coração e recomendou que você só praticasse atividade física sob prescrição médica?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

3) O senhor(a) sente dor no peito quando realiza uma atividade física?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

4) No último mês, o senhor (a) teve dor no peito quando não estava realizando um atividade física?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

5) Seu médico disse que o senhor possui pressão arterial alta e/ou indicou o uso de alguma medicação para controlar a pressão arterial?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

6) O senhor(a) tem conseguido manter os níveis de pressão arterial controlados?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

6) Algum médico já lhe disse que possui problemas no sistema nervoso em função do diabetes (neuropatia autonômica ou neuropatia periférica severa)?

(1) Sim (2) Não. Qual? _____

7) O senhor(a) apresenta frequentemente: visão embaçada/cegueiranoturna/visão dupla/perda de visão periférica ou sensação de pressão nos olhos?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

8) Seu médico já proibiu o senhor(a) de fazer um esforço físico mais forte por poder prejudicar sua visão?

(1) Sim (2) Não

9) Algum médico já disse que o senhor possui retinopatia diabética proliferativa ou retinopatia diabética não proliferativa severa?

(1) Sim (2) Não Qual? _____

10) Já teve algum derrame nos olhos ou precisou fazer aplicação de laser?

(1) Sim (2) Não

11) O senhor(a) apresenta úlceras de difícil cicatrização?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

12) O senhor(a) já precisou amputar algum dedo?

(1) Sim (2) Não

13) Algum médico já lhe falou que possui pé diabético?

(1) Sim (2) Não

14) O seu médico alguma vez chegou a comentar com o senhor(a) se a sua função renal é alterada ou apresenta aumento de excreção de proteína na urina?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

15) O senhor(a) apresenta frequentemente: palpitações em repouso / incapacidade ao exercício físico / arritmias cardíacas / hipotensão postural (tonturas ao mudar de posição ou levantar-se)?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

16) O senhor (a) sente dor ou desconforto na(s) perna(s) quando caminha?

(1) Sim (2) Não

Quando o senhor(a) para de caminhar a dor continua?

(1) Sim (2) Não

Essa dor aparece quando o senhor(a) está parado, em pé ou sentado?

Parado (1) Em pé (2) Sentado (3)

17) O senhor(a) tem artrose?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei. Em qual articulação? _____

18) O senhor(a) tem algum comprometimento muscular ou articular que impeça a realização de exercícios físicos?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

19) Tem alguma viagem programada para este ano?

(1) Sim (2) Não (3) Não sei

MEDICAÇÕES EM USO:

Medicamento: _____

Dose: _____

Medicamento: _____

Dose: _____

Medicamento: _____

Dose: _____

Medicamento: _____

Dose: _____

Observações gerais:

EXAMES CLÍNICOS:

- 1) HbA1C: _____ Data dos exames: ____ / ____ / ____
- 2) Glicemia de jejum: _____ Data dos exames: ____ / ____ / ____
- 3) Glicemia pós-prandial: _____ Data dos exames: ____ / ____ / ____
- 4) Creatinina: _____ Data dos exames: ____ / ____ / ____
- 5) Albuminúria: _____ Data dos exames: ____ / ____ / ____
- 6) Exame de fundo de olho: _____ Data dos exames: ____ / ____ / ____

EM USO DE INSULINA, DOSE DIÁRIA:

NPH _____ REGULAR _____

LISPRO _____ GLULISINA _____

OUTRA: _____

Obs.:

7.2 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 DMT2 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 Kruehl 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)

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: _____

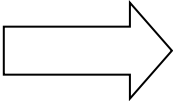
7.3 FICHA DE COLETA DE CONSUMO MÁXIMO DE OXIGÊNIO E COMPOSIÇÃO CORPORAL.

Nome: _____

Data: ____/____/____.

Idade: _____ anos.

1. Composição Corporal

Massa Corporal: _____ Kg  IMC = _____ Kg/m²

Estatura: ____, ____ m.

Dobras Cutâneas

	1 ^a medida	2 ^a medida	3 ^a medida	média
1 Tricipita				
Axilar média				
Subesc apular				
Supra- ilíaca				
Abdom				

inal				
Peitoral				
Coxa				
Perna				

$\Sigma DC =$ _____

Cálculo do %G e do %MM: _____

2. $\underline{VO_{2\text{pico}}} =$ _____ $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$;

3. $\underline{VO_{2LV2}} =$ _____ $\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

7.4 Teste progressivo máximo em esteira rolante

Estágio	Tempo (min)	Inclinação (%)	Velocidade (km/h)
1	3	1	3
2	2	1	4
3	2	1	5
4	2	1	6
5	2	1	7
6	2	1	8
7	2	1	9
8	2	1	10
9	2	1	11
10	2	1	12

