UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITO DA INGESTÃO AGUDA DE CAFEÍNA NA RESPOSTA GLICÊMICA E INSULÍNICA EM RATOS DIABÉTICOS

LUIZ AUGUSTO DA SILVA

GUARAPUAVA
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITO DA INGESTÃO AGUDA DE CAFEÍNA NA RESPOSTA GLICÊMICA E INSULÍNICA EM RATOS DIABÉTICOS

Luiz Augusto da Silva

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: PROFº DR. CARLOS RICARDO MANECK MALFATTI

Guarapuava
2012

Catalogação na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

SILVA, Luiz Augusto da.
S588 Efeito da ingestão aguda de cafeína na resposta glicêmica e insulínica em ratos diabéticos / Luiz Augusto da Silva. -- Guarapuava, PR, 2012.

76f.

Dissertação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro – Oeste, PR.
Orientador: Carlos Ricardo Maneck Malfatti

1.Farmácia - diabetes. 2. Cafeína. 3. Glicemia. 4.Exercícios. I. Malfatti, Carlos Ricardo Maneck. II. Título.

CDD 20ª. 616.462

TERMO DE APROVAÇÃO

LUIZ AUGUSTO DA SILVA

EFEITO DA INGESTÃO AGUDA DE CAFEÍNA NA RESPOSTA GLICÊMICA E INSULÍNICA EM RATOS DIABÉTICOS

Dissertação aprovada em 11 de dezembro de 2012, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti - UNICENTRO

Orientador/Presidente

Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva - UNICENTRO

Membro

Prof. Dr. Leandro Ricardo Altimari - UEL

Membro

GUARAPUAVA-PR

2012

Dedico este trabalho primeiramente a Deus,

Aos meus pais, Jorge e Salete, e meus irmãos que me apoiaram por toda minha vida, e sempre foram minha força para continuar,

A todos que de alguma forma me apoiaram,

Dedico esta dissertação ao meu grande amigo (in memorian)

João Luiz Lang Pavlak (★ 1989 - † 2012)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre cuidar de mim, e sempre dar força para poder ajudar a todos.

Agradeço pela força do meu caro colega João, por toda sua ajuda nesse trabalho com os experimentos, com a busca de artigos e pelo companheirismo. Sempre estará nas minhas lembranças amigo.

Agradeço pela ajuda e apoio dos meus amigos Gerson Arnold, Rogério Correa, Camila da Luz Eltchechem, Janaína Angela Túrmina, Elisangela Toledo, Fabio Seidel, Fabio Andrade, Jorge Silveira, Álvaro Freire, Tiago Czervinski, Thiago Medeiros, Isabel de Almeida Paz, Thais Oliveira. Tenho muita sorte de ter vocês como amigos.

Agradeço ao prof. Carlos Ricardo Maneck Malfatti por mais um trabalho concluído dentro desses 6 anos de ensino e aprendizagem! Devo-te tudo o que eu tenho e sei meu caro!

Agradeço ao prof. Ivo Kerppers por todo auxilio para a execução do planejamento desse trabalho.

Agradeço ao Ricardo Pereira pela importante ajuda, e espero ter recompensado ajudando com as suas coletas.

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica José Pochapski, Alan Raczenski, Andressa Pezoti, Guilherme Martins, Andrieli Woelmer, Renan Michel e Leandro Lemos pelo companheirismo e importante ajuda nos experimentos. Já falei a cada um quanto foram importantes nesse trabalho!

Agradeço a CAPES pelo auxílio com a bolsa de estudos.

RESUMO

Introdução: O diabetes *mellitus* está associado a um conjunto de doenças relacionadas ao metabolismo da glicose, afetando a população de forma crescente, sendo um sério problema de saúde pública. O exercício aumenta a absorção muscular de glicose durante o período pré e pós-esforço, portanto é visto como uma parte útil do tratamento para manter o controle da glicemia no diabético. Estudos mostram que o consumo de cafeína na dieta aumenta a concentração de Ca^{2+} nas células β pancreáticas, estando envolvido na secreção de insulina. No entanto, pouco se sabe a respeito destas adaptações hormonais e metabólicas inerentes ao uso de cafeína de forma aguda em associação com o exercício. O objetivo do presente estudo consiste em verificar os efeitos da suplementação com cafeína associada ao exercício físico sobre a resposta glicêmica e insulínica em ratos diabéticos. **Métodos:** Foram utilizados 48 animais, com 60 dias de idade e 116 ± 3 g de peso. A indução do diabetes foi realizada pela administração de 60 mg/kg de estreptozotocina (STZ). De forma aguda, os animais receberam 6 mg de cafeína, ou 10 mg/kg sulfoniluréia e salina para os grupos controles. Os ratos permaneceram em jejum de 6 horas. Após a ingestão do respectivo tratamento, houve 50 minutos de repouso até o início do exercício. A glicose sanguínea foi medida por punção capilar por um glicosímetro portátil, nas situações de pré-tratamento, pré-exercício e após o exercício. Ao final do exercício, os animais foram sacrificados para coleta de sangue e análises bioquímicas (glicose, glicerol, lactato e insulina) através de técnicas colorimétricas usando kits bioquímicos. Antes e após a prescrição dos tratamentos, houve um controle das respostas cardiovasculares, utilizando um pletismógrafo de cauda. **Resultados e Discussão:** A prescrição de cafeína na dose de 6 mg/kg não alterou as respostas cardiovasculares. No entanto, a cafeína promoveu uma significante redução na glicemia sanguínea (42%) após 60 minutos do protocolo de exercício nos ratos diabéticos em relação aos grupos controles. Os níveis de insulina aumentaram 127% com o tratamento agudo com cafeína associado à sulfoniluréia comparado aos demais grupos diabéticos. **Conclusão**: Em conclusão, os resultados mostram que a ingestão aguda de

cafeína junto com exercício pode aumentar a captação de glicose periférica para o consumo no músculo esquelético, e sua associação com o fármaco sulfoniluréia aumentam a liberação de insulina plasmática pelo pâncreas deficiente em células β.

Palavras-chave: Diabetes, Cafeína, Exercício, Glicemia.

ABSTRACT

Introduction: The diabetes *mellitus* associated with a group of diseases related to glucose metabolism, increasingly affecting the population, being a serious public health problem. The exercise increases the muscle glucose uptake during and post-effort. Studies have shown that the consumption of caffeine in the diet increases the Ca^{2+} concentration in pancreatic β cell, which is involved with insulin secretion in diabetic rats. However, little is known about these hormonal and metabolic adaptations associated with the acutely use of caffeine in association with exercise. The aim of this study is to investigate the effects of supplementation with caffeine associated with physical exercise on glucose and insulin response in diabetic rats. **Methods:** It was used 48 rats, with 60 days old and 116 ± 3g of weight. The induction of diabetes was conducted by administering 60 mg/kg of streptozotocin (STZ). Acutely, the animals received 6 mg/kg of caffeine, or 10 mg/kg sulfonylurea and saline for control groups. The rats remained fasting 6 hours. After supplement intake, there were 50 minutes of rest until the beginning of the exercise. Blood glucose was measured for capillary puncture by a portable glucometer, in fasting, pre-exercise and after exercise. At the end of exercise, the animals were sacrificed for blood collection and biochemical analyzes (blood glucose, glycerol, lactateand insulin) by colorimetric techniques using biochemical kits. Before and after the prescribing treatment, there was a control of cardiovascular responses using a tail plethysmograph. **Results and Discussion:** Prescription of caffeine in the dose of 6 mg/kg did not alter cardiovascular responses. However, caffeine promoted a significant reduction in blood glucose (42%) after 60 minutes of exercise protocol in diabetic rats compared to control groups. Insulin levels increased 127% to acute treatment with caffeine associated with sulfonylurea compared to other diabetic groups. **Conclusion**: In conclusion, the results show that acute ingestion of caffeine along with exercise can increase glucose uptake in peripheral consumption in skeletal muscle, and its association with drug sulfonylurea increase the release of insulin by the pancreas deficient in β-cells.

Key-words: Diabetes, Caffeine, Exercise, Glucose.

Lista de Figuras

Figura 1 - Eventos para metabolização da cafeína..... 15

Figura 2 - Eventos para ativação do GLUT4 na célula muscular esquelética..... 19

Figura 3 – Protocolo Experimental..... 25

Figura 4 – Demonstração da administração do suplemento por gavagem..... 26

Figura 5 – Demonstração do teste de esforço..... 27

Figura 6 – Pletismógrafo de cauda..... 19

Figura 7 – Representação da janela de visualização do software *medidor de pressão Caudal v.1.2* durante um experimento de medida indireta dos dados cardiovasculares..... 30

Figura 8 - Comportamento da glicemia sanguínea durante a aplicação dos tratamentos..... 34

Figura 9 – Valores de insulina plasmática após o exercício..... 35

Figura 10 – Valores de glicerol sérico após o exercício..... 35

Figura 11 – Valores de lactato sanguíneo após o exercício..... 36

Lista de Tabela

Tabela 1 – Valores de glicose plasmática para diagnóstico de diabetes *mellitus* e seus estágios pré-clínicos.....8
Tabela 2 - Principais classes de agentes farmacológicos utilizados no controle da diabetes.....11
Tabela 3 - Quantidade de cafeína em bebidas.....16
Tabela 4 - Formação dos grupos experimentais..... 24
Tabela 5 – Respostas cardiovasculares antes e após os tratamentos.....32

Lista de abreviaturas

($VO_{2máx}$)	Consumo de oxigênio máximo
AMPc	Adenosina Monofosfato Ciclico
AMPK	Proteína Quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca^{+2}	Íon Cálcio
$[Ca^{+2}]_i$	Cálcio Intracelular
DM	Diabetes *mellitus*
DMT1	Diabetes *mellitus* tipo 1
DMT2	Diabetes *mellitus* tipo 2
ECG	Eletrocardiograma
FC	Freqüência Cardíaca
GJP	Glicose Plasmática de Jejum
GLUT-2	Transportador de Glicose 2
GLUT-4	Transportador de Glicose 4
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
IP_3	Inositol 1,4,5-Trifosfato
IRS-1 e 2	Substrato do Receptor de Insulina 1 e 2
K_{ATP}	Canal de K^+ sensível a ATP
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PDE	Enzima fosfodiesteraase
RE	Retículo Endoplasmático
SNC	Sistema Nervoso Central
STZ	Estreptozotocina
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose

SUMÁRIO

RESUMO.....i
ABSTRACT.....iii
1. INTRODUÇÃO.....1
1.1 Justificativa.....3
1.2 Objetivos.....3
1.2.1.....3
1.2.2.....4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....5
2.1.1 Diabetes *mellitus*.....5
2.1.2 Classificação do diabetes *mellitus*.....6
2.1.3 Fisiopatologia do diabetes mellitus.....6
2.1.3.1 Fisiopatologia do DMT1.....6
2.1.3.2 Fisiopatologia do DMT2.....7
2.1.4 Diagnóstico.....7
2.1.5 Tratamento.....8
2.1.5.1 Tratamento não medicamentoso.....8
2.1.5.2 Tratamento medicamentoso.....10
2.2 Exercício e Diabetes.....12
2.2.1 Efeitos do exercício sobre o metabolismo da Glicose.....13
2.3 Exercício, Diabetes e Cafeína.....14
2.3.1 Cafeína.....14
2.3.2 Cafeína e exercício.....16
2.3.3 Cafeína e controle da glicemia.....17
2.3.4 Cafeína, exercício, resistência à insulina e tolerância à glicose.....19
2.4 Modelos de diabetes *mellitus* experimental.....20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....23
3.1 Tipo de Pesquisa.....23
3.2 Animais do experimento.....23
3.3 Avaliação ética do estudo.....23
3.4 Delineamentos experimentais.....23
3.4.1 Indução a diabetes.....23
3.4.2 Distribuição dos grupos.....24
3.5 Procedimentos e Instrumentos de coleta.....24
3.5.1 Adaptação dos animais.....25
3.5.2 Administração dos tratamentos.....25
3.5.2.1 Cafeína.....25
3.5.2.2 Sulfoniluréia.....26
3.5.2.3 Controle.....27
3.6 Protocolo de nado forçado.....27
3.7 Análises bioquímicas.....28
3.7.1 Glicemia, glicerol e Lactato.....28
3.7.2 Análises hormonais.....28
3.8 Análises cardiovasculares.....28
3.9 Análises estatísticas.....30
4. RESULTADOS.....31
4.1 Dados cardiovasculares.....31

4.2 Dados bioquímicos.....33
5. DISCUSSÃO.....37
5.1 Dados cardiovasculares.....37
5.2 Glicemia e insulina sanguínea.....38
5.3 Glicerol.....41
5.4 Lactato sérico.....42
6. CONCLUSÃO.....45
7. REFERENCIAS.....46
8. ANEXOS.....64

1. INTRODUÇÃO

A alteração do estilo de vida ou incidências genéticas repercutem diretamente na saúde do indivíduo, podendo trazer desordens que culminem em deterioração de sistemas do organismo, os quais são importantes no controle do equilíbrio metabólico. O diabetes *mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pela alteração na homeostase dos substratos energéticos causando hiperglicemia devido à redução da liberação do hormônio insulina pelo pâncreas ou pela redução da resposta periférica do receptor de insulina ao seu hormônio (NOLAN et al., 2011).

As manifestações clínicas desta doença ocorrem tardiamente, quando as manobras terapêuticas são menos eficazes em preservar a qualidade de vida e longevidade (SBD, 2008).

O exercício, a dieta e o tratamento farmacológico são considerados as principais abordagens no tratamento do DM. A atividade física regular é recomendada para pacientes com DM e hipertensão arterial (HA), em razão de seus efeitos benéficos sobre o risco cardiovascular, controle metabólico e prevenção das complicações crônicas da doença (IRIGOYEN et al., 2003).

A prevalência do DM está aumentando de forma exponencial, adquirindo características pandêmicas em vários países, tanto desenvolvidos como os Estados Unidos, possuindo um percentual de 64,5% de pessoas com sobrepeso e obesidade (SULLIVAN et al., 2008), quanto nos países em desenvolvimento como o Brasil, que tem um percentual de 50,1% de sobrepeso e obesidade (IBGE, 2010).

Fatores de risco relacionados ao estilo de vida aumentam a incidência de DM. A Obesidade e o ganho de peso aumentam consideravelmente o risco de desenvolvimento da doença, já a inatividade física eleva o risco independentemente da obesidade. Além disso, uma dieta pobre em fibras tem sido associada com altos índices glicêmicos, aumentando o risco de DM (HU et al., 2001).

O exercício físico proporciona importantes mudanças na homeostasia da glicose, podendo diminuir os níveis sanguíneos em pessoas diabéticas, sendo necessário o controle glicêmico durante a atividade planejada. O monitoramento do estado glicêmico e do consumo de fármacos devem ser realizadas antes do exercício, sendo fundamentais para uma prática segura (ADA, 2006). Suplementações com substratos energéticos ou substâncias que auxiliam no controle glicêmico são consideradas boas estratégias para que não ocorram sobrecargas cardiovasculares ou rebote hipoglicêmico durante e após o esforço (ACSM, 2010)

O uso de substratos endógenos durante o exercício é importante para controlar o risco hiperglicêmico da pessoa diabética. Além disso, a intensidade e a duração do exercício são bem conhecidas por serem os dois principais fatores que determinam o balanço de utilização de substratos durante a atividade física (GRAHAM et al., 2008).

O treinamento aeróbico melhora a habilidade para o consumo de gordura durante o exercício de média para moderada intensidade, no entanto, a transição para o exercício intenso leva ao predomínio da oxidação de carboidrato (WACHOLTZ et al., 2009).

A ingestão de cafeína tem assumido um espaço de destaque na pesquisa mundial, estando associada com efeitos no metabolismo energético, podendo desde potencializar o desempenho esportivo (GRAHAM et al., 2011; ALTIMARI et al., 2008) ou até mesmo controlar a glicemia do paciente diabético (CONDE et al., 2012).

A cafeína e sua influência na mobilização de substratos energéticos para o indivíduo têm sido pesquisada durante anos, pois esta substância é facilmente encontrada na dieta diária, motivando pesquisas epidemiológicas e experimentais, que mesmo com divergências, trazem informações que se complementam numa rede, que podem tornar essa substância necessária ou não na alimentação diária.

Os mecanismos em que a cafeína se mostra presente para alterar condições normais na célula nos dão caminhos que podem trazer benefícios no tratamento da

DM, embora sejam necessárias elucidações para que essa molécula associada ao exercício físico possa fazer parte do cotidiano da pessoa diabética.

Dessa forma, este trabalho busca avaliar os efeitos dessa substância facilmente encontrada na dieta diária associada à prática de exercício físico, sobre o metabolismo e as respostas cardiovasculares em ratos diabéticos induzidos quimicamente pela droga estreptozotocina.

1.1 Justificativa

Atualmente, vários estudos têm mostrado o efeito da cafeína em parâmetros metabólicos no organismo, tanto voltado para o desempenho físico, como em trabalhos epidemiológicos com foco em patologias, como hipertensão e diabetes, no entanto, pouco tem se encontrado na literatura estudos relacionando a ingestão de cafeína associada ao exercício físico em modelo experimental de diabetes.

Algumas evidências vêm sugerindo uma possível ação da cafeína ou do exercício físico aeróbico sobre a resistência à insulina, entretanto é desconhecido o efeito da associação de ambas estratégias no controle metabólico da glicemia em modelo de diabetes experimental.

Assim, o desenvolvimento de um estudo que mostre um potencial efeito da cafeína no metabolismo lipídico e controle glicêmico e insulínico, juntamente com o efeito sensibilizador da insulina provocado pelo exercício físico, poderia contribuir para novas estratégias no tratamento do diabetes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos da ingestão aguda com cafeína associada ao exercício físico sobre a resposta glicêmica e insulínica em ratos diabéticos.

1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo consistem em:

i) Avaliar se a ingestão de cafeína associada ao exercício físico altera os níveis glicêmicos em ratos diabéticos ou ratos normais;

ii) Analisar se a ingestão de cafeína provoca algum efeito sobre a concentração de insulina sérica após o exercício;

iii) Analisar se a ingestão de cafeína altera os níveis plasmáticos de glicerol após o exercício;

iv) Quantificar os níveis de lactato sérico após os tratamentos ao final do exercício;

v) Avaliar o efeito da ingestão com cafeína sobre as respostas cardiovasculares em jejum e pré-exercício.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes *mellitus*

O DM é uma desordem metabólica, de muitas etiologias, comprometendo o controle glicêmico, resultando de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos. Os efeitos crônicos do DM incluem dano e falha em vários órgãos. Pode-se apresentar com características clínicas como poliúria, polidipsia, cegueira, diminuição da sensibilidade da derme ou falha renal (WHO, 1999).

O nome “diabetes melito” tem origem na palavra do grego antigo para “sifão”, porque os médicos antigos observaram que os diabéticos tendem a ter sede fora do comum e urinar muito. A parte “melito” da denominação provem da versão latina da palavra do grego antigo para mel, utilizada porque os médicos, nós séculos passados, diagnosticavam a doença pela degustação adocicada da urina do paciente (NIEMAN, 2011).

O DM é uma doença metabólica que afeta cerca de 346 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2011). A prevalência dessa doença vem aumentando, visto que, em 1985 em todo o mundo havia 30 milhões de indivíduos com DM (WHO, 1999). Segundo os dados epidemiológicos do Ministério da Saúde (2006), a incidência da DM vem crescendo a percentuais de 10%, como foi observado entre 1996 a 2006.

No Brasil, a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,2%, o que representa 6.399.187 de pessoas que confirmaram ser portadoras da doença. A prevalência aumenta com a idade: o DM atinge 18,6% da população com idade superior a 65 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). As cidades das regiões Sul e Sudeste, consideradas de maior desenvolvimento econômico do país, apresentam maiores prevalências de DM e de tolerância à glicose (SARTORELLI e FRANCO, 2001).

2.1.1 Classificação do diabetes *mellitus*

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo do tratamento. Deste modo, os termos DM insulino-dependente e DM insulino-independente não devem mais ser utilizados (SBD, 2008).

A DM recebeu sua classificação pela OMS em 1999, e buscou-se observar o estágio clínico da doença e o tipo etiológico de hiperglicemia (WHO, 1999; ADA, 2006). O diabetes pode ser classificado como: a) Diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1); b)Diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2); c) Diabetes gestacional; d) Outros tipos específicos de diabetes.

2.1.2 Fisiopatologia do diabetes *mellitus*

As características do DM tipo 1 e 2 são relacionadas à redução na secreção do hormônio insulina e à resistência a esse hormônio nos seus receptores, respectivamente. Dados epidemiológicos apontam que 90% dos casos de DM no mundo tem como prevalência o tipo 2, sendo o tipo 1 menos comum (VANZYL, 2009).

2.1.2.1 Fisiopatologia do DMT1

A origem do DM tipo 1 esta predominantemente relacionada com a destruição das células β-pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, devido a uma resposta auto-imune causada pelas células auto-reativas T-helper 1 (Th1). Como resultado, as células Th1 inibem a proteção natural das células β-pancreáticas, ocorrendo aumento da secreção de citocinas, interleucinas pró-inflamatórias e interferon, causando inflamação e necrose das células β-pancreáticas (MONTI et al., 2009).

2.1.2.2 Fisiopatologia do DMT2

O inicio do DM tipo 2 está relacionado com a resistência ao hormônio insulina, causando aumento nos níveis glicêmicos, podendo causar diversos tipos de complicações, e em estágios avançados da doença, levando à falência das células β-pancreáticas, causando redução significativa na produção de insulina (PAULI et al., 2011).

Os possíveis mecanismos que cercam a resistência à insulina incluem polimorfismos genéticos na fosforilação da tirosina do receptor, inibição da fosforilação dos substratos IRS 1 e 2, e consequente redução na liberação de transportadores de glicose para a membrana celular (WILCOX, 2005).

2.1.3 Diagnóstico

Por décadas, o diagnóstico do DM tem sido baseado sobre os níveis de glicose plasmática ou glicose plasmática de jejum (GPJ) ou com o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Em 1997, fez-se a primeira revisão sobre os critérios para diagnóstico do DM, o *Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus*, usando a associação entre os níveis de GPJ e a presença de retinopatia como fator-chave para identificar o nível de glicose e seu limiar. Foram examinados dados de 3 estudos epidemiológicos que associaram retinopatia com níveis de GPJ, 2 horas após TOTG e hemoglobina glicada. Esses estudos ajudaram a informar um novo diagnóstico para um nível de glicose em ≥126 mg/dl para GPJ e após duas horas de TOTG, com níveis glicêmicos de ≥200 mg/dl, para se diagnosticar a pessoa com DM. A decisão sobre qual o teste deve ser usado para avaliar um paciente para o DM deve ser um critério do profissional de saúde, tendo em conta a disponibilidade e praticidade do teste para o paciente (ADA, 2010). Os critérios atuais de diagnóstico do DM são resumidos na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de glicose plasmática (mg/dl) para diagnóstico do diabetes *mellitus* e seus estágios pré-clínicos

Categoria	Jejum*	2h após 75g de glicose (TOTG)
Tolerância à glicose diminuída	100 à 126 mg/dl	<140 mg/dl
Diabetes *mellitus*	≥126 mg/dl	≥200 mg/dl

Fonte: SBD, 2006; ADA, 2010.

*O jejum é definido como a falta de ingestão calórica por no mínimo 6 horas.

2.1.4 Tratamento

O tratamento do DM, tanto tipo 1 quanto tipo 2, deve levar em conta os níveis de glicemia do paciente, tempo de existência da patologia, fatores que influenciam o surgimento da síndrome de resistência à insulina, como a obesidade e inatividade física (SARTORELLI e FRANCO, 2003). O controle da hiperglicemia pode ser feita de modo agudo por medicamentos, no entanto, a manutenção da glicemia de forma crônica, pelo controle dos fatores de risco, é de fundamental importância, pois evita danos em tecidos cardiovasculares, renais, neuronais, oftálmicos e em células imunes, que poderiam predispor o paciente a condições de morbi-mortalidade (MURUSSI et al., 2003; SCHEFFEL et al., 2004).

O tratamento do DM deve estar sincronizado com tratamentos que modifiquem o estilo de vida, alterando comportamentos como o tabagismo, inatividade física e maus hábitos alimentares, e utilizando estratégias para controle de forma rápida ou aguda, no caso do uso de fármacos (HU et al., 2001).

2.1.4.1 Tratamento não medicamentoso

Devido a alta taxa de morbidade e mortalidade em pacientes com DM, a detecção precoce ou sua prevenção trás um enorme beneficio social, médico e econômico. A intervenção no início da história natural do DM com medidas não medicamentosas, no caso do DMT2, revertem defeitos fisiopatológicos presentes no

estado pré-diabético e retardam ou até mesmo inibem o desenvolvimento da sindrome (DEFRONZO e ABDUL-GHANI, 2011).

Para o paciente com DM tipo 1, deve-se ter como objetivo observar o controle metabólico, promovendo o bem estar físico e psíquico, e evitando possíveis complicações crônicas. Este tratamento deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar, que avalie o consumo calórico diário, o tipo de alimento ingerido, o nível de atividade física realizada, e a insulinoterapia como base para o tratamento (GROSS et al., 2000).

Exercício e dieta são os primeiros meios de tratamento para pessoas diagnosticadas com o DMT2. O controle de alguns fatores de risco modificáveis, como o peso, consumo alimentar habitual, uso do tabaco e prática de atividades físicas mostrou possuir um potencial de redução de 88% no risco de desenvolver o DMT2 em indivíduos com histórico familiar (HU et al., 2001).

A atividade física é uma estratégia importante para uma pessoa com diagnóstico com DMT2, devido à redução do tecido adiposo, tecido este relacionado diretamente com a resistência à insulina, e também no controle dos níveis glicêmicos advindos da tolerância à glicose (PAULI et al., 2011). Os efeitos do exercício físico também devem ser implantados na prevenção da doença, buscando observar a redução de peso em pessoas obesas, e assim diminuindo este fator de risco.

O papel do controle nutricional para a manutenção da DMT2 é muito importante, levando em conta que 51% das pessoas que se alimentam adequadamente têm uma menor probabilidade de ter a patologia (NIEMAN, 2011).

O tipo de carboidrato numa refeição deve ser escolhido com cautela, pois alimentos com alto índice glicêmico afetam diretamente os níveis de glicose no sangue, dificultando o controle. Novas dietas, com formulações específicas para o paciente com DM devem ser escolhidas pelo profissional capacitado, sendo um aliado importante no controle dos níveis glicêmicos, e por diminuir os índices de massa corporal (VOSS et al., 2008).

O aumento no consumo de carboidratos de fácil absorção à longo prazo pode aumentar o risco de desenvolvimento de DMT2 (WILLETT et al., 2002). Duas hipóteses de mecanismo têm sido sugeridas, uma é mediada pelo aumento da resistência à insulina e a segunda, pela exaustão das células β-pancreáticas, devido ao excesso de insulina liberada.

2.1.4.2 Tratamento medicamentoso

O DM está associado não somente com a hiperglicemia, mas também com outros fatores de risco aterogênicos, incluindo hipertensão e dislipidemia, e complicações como retinopatia, nefropatia e neuropatia. Assim, os objetivos do tratamento do DM devem buscar o controle dos níveis de glicose no sangue, diminuindo assim a incidência e gravidade das complicações à longo prazo (GALLAGHER et al., 2008). Antes de se iniciar a ação medicamentosa para o controle glicêmico, deve-se focar em alteração no estilo de vida, como inicio de atividades físicas e melhorar a alimentação (TUOMILEHTO et al., 2001; KNOWLER et al., 2002).

As principais classes de agentes farmacológicos disponíveis para o controle da DM podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Principais classes de agentes farmacológicos utilizados no controle do diabetes*mellitus*

Medicamento	Classe	Mecanismo de Ação	Administração	Meia-Vida (horas)	Metabolismo	Excreção
Sulfoniluréia	Tolbutamida	Secreção de Insulina	Oral	4-7	Hepático	Renal e Biliar
	Glibenclamida	Secreção de Insulina	Oral	6-12	Hepático	Renal e Biliar
	Glimepirida	Secreção de Insulina	Oral	8-16	Hepático	Renal e Biliar
Biguanida	Metformina	Sensibilização periférica à insulina	Oral	2-4	---	Renal
Tiazolidinediona	Rosiglitazone	Sensibilização periférica à insulina	Oral	3-4	Hepático	Renal
	Pioglitazone	Sensibilização periférica à insulina	Oral	3-7	Hepático	Renal
Análogos de GLP-1	Exenatide	Secreção de Insulina	Injeção subcutânea	3,5	Hepático	Renal
	Liraglutide	Secreção de Insulina	Injeção subcutânea	13	Hepático	Renal
Inibidores da α-Glucosidase	Acarbose	Redução de absorção de glicose pelo intestino	Oral	2-4	Trato gastrointestinal	Renal
	Miglitol	Redução de absorção de glicose pelo intestino	Oral	2,5-5	Hepático	Renal
Secretagogos	Nateglinida	Secreção de Insulina	Oral	1,5	Hepático	Renal
	Repaglinida	Secreção de Insulina	Oral	1	Hepático	Biliar e Renal

Fonte: Adaptado de Chitre e Burke (2006).

Os medicamentos devem ser prescritos pelo médico responsável, sendo importante o conhecimento da ação de tal fármaco pelos profissionais da área da saúde que estarão em contato direto com esse paciente. Para evitar a hipoglicemia pós-exercício, os indivíduos devem regular a dosagem de insulina antes e possivelmente depois do exercício (GALBO et al., 2007).

2.2 Exercício e Diabetes

A inatividade física, dieta desequilibrada e o envelhecimento induzem ao acúmulo de gordura visceral e redução da sensibilidade à insulina no músculo esquelético. A diminuição da sensibilidade à insulina provoca hiperinsulinemia e redução de metabolização da glicose (MICHISHITA et al., 2008).

O exercício é caracterizado por aumentar o consumo de glicose pelo músculo esquelético (BAJPEYI et al., 2009; GARETTO et al., 1984). Este efeito é mantido por até de 48 horas durante a recuperação de uma única sessão de exercício aeróbico ou anaeróbico em indivíduos não-diabéticos e em indivíduos que apresentam DMT2 (BOULE et al., 2005; GARCIA-ROVES et al., 2003; CARTEE et al., 1989). O aumento da sensibilidade dos receptores de insulina na célula muscular esquelética e maior expressão do transportador de glicose 4 (GLUT4) são características observadas do exercício físico melhorando a captação de glicose (PLOCKINGER et al., 2008; GILL et al., 2007).

As respostas metabólicas ao exercício físico crônico podem apresentar-se diferenciadas nos indivíduos com DM, quando comparados à indivíduos normais. O exercício físico pode aumentar a sensibilidade à insulina em até 40%. Isso ocorre devido o exercício potencializar o efeito da fosforilação do receptor de insulina partindo para o substrato do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e 2) e conseqüente mobilização de GLUT4 e captação de glicose (HOWLETT et al., 2002).

A importância do sedentarismo como fator de risco para DMT2 e os efeitos preventivos da atividade física tem sido bem estudados atualmente. Existe a hipótese que a atividade física possa aumentar os níveis de tolerância à glicose, bem como melhorar a resposta dos receptores de insulina após o exercício, comparando pessoas exercitadas com pessoas sedentárias (BAZZANO et al., 2005).

Eriksson e Lindgärde (1997) realizaram um estudo por 5 anos, o qual controlava a dieta, aumentava a atividade física e fazia check-ups regulares em

diabéticos tipo 2. Os resultados mostraram melhora em 50% na metabolização da glicose nos sujeitos com intolerância à glicose e remissão do quadro diabético. Além disso, a pressão arterial, dislipidemia e a hiperinsulinemia reduziram significativamente.

2.2.1 Efeitos do exercício sobre o metabolismo da glicose

A manutenção dos níveis de glicose sanguínea no repouso e durante a atividade física depende da coordenação e integração entre sistema nervoso e sistema endócrino (SUH et al., 2007).

Durante exercícios moderados de media duração em pessoas não diabéticas, a principal fonte energética até 5 minutos de exercício são os carboidratos, sendo que a captação de glicose aumenta e consequentemente ocorre liberação via hepática para manter os níveis glicêmicos desejáveis para a manutenção da fonte energética utilizada. Em indivíduos com DMT2, durante o exercício de média intensidade de media duração, a captação de glicose pelos músculos é maior do que a produção de glicose pelo fígado, levando a queda dos níveis da glicose sanguínea ao longo do exercício (MINUK et al., 1981).

Em idosos que apresentam o quadro de DMT2 associado à sarcopenia, ocorre uma redução da massa muscular e conseqüente diminuição da força, podendo alterar o metabolismo energético e consequente aumento da glicemia. O exercício resistido é uma estratégia interessante para aumentar a massa muscular esquelética, podendo reverter o quadro já instalado, melhorando o quadro de resistência à insulina (CIOLAC et al., 2002). Ambos exercícios, aeróbico e de resistência, aumentam a quantidade de GLUT4 e entrada de glicose no músculo, mesmo na presença de resistência à insulina (WANG et al., 2009; O'GORMAN et al., 2006; CHRIST-ROBERTS et al., 2004; CUFF et al., 2003).

A atividade física é um importante componente do tratamento da resistência à insulina, sendo demonstrados seus efeitos tanto na primeira sessão de exercício,

quanto ao treinamento crônico. Persghin et al. (1996) analisaram o efeito de uma sessão aguda de uma mistura de exercícios aeróbicos e resistidos, e relataram os efeitos do exercício após 6 semanas com o mesmo protocolo de treinamento sobre os valores de insulina estimulada no músculo esquelético. Os resultados mostraram aumento de 40% na sensibilidade da insulina com o treinamento crônico, e 22% com o treino agudo, melhorando a metabolização da glicose após as sessões.

Uma semana de treinamento com exercícios aeróbicos podem melhorar a sensibilidade à insulina em indivíduos com DMT2 (WINNICK et al., 2008). No músculo esquelético, os exercícios aeróbicos podem aumentar a atividade da enzima glicogênio sintase e a expressão da proteína GLUT4 sem a sinalização da insulina (CHRIST-ROBERTS et al., 2004). A oxidação dos ácidos graxos pode aumentar a ação da insulina, e o treinamento físico aumenta a capacidade de β-oxidação no tecido adiposo (KELLEY et al., 2007; DUNCAN et al., 2003; GOODPASTER et al., 2003).

2.3 Exercício, diabetes e cafeína

2.3.1 Cafeína

A cafeína é um alcalóide pertencente ao grupo das metilxantinas (1,3,7-trimetilxantina) formada pelos grupos teofilina, paraxantina e a teobromina. Alcança um pico de contração plasmática em 30 a 60 minutos após usa ingestão (RANG et al., 2004).

Os efeitos fisiológicos da cafeína incluem a estimulação do sistema nervoso central (SNC), aumento na produção de urina, diminuição da resistência vascular periférica, aumento de secretagogos gástricos, ativação do músculo cardíaco e relaxamento do músculo liso (GRAHAM, 1997).

A cafeína é completamente absorvida pelo trato intestinal, tendo biodisponibilidade de 100% (SAWYNOK e YAKSH, 1993). A sua molécula se liga a

proteínas plasmáticas, sendo a albumina uma das principais, com percentual entre 10% a 35% de todas as proteínas. A cafeína tem facilidade em passar pelas barreiras celulares, bem como a hemato encefálica e a placenta, podendo atingir grandes concentrações por todo o organismo, inclusive no encéfalo, tendo ação em vários tecidos (TAVARES E SAKATA, 2012).

A cafeína é metabolizada no fígado, com a remoção do grupo metila, na posição 1 e 7. Catalisada pelo citocromo P450 1A2, forma três grupos de metilxantina (figura 1). A metabolização em humanos acontece na forma de paraxantina (84%), teofilina (1,3 dimetilxantina) e de teobromina (3,7-dimetilxantina), através da troca do grupo metila nas posições 1,3,7 (NABHOLZ, 2007). O produto final é conhecido como 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil (CREWS et al., 2001).

O pico de excreção urinária da cafeína ocorre em 2,5 horas. A meia-vida da cafeína é de 1,5 a 10 horas, mas seu *clearence* é significativamente menor em relação a altas doses (ROBERTSON et al, 1981; KAPLAN, 1997).

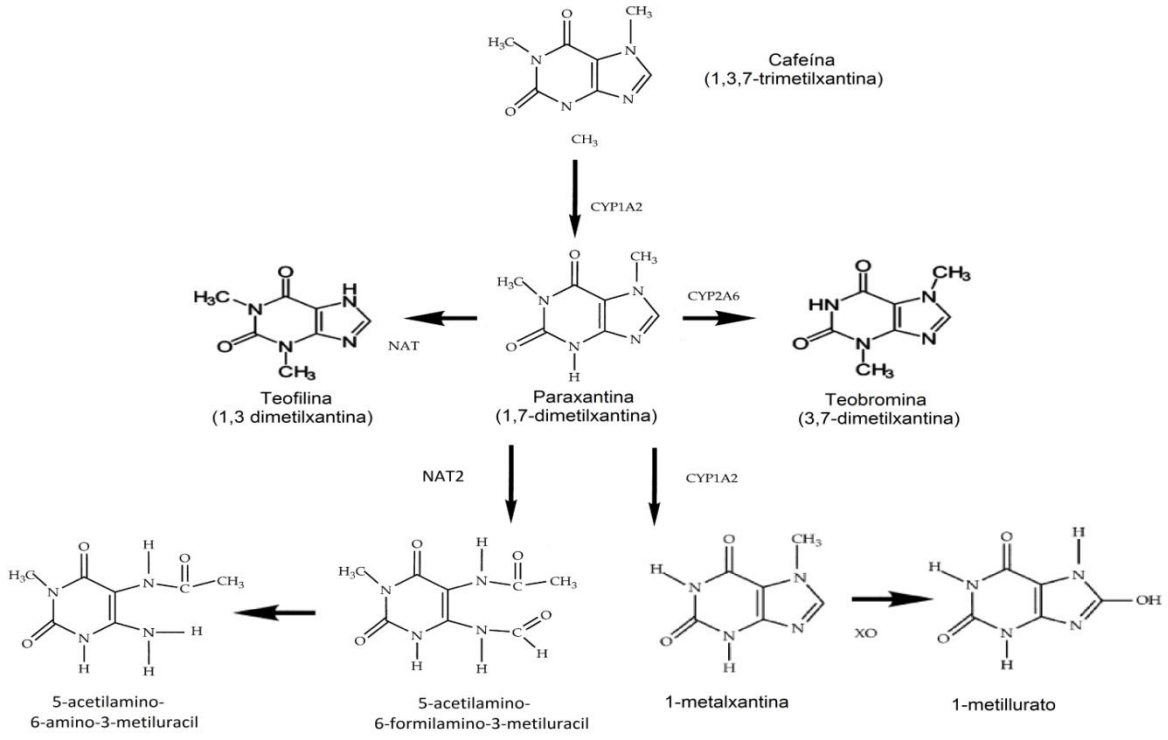

Figura 1 - Eventos para metabolização da cafeína. Fonte: adaptado de Krul e Hageman, 1998.

Uma xícara de café (240 ml) pode conter em torno de 100 mg de cafeína, porém, um recente estudo norte americano mediu a quantidade de cafeína em uma xícara de café (240 ml), com diferença na sua preparação (instantâneo, coado) podendo variar em 70 a 130 mg (MCCUSKER, 2003) (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantidade de cafeína em bebidas

Bebida	Cafeína (mg)
Café (240 ml)	
Coado	64-124
Instantâneo	40-108
Descafeinado	2
Chá (150 ml)	
Mate	28-44
Preto	10-20
Verde	10-20
Branco	10-20
Chocolate (150 ml)	5-35
Refrigerantes (350 ml)	
Coca-Cola	15-24
Pepsi Cola	15-24
Energéticos (150 ml)	80

Fonte: Adaptado de Paluska, 2003.

Os principais mecanismos exercidos pela cafeína são baseados na mobilização intracelular de Ca^{2+}, aumento de catecolaminas e antagonismo dos receptores de adenosina (PALUSKA, 2003; RIBEIRO e SEBASTIÃO, 2010).

2.3.2 Cafeína e exercício

Graham (2001), relatou as doses habitualmente utilizadas de cafeína em experimentos, observando que as doses variam de 3 a 9 mg/Kg, sendo ótima entre 3 a 6 mg/Kg.

Os mecanismos relacionados aos efeitos da cafeína no sistema metabólico no músculo esquelético estaria relacionado pelo aumento de bombas de Na^{+}/K^{+},

aumento da concentração cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) no tecido muscular esquelético durante o estimulo físico do exercício, e também pelo aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), pela ação direta de inibição da enzima fosfodiesterase (PDE), responsável pela degradação do AMPc. Todas essas ações teriam efeito direto sobre a regulação metabólica, aumentando a mobilização de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, aumentando sua disponibilidade para a contração muscular (NABHOLZ, 2007; GREENBERG et al., 2006).

A explicação quanto ao aumento da mobilização de ácidos graxos livres pela cafeína ocorre devido ao aumento na liberação de catecolaminas pelo papel de antagonismo dos receptores de adenosina. O aumento de ácidos graxos no sangue e no músculo acelera a oxidação desta fonte energética, mantendo os níveis de glicogênio hepático e muscular normais, melhorando a performance durante o exercício (GLAISTER, 2008; GREENBERG, 2006; GRAHAM, 2001; MCARDLE et al, 2001; WILMORE e COSTILL, 2001).

2.3.3 Cafeína e controle da glicemia

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células β do pâncreas e sua síntese e liberação ocorre devido ao aumento da glicose sanguínea. A insulina tem ação endócrina (tecido muscular, adiposo, hepático, nervoso), parácrina (células α-pancreáticas) e autócrina (receptores específicos de inibição de liberação nas células β-pancreáticas) (HABER et al., 2001). Seus efeitos endócrinos na homeostase metabólica estão entre o aumento da captação de glicose, síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como inibição da gliconeogênese, glicogenólise, lipólise e proteólise (ZECCHIN, 2007).

A pré-pro-insulina, forma inicial do hormônio, é sintetizada no reticulo endoplasmático (RE) a partir do seu RNAm e transportada para o complexo de Golgi, onde uma série de clivagens proteolíticas geram a insulina madura e um peptídeo residual, o peptídeo C (KUMARet al., 2005).

A captação de glicose pelas células β do pâncreas é realizada por uma proteína de transporte de glicose independente de insulina, o GLUT2. O GLUT2 transporta glicose para o citosol, depois ocorre conversão dessa molécula e formação de ATP. O aumento de ATP bloqueia os canais de K^+ sensíveis ao ATP, aumentando K^+ intracelular, causando a despolarização da membrana e entrada de Ca^{2+}, através dos canais da Ca^{2+} voltagem-dependente. A elevação da concentração de $[Ca^{2+}]_i$ estimula a secreção de insulina, presumivelmente através da liberação da molécula armazenada nos grânulos das células β (QUESADA et al., 2006; KUMAR et al., 2005; YADA et al., 1995; HUGHES et al., 1990).

Park et al. (2007), mostraram em seu estudo que o consumo de cafeína na dieta à longo prazo, aumenta a secreção de insulina e também aumenta no número das células β pancreáticas, em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Outros estudos também mostram aumento de insulina sérica com a ingestão de cafeína (THONG et al., 2002; JOHNSTON et al., 2003; ROBINSON et al., 2004; PETRIE et al., 2004; LANE, 2004; LEE et al., 2005; BATTRAM et al., 2006). Os resultados obtidos nesses estudos mediram concentrações de peptídeo-C, o qual estava elevado, respaldando a hipótese de que o aumento na concentração de insulina no sangue se deve ao aumento na liberação desse hormônio pelo pâncreas (ROBINSON et al., 2004; LEE et al., 2005; BATTRAM et al., 2006) e consequente redução da concentração da glicose sanguínea pela associação da cafeína com um efeito de melhor entrada de glicose obtido pela expressão de proteínas transportadoras (PARK et al., 2007; WINNICK et al., 2008).

A cafeína poderia ainda estar envolvida na inibição da glicogenólise e gliconeogênese pelo bloqueio dos receptores de adenosina localizados na membrana do hepatócito (RIBEIRO e SEBATIÃO, 2010; YASUDA et al.,2003), porém, esses efeitos ainda não são claros.

2.3.4 Cafeína,exercício,resistência à insulina e tolerância à glicose

Nas células musculares esqueléticas, a glicose é transportada pelo GLUT-4 que é mobilizado para a membrana pela ação da insulina após ocorrer fosforilações até ativar a proteína transportadora ou por um estimulo na proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (HAWLEY e LESSARD, 2008) (figura 2).

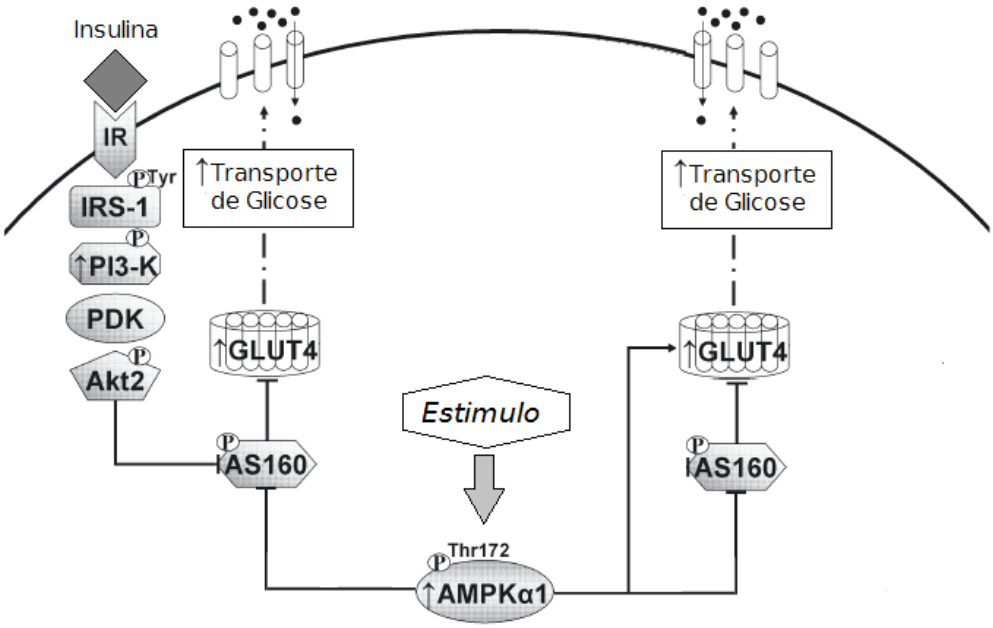

Figura 2 - Eventos para ativação do GLUT-4 na célula muscular esquelética. Fonte: adaptado de Hawley e Lessard, 2008.

Desde 1968, é estudada a influência da cafeína sobre a insulina e o transporte de glicose para as células (LANE, 2011; FEINBERG et al., 1968). Estudos clínicos têm mostrado efeitos positivos da cafeína sobre o aumento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina (CONDE et al., 2012; MATSUDA et al., 2011; YAMAGUCHI et al., 2010; EGAWA et al., 2009; HUXLEY et al., 2009; PARK et al., 2007; JHONSTON et al., 2003). A quantidade de cafeína usada nesses estudos está em torno de 100 à 200 mg.

Lane (2010) reportou em sua revisão estudos que mostram a cafeína como prejudicial ao indivíduo diabético, tanto pela redução da tolerância à glicose e pela

diminuição da sensibilidade à insulina. Em seu estudo, ele destaca que as doses se encontram em torno de 250 à 500mg.

Pimentel et al. (2009) mostraram em sua revisão a relação entre o consumo de café ou cafeína em indivíduos com DM. Os estudos avaliaram os efeitos do café ou da cafeína nessa população, e foi revelado que o consumo moderado de café (≥4 copos de café/dia de 150 ml cada ou ≥400 mg de cafeína/dia) tem sido relacionados com uma diminuição no risco da resistência à insulina. Nessa mesma revisão, a dose de consumo está diretamente relacionada com a redução dos riscos da DM.

A cafeína pode aumentar a expressão de GLUT4 devido ao aumento das concentrações de $[Ca^{2+}]_i$ e também por aumentar a expressão da enzima AMPK (PARK et al., 2007; CHU et al., 2011). A cafeína também estaria estimulando o aumento do RNAm do GLUT-4 no músculo esquelético, aumentando a transcrição do gene dessa proteína transportadora (EGAWA et al., 2009).

Em relação ao consumo de cafeína e ação do exercício, os mecanismos para os possíveis efeitos da cafeína na estimulação do GLUT-4 no músculo esquelético estariam relacionados aos efeitos positivos da utilização da cafeína sobre a atividade das bombas de Na^+/K^+, a concentração intramuscular de íons Ca^{2+} durante a atividade física, e os níveis aumentados de AMPc (NABHOLZ, 2007; GREENBERG et al., 2006).

2.4 Modelos de diabetes *mellitus* experimental

O interesse em estudar as causas, os mecanismos e o controle da DM tem rendido à comunidade cientifica modelos experimentais interessantes, tentando mimetizar as características clínicas da doença e trazendo informações importantes para explicar os complexos efeitos dessa patologia no organismo.

Os modelos existentes para indução de diabetes são classificados como dietético, químico e genético (KIRSTEN et al., 2010).

No modelo de diabetes conhecido como “dieta de cafeteria”, o rato é induzido à obesidade pelo aumento de calorias na dieta, sabendo que a obesidade está relacionada com a resistência à insulina, por ser um dos seus principais fatores de risco (HEYNE et al., 2009).

Os modelos químicos são observados quando administradas drogas que levam à hiperglicemia no animal, devido à redução de células β-pancreáticas. Duas drogas são muito utilizadas para a indução do diabetes, a aloxana e a estreptozotocina.

A aloxana (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) tem retratado um quadro de diabetes insulino dependente. Após sua administração por via intraperitonial (ip), entre as doses de 20 à 150 mg/kg, a droga é captada pela célula pelo transportador de glicose. Dentro da célula, a aloxana exibe afinidade aos compostos sulfídricos, ocorrendo produção de radicais livres, e conseqüente morte celular da célula β-pancreática por um mecanismo de falência por liberação de insulina, envolvendo a glicoquinase e a concentração de $[Ca^{2+}]_i$. O interessante, é que esses radicais livres não causam danos às células hepáticas (SZKUDELSKI, 2001).

A estreptozotocina (STZ) (2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glicopiranose) é um análogo de glicose sintetizada pelo fungo *Streptomyces achromogenes.* É utilizada para induzir tanto um quadro de diabetes insulino dependente (DM tipo1), como um quadro de diabetes insulino não dependente (DM tipo 2) (SZKUDELSKI, 2012). Após sua administração, por via ip. ou intravenosa (iv), entre as doses de 50 à 75 mg/kg, é captada pela célula β-pancreática pelo GLUT2 (TAKADA et al., 2007). Seu efeitos são trifásicos, ocorrendo hiperglicemia durante as primeiras duas horas, hipoglicemia durante as primeiras 24 horas devido ao excesso de liberação de insulina, e hiperglicemia permanente após este período (SZKUDELSKI, 2001). A possível explicação do efeito diabetogênico da STZ é devido a redução do conteúdo de nicotinamida adenina dinucleotideo (NAD^+) nas células β. A STZ mantém a célula continuamente ativada, depletando os estoques de NAD^+ celulares, causando a morte da célula β (SHARMA, 2009; SZKUDELSKI, 2012). Quando apresentado hiperglicemia

de jejum após a administração de STZ, a destruição celular pode ficar entre 70-90% no pâncreas (JONES et al., 1980; ELAYAT et al., 1995).

Takada et al. (2007) ainda demonstraram em seu trabalho que a STZ reduz em 81% no número de receptores de insulina nas células adiposas, efeito este ainda não explicado. A STZ piora a resposta ao teste de tolerância à glicose (PORTHA et al., 1979; TAKADA et al., 2007) e diminui a sensibilidade das células β aos níveis de glicose plasmáticos (GIROIX et al., 1983).

O modelo de diabetes induzido por STZ é um dos mais utilizados atualmente devido a redução expressiva de células β-pancreáticas, mimetizando o DM tipo 1, mas também sendo observado redução na sensibilidade periférica à insulina, característica observada no DM tipo 2 (TAKADA et al., 2007; SHARMA, 2009; SZKUDELSKI, 2012).

Os modelos genéticos de desenvolvimento espontâneo têm sido estudados em amplo espectro por 2 fatores patogenéticos que se complementam: os defeitos imunológicos e a predisposição genética (KIRSTEN et al., 2010). Dois tipos de modelos são muito utilizados hoje em dia, sendo eles os ratos BB (*Biobreading*) e os camundongos NOD (*Non ObeseDiabetic*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de pesquisa

Este estudo se caracteriza pelo desenho experimental por ensaio, distribuição randomizada da amostra, com controle das variáveis e processo duplo-cego de aplicação do ensaio (GAYA et al., 2008).

3.2 Animais do experimento

Foram utilizados 48 ratos adultos machos da linhagem *Wistar*. Os animais foram provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Centro-Oeste. Os ratos foram mantidos no Laboratório de Bioquímica do Exercício (LABE/I), da Universidade Estadual do Centro-Oeste. Após o desmame, foram distribuídos em gaiolas coletivas, quatro ratos por caixa, sob condições ambientais controladas de temperatura (25^{o}C) e ciclo claro/escuro (12h/12h) com água e alimentação (ração Purina®) *ad libitum*.

3.3 Avaliação ética do estudo

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Centro Oeste (protocolo 026/2011).

3.4 Delineamentos experimentais

3.4.1 Indução à diabetes

O modelo experimental de diabetes foi induzido pela administração intraperitonial (ip) de estreptozotocina (STZ) (60 mg/kg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) (YUN et al., 2006). A STZ foi dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5) e injetada cerca de cinco minutos após a diluição. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas antes da indução. Foram incluídos nos grupos diabéticos os animais que apresentaram glicemia de jejum >250 mg/dl.

Os animais encontravam-se com peso corporal médio de 116,56 ± 3,72 g no dia da administração da STZ.

3.4.2 Distribuição dos grupos

Conforme a tabela 4, os animais foram divididos de forma aleatória, compondo 6 grupos de acordo com a suplementação recebida.

Tabela 4 - Formação dos grupos experimentais. (n=48)

Grupos	Intervenção	N
1- Controle	Exercício + Salina	08
2- Controle Cafeína	Exercício + Ingestão de Cafeína	08
3- STZ	Exercício + Salina	08
4- STZ Cafeína	Exercício + Ingestão de Cafeína	08
5- STZ Sulfoniluréia	Exercício + Ingestão de Sulfoniluréia	08
6- STZ Cafeína+ Sulfoniluréia	Exercício+ ingestão de Cafeína e Sulfoniluréia	08

3.5 Procedimentos e instrumentos de coleta

O protocolo experimental pode ser observado na figura 3, sendo composto por análise das respostas cardiovasculares e glicêmicas pré-tratamento (após 6 horas de jejum). A seguir foi administrada a respectiva substância e a segunda análise das respostas cardiovasculares e glicêmicas foi realizada antes do exercício. Após o protocolo de exercício físico, os animais foram sacrificados e as análises bioquímicas foram realizadas.

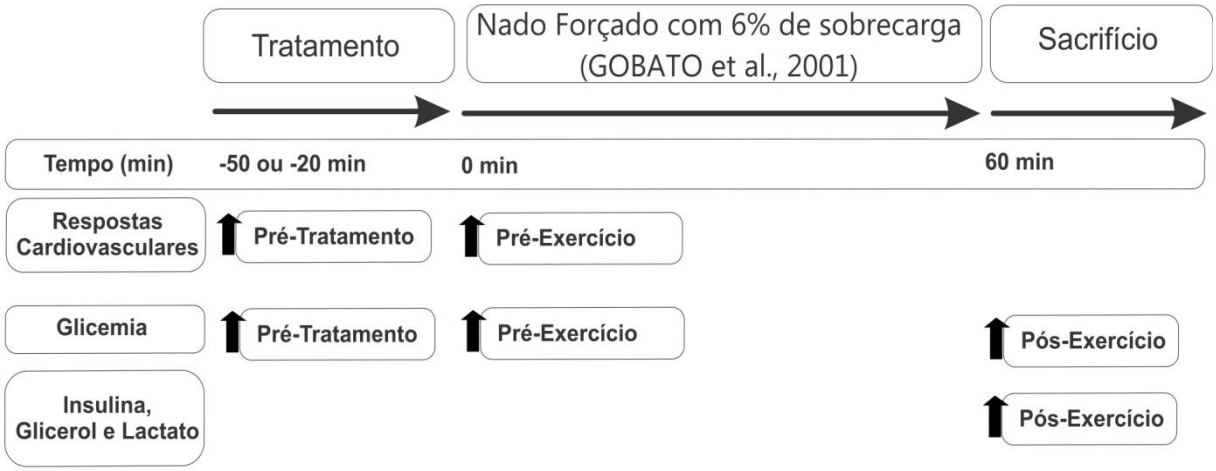

Figura 3 – Protocolo Experimental. Os dados foram coletados durante o pré-tratamento, pré-exercício e pós-exercício. As setas verticais representam o momento da coleta, as setas horizontais representam o tempo da coleta.

3.5.1 Adaptação dos animais

Quando os animais estavam com 60 dias, foi iniciada a adaptação ao exercício. Todos os animais foram submetidos a um protocolo de natação durante três dias que antecederem o experimento, para que se adaptassem ao meio em que irão realizar o exercício, atenuando fatores de intervenção como adaptação ao nado e níveis de estresse.

– 1° dia: 5 minutos de natação com água na profundidade de 40 cm;

– 2° dia: 10 minutos de natação com água na profundidade de 40 cm;

– 3° dia: 15 minutos de natação com água na profundidade de 40 cm.

3.5.2 Administração dos tratamentos

3.5.2.1 Cafeína

Logo após jejum de 6 horas, foi administrada cafeína dissolvida em água e administrada por meio de gavagem (figura 4), com antecedência de 50 minutos ao início do teste, em ordem aleatória e pela mesma pessoa. O tempo de intervalo para o efeito da substância está relacionado com seu pico de concentração plasmática que

está em torno de 30 à 60 minutos (RANG et al., 2004). Após a administração, os animais permaneceram em repouso até o início da natação.

Figura 4 – Demonstração da administração do tratamento por gavagem

A cafeína utilizada neste experimento foi proporcional ao peso médio dos animais, na quantidade de 6 mg/kg, diluída em água (GRAHAM, 2001).

3.5.2.2 Sulfoniluréia

A administração de sulfoniluréia ocorreu antes do exercício. A glibenclamida, uma sulfoniluréia de segunda geração aumenta a secreção de insulina pelas células β-pancreáticas. Esta droga atua no bloqueio do canal de K^+ sensível a ATP (K_{ATP}), o que aumenta o tempo de despolarização das células β, permitindo maior secreção de insulina e normalização dos níveis glicêmicos. No experimento, será usada como controle positivo na liberação de insulina em relação aos demais grupos.

Os animais em jejum de 6 horas receberam, por gavagem, uma solução com o fármaco sulfoniluréia glibenclamida (10 mg/kg) diluída em água (1,4 mg/ml). A quantidade foi determinada por Geisler et al. (2009). Após 20 minutos da aplicação do fármaco, foi realizado o teste de natação. O tempo de intervalo para o efeito da substância está relacionado com seu pico de concentração plasmática que está em torno de 10 à 30 minutos (RANG et al., 2004).

3.5.2.3 Controle

Para o grupo controle foi administrado solução salina (água e NaCl) por meio de gavagem, 20 minutos antes do teste de natação.

3.6 Protocolo de exercício físico

O exercício empregado no experimento entra como estimulador do consumo de glicose, pois durante o exercício, o músculo é exigido e necessita de nutrientes (GILL et al., 2007; PLOCKINGER et al., 2008; RUFFO et al., 2009). Após o exercício, pode se mensurar o quanto a cafeína auxiliou na captação de glicose pelo músculo, ou a ação da sulfoniluréia e/ou da cafeína na liberação de insulina das células β-pancreáticas na corrente sanguínea.

Após serem devidamente identificados, os animais foram colocados em um tanque coletivo com água para o teste de natação. O tanque teve profundidade de aproximadamente 40 cm, preenchido com água aquecida e mantida à temperatura em torno de 30 ± 1°C (figura 5). Essa temperatura foi utilizada por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura corporal dos ratos durante o exercício (AZEVEDO, 1994).

Figura 5 – Demonstração do teste de esforço em tanque de natação previamente aquecido

Os animais foram pesados um dia antes da realização do teste para confecção dos coletes de chumbo, tendo sobrecarga de 6% proporcional ao peso individual, sendo fixados no tórax dos ratos. O sobrepeso utilizado teve por finalidade tornar o exercício compatível com a intensidade aeróbica (KOKUBUN, 1990; GOBATO et al., 2001). O teste de natação teve duração de 60 minutos por rato.

Os animais foram colocados no tanque de natação com diferença de 10 minutos entre um e outro, respeitando o tempo de tratamento por meio de gavagem.

3.7 Análises bioquímicas

Imediatamente após o termino do exercício, os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina específica e foram coletadas amostras de sangue (4 a 5 ml) para análise da glicemia, glicerol, lactato e insulina. O sangue foi centrifugado em à 2500 rpm por 10 minutos, e após foi analisado pelo equipamento específico para análise.

3.7.1 Glicemia, glicerol e lactato

Os níveis de glicose, lactato e o glicerol plasmático foram analisados utilizando o Kit enzimático de glicose da Bio Técnica® em um analisador semi-automático de bioquímica (Diaglobe CA-2006, MA, EUA).

3.7.2 Análises hormonais

A insulina plasmática foi determinada por quimioluminescência (DPCimmulite 2000R, Los Angeles, EUA).

3.8 Análises cardiovasculares

Os dados de pressão arterial sistólica, diastólica e a freqüência cardíaca foram obtidos através de um pletismógrafo de cauda (INSIGHT®, Brasil) (figura 6).

Figura 6 – Pletismógrafo de cauda

O animal foi pré-aquecido com um secador de cabelo, para melhorar o fluxo sanguíneo na cauda. O animal foi imobilizado através de um contensor apropriado ao seu tamanho.

Para a análise dos parâmetros, a cauda dos animais foi colocada em um manguito de borracha à região proximal da cauda e o aparelho desenvolvia movimento de insuflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50 segundos.

Os animais passaram por adaptação de 2 semanas no aparelho para que estes se acostumassem com o procedimento e se obtivessem medidas confiáveis. No dia do teste, antes e após o tratamento, cada animal teve seus dados cardiovasculares mensurados por no mínimo 3 três vezes, fazendo-se dessa maneira uma media dos valores ao final das medições.

A comunicação de dados entre o pletismógrafo e o computador se deu através de um software próprio do aparelho denominado *Medidor de Pressão Caudal v.1.2* (INSIGHT®, Brasil) (figura 7).

Figura 7 – Representação da janela de visualização do software *Medidor de Pressão Caudal v.1.2*® durante um experimento de medida indireta dos dados cardiovasculares. Os quadros representam: A – Pressão Arterial (linha vermelha); B - freqüência cardíaca (linha vermelha ondulatória). As linhas verticais azuis (quadro A) indicam o ponto de aquisição da pressão arterial sistólica (1) e diastólica (2).

3.9 Análises Estatísticas

Todos os resultados foram representados como média ± DP. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS 13.0 para *windows* (Chicago, IL, EUA). Inicialmente foi realizada a análise de normalidade das variáveis utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*, e após aplicou-se o teste estatístico ANOVA de uma via, considerando significância para $p<0.05$. Para identificar as diferenças significativas foi utilizado o teste *Post-hoc Student-Newman-Keuls.*

4 RESULTADOS

4.1 Dados cardiovasculares

Os dados relacionados à freqüência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) não foram diferentes significativamente após as suplementações em cada grupo.

Os resultados mostram que a cafeína não teve efeito sobre os dados cardiovasculares com a dose de 6 mg/kg nos grupos do estudo (tabela 5).

Tabela 5 – Respostas cardiovasculares antes e após os tratamentos. Dados representam a média ± DP.

Grupos (n = 48)	FC (bpm)		PAS (mm/Hg)		PAD (mm/Hg)	
	Pré-tratamento	Pré-Exercício	Pré-tratamento	Pré-Exercício	Pré-tratamento	Pré-Exercício
Controle	375 ± 5	336 ± 6	124 ± 2,4	126 ± 3	80 ± 4	81 ± 3
Cafeína	450 ± 24	359 ± 28	125 ± 1,0	126 ± 2	83 ± 3	81 ± 3
STZ	434 ± 17	433 ± 17	126 ± 1,3	120 ± 5	83 ± 2	82 ± 3
STZ Sulfoniluréia	414 ± 12	416 ± 17	123 ± 1,7	122 ± 4	80 ± 2	81 ± 2
STZ Cafeína	436 ± 19	433 ± 25	123 ± 2,0	123 ± 1	82 ± 2	82 ± 4
STZ Cafeína + Sulfoniluréia	427 ± 17	417 ± 22	125 ± 12,0	124 ± 4	84 ± 5	83 ± 5

Abreviações: FC: Frequência Cardíaca; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica.

4.2 Dados bioquímicos

Os dados referentes à resposta da glicemia sanguínea pré-tratamento, pré-exercício e pós-exercício podem ser observados na figura 8.

A glicemia plasmática em jejum foi diferente estatisticamente entre os grupos diabéticos e os animais normais ($p<0.05$).

Entre os grupos, após o tratamento, o grupo STZ Cafeína teve redução significativa de 25% (100 mg/dl) comparado aos grupos STZ e STZ Cafeína+Sulfoniluréia ($p<0.05$). Os valores glicêmicos não foram diferentes comparando os grupos STZ Cafeína com o grupo STZ Sulfoniluréia ($p>0,05$). Comparando os grupos não diabéticos, o tratamento com cafeína não alterou os valores da glicemia sanguínea ($p>0.05$).

Quando se compara os valores glicêmicos antes e após o tratamento no mesmo grupo, a cafeína reduziu significativamente em 23% (92 mg/dl) a glicose sanguínea no grupo STZ Cafeína ($p<0.05$). No entanto, não se observou diferença entre os demais grupos.

Após o nado forçado, a glicemia no grupo STZ Cafeína teve redução significativa de 42% (154 mg/dl) quando comparado ao grupo STZ ($p<0.05$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos com ratos normais, mesmo com o tratamento com cafeína.

No grupo STZ Cafeína, ocorreu redução significativa de 50% na glicemia sanguínea quando comparado o jejum em relação ao pós-exercício ($p<0.05$).

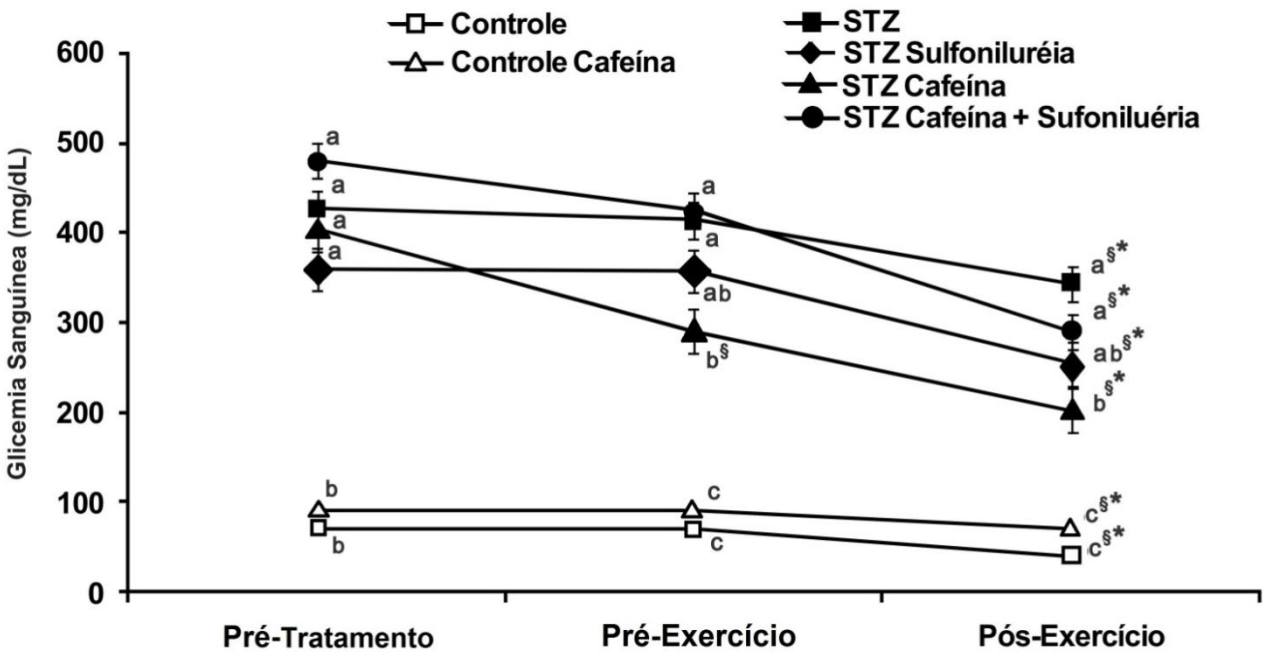

Figura 8 - Comportamento da glicemia sanguínea durante a aplicação dos tratamentos. Os valores estão dispostos em média ± DP (n=48). (§) estatisticamente diferente em relação ao estado pré-tratamento no mesmo grupo ($p<0.05$); (*) estatisticamente diferente em relação ao pré-exercício no mesmo grupo ($p<0.05$); (a,b,c,d) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos ($p<0.05$; Student-Newman-Keuls após ANOVA one way).

Os valores de insulina plasmática podem ser observados na figura 9. O grupo STZ Sulfoniluréia+Cafeína teve sua insulina plasmática diferente significativamente em relação aos grupos STZ (127%; 0,94 Uμ/mL), STZ Sulfoniluréia (127%; 0,94 Uμ/mL) e STZ Cafeína (126%; 0,99 Uμ/mL) após sua ingestão e do exercício físico ($p<0.05$). Os grupos diabéticos (STZ, STZ Cafeína e STZ Sulfoniluréia) tiveram suas médias de insulina menores significativamente em relação ao grupo Controle ($p<0.05$).

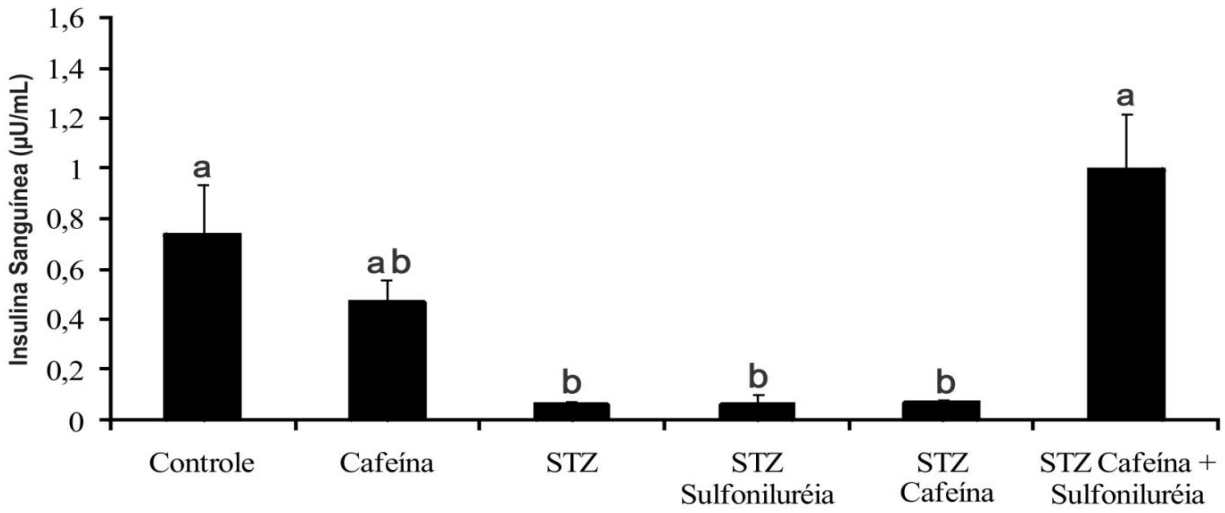

Figura 9 – Valores de insulina plasmática após os tratamentos e o exercício. Dados representam a média ± DP (n=48). (a,b) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos (p<0.05; Student-Newman-Keuls após ANOVA one way).

Os dados relacionados aos níveis de glicerol sérico podem ser observados na figura 10. Após a ingestão do respectivo tratamento e o exercício, todos os três grupos que receberam cafeína (Controle Cafeína, STZ Cafeína e STZ Cafeína+Sulfoniluréia) tiveram diferenças significativas entre 80% e 100% em relação aos grupos controles, tanto diabético quanto normal. O grupo STZ Sulfoniluréia também teve diferença significativa em 100% em relação aos grupos controles, tanto o diabético quanto o normal.

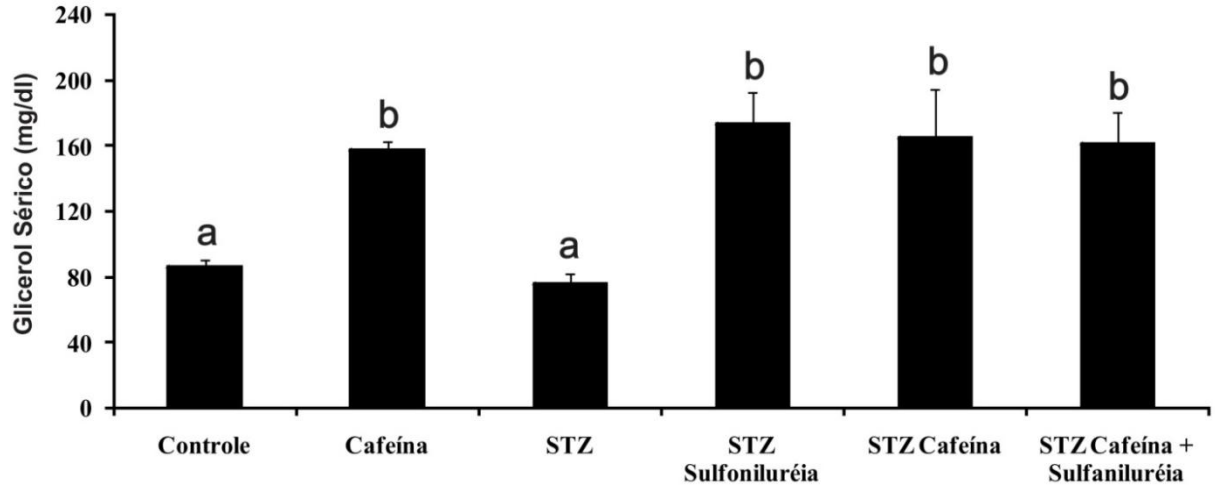

Figura 10 – Valores de glicerol após o exercício. Dados representam a média ± DP (n=48). (a,b) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos (p<0.05; Student-Newman-Keuls após ANOVA one way).

Após o tratamento e exercício, o lactato sanguíneo foi maior no grupo STZ Cafeína+Sulfoniluréia quando comparado aos demais tratamentos ($p<0.05$) (figura 11). O grupo STZ Cafeína+Sulfoniluréia teve 45% de aumento comparado com aos grupos controles com e sem diabetes ($p<0.05$), e 30% em relação aos grupos que receberam cafeína, tanto diabético quanto normal ($p<0.05$).

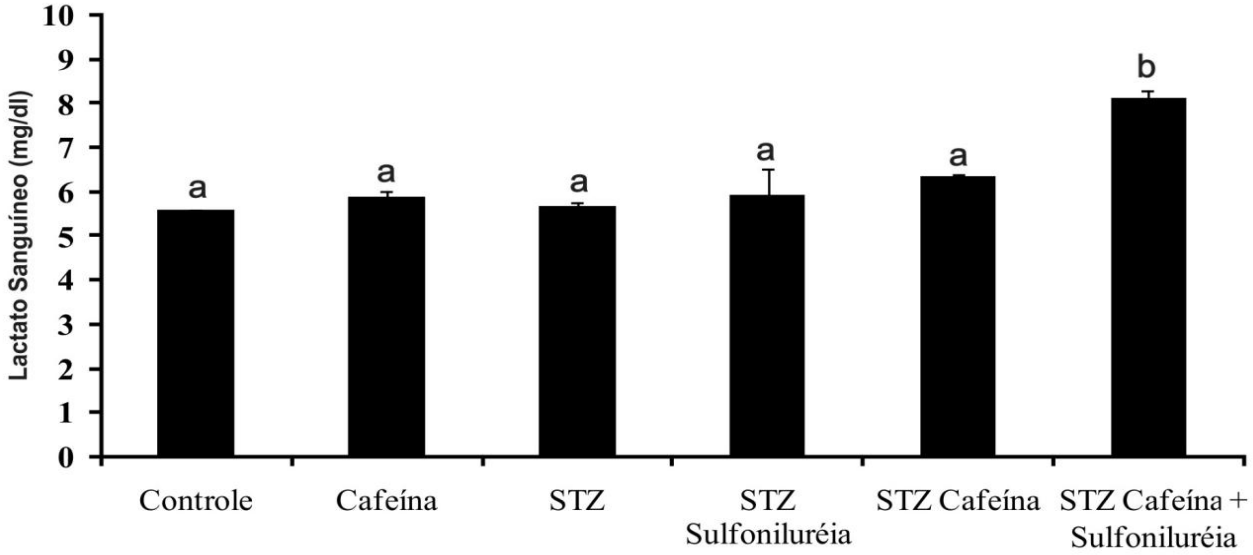

Figura 11 – Valores de lactato sanguíneo após o exercício. Dados representam a média ± DP (n=48). (a,b) letras diferentes são estatisticamente diferentes entre os grupos ($p<0.05$; Student-Newman-Keuls após ANOVA oneway).

5 DISCUSSÃO

5.1 Dados cardiovasculares

Os valores obtidos de PAS, PAD e FC antes e após os tratamentos demonstram que nenhum tratamento teve efeitos nesses parâmetros. Como mostrado por estudos anteriores, a cafeína aumenta a liberação de catecolaminas, o que influencia diretamente o sistema nervoso simpático e conseqüente aumento da pressão arterial (NURMINEN et al., 1999; PALUSKA, 2003). Apesar de a cafeína ter um efeito clássico no aumento da PAS e na FC, devido sua ação no sistema adrenérgico, com a ingestão de 6 mg/kg, não houve diferença significativa em relação ao estado pré-tratamento comparado ao pré-exercício.

Em estudo realizado por Daniels et al. (1998) com 10 ciclistas treinados que receberam 6 mg/kg cafeína e realizaram exercício em um cicloergômetro, à 65% do consumo de oxigênio máximo ($VO_{2máx}$), não ocorreu diferença significativa nos níveis de FC e PA durante e após o exercício.

A cafeína pode modificar as ações hemodinâmicas cardiovasculares por ser antagonista não seletivo aos receptores de adenosina, causando uma possível ação vasoconstritora (RANG et al., 2004). No entanto, este efeito não foi observado a partir da dose usada no presente estudo. O antagonismo da cafeína sobre os receptores de adenosina também tem possível ação sobre o controle hemodinâmico glomerular, sendo que os receptores A_1 tem ação constritora sobre o vaso das arteríolas eferentes no rim, e a cafeína pode estar controlando a pressão glomerular por esta via (MURRAY e CHURCHILL, 1985).

O estado hiperglicêmico constante provocado pela estreptozotocina em ratos causa dano renal, podendo alterar ações hemodinâmicas glomerulares, mas não altera a pressão arterial nesses animais (DOBRZYNSKI et al., 2002).

Noordzij et al. (2005), em sua meta análise, concluíram que o consumo regular de cafeína pode aumentar a pressão arterial, mas quando sua ingestão é feita a partir do consumo de café, o efeito da cafeína na pressão arterial não é significativa.

5.2 Glicemia e insulina sanguínea

A resistência à insulina é definida como uma menor resposta do receptor a esse hormônio, resultando em menor ação nos tecidos. Esse termo geralmente é aplicado quando se refere a redução de entrada de glicose na célula, aumentando a glicemia sanguínea, causando hiperglicemia, e conseqüente hiperinsulinemia, pelo excesso de estimulo à liberação de insulina pelo pâncreas (DEFRONZO, 2004).

A menor resposta metabólica aos níveis circulantes de insulina contribui para as anormalidades em tecidos periféricos (músculo, fígado e tecido adiposo), no sistema nervoso central (neurônios hipotalâmicos envolvidos no controle alimentar) e na célula β-pancreática (PRADA e SAAD, 2011). Em indivíduos obesos, sedentários e em diabéticos tipo 2, a resistência que as células encontram para sensibilizarem seus receptores para insulina é aumentada, entre 75% no músculo esquelético e 2-3% no tecido adiposo (DEFRONZO, 2004).

Como observado na figura 8, no grupo STZ Cafeína, os valores de glicose sanguínea mostram que ocorreu redução significativa após a suplementação sem o exercício, com percentual de 25% quando comparado com o jejum. Park et al. (2007) mostraram aumento da expressão de GLUT2 e glicoquinase no fígado após a ingestão de cafeína, ação essa que poderia estar envolvida na via da glicogênese. Chu et al. (2011) mostraram que a administração de 0,05 mg/ml de café pode aumentar a captação de glicose em adipócitos isolados pelo possível aumento do GLUT4.

Quando se compara o grupo STZ com o grupo STZ Cafeína, ocorreu redução em 42% nos níveis glicêmicos após suplementação com cafeína isolada e do nado forçado. Estudos anteriores mostraram que a cafeína pode atuar como agente sensibilizador da insulina no músculo esquelético e no adipócito devido à maior

expressão de GLUT4 relacionado ao aumento do Ca^{2+} na célula (MATSUDA et al., 2011; CHU et al., 2011).

No grupo STZ Sulfoniluréia+Cafeína ocorreu redução de 32% na glicemia sanguínea comparando pré-exercício com pós-exercício. A explicação acerca do percentual de redução na glicemia menor do que observado no grupo STZ Cafeína comparando pré-exercício com pós-exercício poderia ser respondida pela ação do fármaco, que é transportado pelo GLUT2 para dentro da célula (PORZIO et al., 1999) acontecendo sua ação característica na célula β-pancreática, mas também com efeitos em outros tecidos que apresentam esse transportador, como nos hepatócitos (AGIUS, 2009), podendo estar atuando em alguma via de sinalização no metabolismo glicêmico nesse tecido, mantendo os níveis de glicose plasmática acima dos níveis encontrados no grupo STZ Cafeína. Assim, o fármaco poderia estar alterando o metabolismo glicêmico hepático, sendo interessante novos estudos elucidando esta questão.

No grupo STZ Sulfoniluréia+Cafeína ainda teve aumento na secreção de insulina comparado aos grupos STZ, STZ Sulfoniluréia e STZ Cafeína, podendo estar ocorrendo um efeito sinérgico do fármaco e da cafeína aumentando as concentrações de insulina plasmáticas, o que seria muito interessante no tratamento do DM. Quando se associa sulfoniluréia e cafeína para os ratos com deficiência na produção de insulina, os níveis plasmáticos do hormônio se equivalem ao dos ratos sem o quadro de diabetes, o que poderia auxiliar no controle glicêmico em portadores de DM tipo 1, pela característica redução de liberação de insulina encontrada nesses pacientes. Entretanto, deve-se observar que o número de células β pancreáticas está diminuído, e esta superprodução de insulina poderia causar falência a longo prazo nas células β-pancreáticas restantes, as quais estão entre 10-30%. Desse modo, um estudo analisando o efeito da administração crônica de sulfoniluréia associada à cafeína no modelo de diabetes experimental poderia responder esta questão acerca da sobrevivência das células β-pancreáticas.

A ação da STZ no pâncreas reduz a sintese e liberação de insulina, pois ocorre a necrose das células β (SCHNEDL, 1994; SZKUDELSKI, 2001). O modelo STZ demonstra características de resistência à insulina, com redução de tecido adiposo, e também redução expressiva nos receptores de insulina a nível celular (81%) (TAKADA et al., 2007). Desse modo, estudos anteriores mostram que a cafeína pode atuar em uma maior expressão de GLUT4 nas células musculares, devido à maior concentração de Ca^{2+} intracelular (PARK et al., 2009). Desta forma, a cafeína associada ao exercício seria uma estratégia interessante para o paciente diabético tipo 2, pela significativa redução da glicemia sanguínea, podendo estar atuando por algum mecanismo relacionado à resistência à insulina.

Outra explicação pode ser dada em função ao antagonismo dos receptores de adenosina (A_1 e A_2), relacionados com a glicogenólise muscular e hepática, podendo a cafeína estar participando no consumo e na preservação da glicose em forma de glicogênio (YASUDA et al., 2003), estimulando o consumo de ácidos graxos pelo músculo esquelético, devido à maior disponibilidade desse substrato (DONG et al., 2001).

O conhecimento dos acontecimentos relacionados à cafeína sobre a resistência à insulina ou liberação de insulina pelo pâncreas ainda são muito escassos, mas em estudo realizado por Park et al. (2007), a cafeína melhorou a homeostase da glicose pelo aumento da liberação de insulina, possivelmente pela sinalização do fator de crescimento de insulina 1 (IGF-1), sendo um fator encontrado na cascata de liberação do hormônio nas células β.

Conde et al. (2012) observaram em seu estudo que a ingestão de 1 g/l de cafeína controlou os níveis de glicose e insulina sanguínea de ratos diabéticos induzidos por dieta extra-lipídica, modelo para indução de obesidade e resistência à insulina. Os valores de insulina plasmática chegaram a 5,48 µg/l nos ratos obesos que não receberam cafeína, reduzindo significativamente para 1,84 µg/l no grupo que recebeu cafeína.

Os resultados do presente estudo demonstram uma redução significativa de 19% na glicemia dos ratos STZ controle (de 426 para 343 mg/dl) comparando entre pré-tratamento com o estado pós-exercício no mesmo grupo. Howarth et al. (2007) demonstraram em seu estudo redução de 25% da glicemia sanguínea comparando ratos STZ antes e após o exercício.

Já é bem aceito que o exercício físico pode estar relacionado com aumento da sensibilidade à insulina, expressão de GLUT4 e na atividade da enzima glicogênio sintase nas células musculares no DMT2, e este estimulo pode permanecer por até 48 horas (CHRIST-ROBERTS et al., 2004).

5.3 Glicerol sérico

A cafeína inibe a enzima PDE, responsável pela degradação do AMPc (VAN BAAK e SARIS, 2000). Devido a cafeína aumentar significantemente a concentração de AMPc rapidamente após o início do exercício, o AMPc tem estimulo na liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) (PALUSKA, 2003).

As catecolaminas são fundamentais na performance física por aumentar a contração muscular, aumentar a resposta cardiovascular, melhorar a entrada de glicose na célula muscular, aumentar a lipólise e consequente mobilização de ácidos graxos, preservando o glicogênio para posteriores estágios energéticos (SAYAMA et al., 2000; MOUGIOS et al., 2003).

Os dados de glicerol sérico apresentados mostram aumento para os grupos que receberam cafeína, em relação aos grupos controles, tanto diabéticos quanto normais, com diferenças médias de 90%.

Zheng et al. (2004) demonstraram que os níveis de glicerol e ácidos graxos livres aumentaram pela ingestão de cafeína e catequinas (outro componente encontrado no café). Segundo os autores, este efeito pode estar ocorrendo pela estimulação simpática, elevando a oxidação de triglicerídeos nas células adiposas.

Foi reportado que a cafeína melhora a oxidação de lipídios pelo músculo esquelético após o exercício anaeróbico (GRAHAM, 1997) e durante o exercício aeróbico de longa duração (SILVEIRA et al., 2004) devido a inibição da PDE, inibindo a enzima hexoquinase no músculo esquelético, aumentando a glicogênese e aumentando o consumo de ácidos graxos.

No estudo reportado por Conde et al. (2012), os níveis de catecolaminas foram 124% maiores significativamente para o grupo que recebeu cafeína, mas sem alteração nos níveis de ácidos graxos livres, glicose plasmática e dos dados cardiovasculares em relação ao grupo controle.

Vergauwen et al. (1997) mostraram que o antagonismo não-seletivo dos receptores A_1 e A_2 pela cafeína diminui a glicogenólise no músculo esquelético, demonstrando efeito modulador da cafeína no metabolismo dos carboidratos. No entanto, não se sabe se este efeito sobre os receptores de adenosina tem ação no metabolismo de ácidos graxos.

Larsen et al. (1999) encontraram maior liberação de catecolaminas quando foi associado sulfoniluréia ao exercício comparado ao grupo controle, isso poderia explicar o aumento da mobilização de glicerol no grupo STZ Sulfoniluréia que apresentou aumento de 100% no glicerol sérico. Assim, novos estudos comparando os níveis de catecolaminas poderiam elucidar se esse aumento de glicerol sérico teria influência após a ingestão de cafeína ou também sulfoniluréia, tanto isolados como associados.

5.4 Lactato sérico

A quantidade de lactato no sangue é um importante indicador de esforço físico, determinando o estado metabólico do organismo, e relacionado com a intensidade de esforço realizada e o substrato energético utilizado (GOBATTO, 2001).

Gobatto et al. (2001) consideram que ratos destreinados podem suportar entre 5 e 6 % de sobrecarga, estabilizando os níveis de lactato em 5,5 mmol/l.

A cafeína, tanto no grupo diabético quanto não diabético, não teve efeito sobre o lactato sanguíneo em relação aos grupos controles, mesmo resultado encontrado por Silveira et al. (2004) em seu estudo com ciclistas, que administraram cafeína (5mg/kg) 60 minutos antes ao exercício intermitente anaeróbico de 11 minutos em cicloergômetro à 30% do limiar ventilatório, não ocorrendo diferença na concentração de lactato com a suplementação em relação ao grupo controle.

Contudo, Anselme et al. (1992) mostraram que após ingestão de 250mg de cafeína em exercício anaeróbico máximo, a cafeína aumentou significativamente o lactato no sangue de ciclistas (8,32 mmol/l) em relação ao teste placebo (7,17 mmol/l), mostrando melhora no desempenho pelo aumento da disponibilidade de glicose no músculo em exercício anaeróbico máximo.

Como observado na figura 11, ocorreu aumento entre 30 e 45% nos níveis de lactato no sangue para o grupo STZ Sulfoniluréia+Cafeína comparado aos grupos demais grupos, tanto diabéticos quanto normais.

O aumento da lactacidemia quando utilizou-se a sulfoniluréia glibenclamida associada ao exercício foi também observada por em estudo realizado por Larsen et al. (1999), ocorrendo melhor resposta e maior degradação de glicose, aumento dos níveis de lactato para o sangue, o qual vai ser ressintetizado em glicose no fígado. Entretanto, quando o fármaco foi utilizado isolado não teve diferença no lactato sérico, sendo somente observado aumento da lactacidemia com a associação da cafeína. Larsen et al. (1999) encontraram maior liberação de catecolaminas quando foi associado sulfoniluréia ao exercício comparado ao grupo controle, podendo ser um dado interessante para o aumento do lactato sanguíneo, pois estudos anteriores mostram que a estimulação adrenérgica e a maior concentração de catecolaminas estão diretamente envolvidas no aumento de glicólise e conseqüente aumento de lactato (HANSEN et al., 2005; LINDINGER, 2007).

Desse modo, a cafeína e a sulfoniluréia poderiam estar estimulando a redução de piruvato na célula muscular esquelética, aumentando os níveis séricos de lactato,

ação que estaria envolvida com a estimulação adrenérgica na célula. Assim, novos estudos observando os níveis de catecolaminas plasmáticas poderiam responder essa questão.

6. CONCLUSÃO

i) A cafeína reduziu a glicemia nos ratos diabéticos após sua administração;

ii) A cafeína associada à sulfoniluréia aumentou a concentração de insulina sérica após tratamento e exercício físico nos ratos diabéticos;

iii) A cafeína aumentou os níveis de glicerol sanguíneo após a administração e do exercício físico em ratos diabéticos e em ratos normais;

iv) A cafeína associada à sulfoniluréia aumentou os níveis de lactato sérico após o nado forçado em ratos diabéticos;

v) A cafeína não alterou os valores cardiovasculares em repouso tanto em ratos normais como em ratos diabéticos.

7. REFERENCIAS

1. ALTIMARI, L.R.; FONTES, E.B.; OKANO, A.H.; TRIANA, R.O.; CHACON-MIKAHIL, M.P.T.; MORAES, A.C. A ingestão de cafeína aumenta o tempo para fadiga neuromuscular e o desempenho físico durante o exercício supramáximo no ciclismo. Brazilian Journal of Biomotricity, v.2, n.3, p. 195-203, 2008.
2. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. Exercise and Type 2 diabetes. Medicine &Science in Sports&Exercise. v.42, n.12, p.2282-2303. 2010.
3. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care, v.3, p.62–9, 2010.
4. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Physical Activity/Exercise and Diabetes Mellitus. Diabetes Care, v.29, p.1433-38, 2006.
5. ANSELME, F.; COLLOMP, K.; MERCIER, B.; AHMAÏDI, S.; PREFAUT, C. Caffeine increases maximal anaerobic power and blood lactate concentration. European Journal Of Applied Physiology And Occupational Physiology, v.65, n. 2, p.188-191, 1992.
6. AZEVEDO, J.L Jr.; LINDERMAN, J.K.; LEHMAN, S.L.; BROOKS, G.A. Training decrease muscle glycogen turnover during exercise. Europen Journal Physiology Occupational Physiological, v.78, n.6, p.479-486, 1998.
7. BAJPEYI, S.; TANNER, C.J.; SLENTZ, C.A. Effect of exercise intensity and volume on persistence of insulin sensitivity during training cessation. Journal Applied Physiology, v.106, n.4, p.1079–85, 2009.
8. BATTRAM, D.S.; ARTHUR, R.; WEEKES. A.; GRAHAM, T.E. The glucose intolerance induced by caffeinated coffee ingestion is less pronounced than that due to alkaloid caffeine in men. Journal Nutrition, v.136, p.1276-1280, 2006.
9. BAZZANO, L.A.; SERDULA, M. LIU, SIMIN. Prevention of Type 2 Diabetes by Diet and Lifestyle Modification. Journal of the American College of Nutrition, v. 24, n. 5, p.310-319, 2005.

10. BEZPROZVANNY, I. BEZPROZVANNAYA, S. EHRLICH, B.E. Caffeine-induced Inhibition of Inositol(1,4,5)-Trisphosphate-gated Calcium Channels from Cerebellum. Molecular Biology of the Cell, v.5, p.97-103, 1994.
11. BOULÉ, N.G.; WEISNAGEL, S.J.; LAKKA, T.A.; TREMBLAY, A.; BERGMAN, R.N.; RANKINEN, T.; LEON, A.S.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; RAO, D.C.; BOUCHARD, C. Effects of exercise training on glucose homeostasis: the HERITAGE Family Study. Diabetes Care, v.18, n.1, p.108-114, 2005.
12. CARTEE, G.D.; YOUNG, D.A.; SLEEPER, M.D.; ZIERATH, J.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; HOLLOSZY, J.O. Prolonged increase in insulinstimulated glucose transport in muscle after exercise. American Journal Physiology, v.256, p.E494–9, 1989.
13. CASTANEDA, C.; LAYNE, J.E.; MUNOZ-ORIANS, L. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. Diabetes Care, v.25, n.12, p.2335–41, 2002.
14. CHITRE, M.M.; BURKE, S. Treatment Algorithms and the Pharmacological Management of type 2 Diabetes Diabetes Spectrum, v.19, n.4, p.249-255, 2006.
15. CHRIST-ROBERTS, C.Y.; PRATIPANAWATR, T.; PRATIPANAWATR, W. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. Metabolism, v.53, n.9, p.1233–42, 2004.
16. CHU, Y.F.; CHEN, Y.; BLACK, R.M.; BROWN, P.H.; LYLE, B.J.; LIU, R.H.; OU, B. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF-κB inhibition, and stimulation of glucose uptake. Food Chemistry, v. 124, p.914-920, 2011.
17. CIOLAC, E.G.; GUIMARÃES, G.V. Importância do exercício resistido para o idoso. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, v.12, p.S15-26, 2002.
18. COHEN, N.D.; DUNSTAN, D.W.; ROBINSON, C.; VULIKH, E.; ZIMMET, P.Z.; SHAW, J.E. Improved endothelial function following a 14-month resistance exercise

training program in adults with type 2 diabetes. Diabetes Research Clinical Practice, v.79, n.3, p.405-11, 2008.

19. CONDE, S. V., SILVA, T.N.; GONZALEZ, C.; CARMO, M. M.; MONTEIRO, E.C.; GUARINO, M.P. Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. British Journal of Nutrition, v.107, p.86–95, 2012.
20. CREWS, H.M.; OLIVIERA, L.; WILSON, L.A. Urinary biomarkers for assessing dietary exposure to caffeine.Food Additives & Contaminants, v.18, p.1075-1087, 2001.
21. CUFF, D.J.; MENEILLY, G.S.; MARTIN, A.; IGNASZEWSKI, A.; TILDESLEY, H.D.; FROHLICH, J.J. Effective exercise modality to reduce insulin resistance in women with type 2 diabetes. Diabetes Care, v.26, n.11, p.2977–82, 2003.
22. DANIELS, J. W. MOLE, P.A. SHAFFRATH, J.D. STEBBINS, C.L. Effects of caffeine on blood pressure, heart rate, and forearm blood flow during dynamic leg exercise. Journal of Applied Physiology, v.85, p.154-159, 1998.
23. DAVIS, J. M.; ZHAO, Z.; STOCK, H.S.; MEHL, K.A.; BUGGY, J.; HAND, G.A. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 284, n. 2, p. 399-404, 2003.
24. DEFRONZO, R.A.; ABDUL-GHANI, M.A. Preservation of β-cell function: the key to diabetes prevention. Journal Clinical Endocrinology Metabology, v.96, n.8, p.2354-66, 2011.
25. DEFRONZO, RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Medical Clinics of North America, v.88, n.4, p.787-835, 2004.
26. DOBRZYNSKI, E.; MONTANARI, D.; AGATA, J.; ZHU, J.; CHAO, J.; CHAO, L. Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, v.283, p.1291–1298, 2002.

27. DONG, Q.; GINSBERG, H.N.; ERLANGER, B.F. Overexpression of the A1 adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance. Diabetes, Obesity and Metabolism, v.3, p.360–366, 2001.
28. DUNCAN, G.E.; PERRI, M.G.; THERIAQUE, D.W.; HUTSON, A.D.; ECKEL, R.H.; STACPOOLE, P.W. Exercise training, without weight loss, increases insulin sensitivity and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults. Diabetes Care, v.26, n.3, p.557-62, 2003.
29. DUNSTAN, D.W.; DALY, R.M.;OWEN, N. High-intensity resistance training improves glycemic control in older patients with type 2 diabetes. Diabetes Care, v.25, n.10, p.1729-36, 2002.
30. ELAYAT, A.A.; EL-NAGGAR, M.M.; TAHIR, M. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. Journal of Anatomy, v.186, p.629-637, 1995.
31. ERIKSSON, K.F.; LINDGÄRDE, F. Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise: the 6- year Malmo feasibility study. Diabetologia, v.34, p.891-8, 1991.
32. FEINBERG, L.J.; SANDBERG, H.; DE CASTRO, O.; BELLET, S. Effects of coffee ingestion on oral glucose tolerance curves in normal human subjects. Metabolism, v.17, n.916–922, 1968.
33. GALBO, H.; TOBIN, L.; VAN LOON, L.J. Responses to acute exercise in type 2 diabetes, with an emphasis on metabolism and interaction with oral hypoglycemic agents and food intake. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, v.32, p.567-575, 2007.
34. GALLAGHER, E.J.; LEROITH, D.; KARNIELI, E. The Metabolic Syndromedfrom Insulin Resistance to Obesity and Diabetes. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, v.37, p.559–579, 2008.
35. GAMBERUCCI, A. FULCERI, R. PRALONG, W. BAÈNHEGYI,G. MARCOLONGO, P. WATKINS, S.L. BENEDETTI, A. Caffeine releases a glucose-primed endoplasmic

reticulum Ca^{2+} pool in the insulin secreting cell line INS-1. Federation of European Biochemical Societies, v.446, p.309-312, 1999.

36. GARCIA-ROVES, P.M.; HAN, D.H.; SONG, Z.; JONES, T.E.; HUCKER, K.A.; HOLLOSZY, J.O. Prevention of glycogen supercompensation prolongs the increase in muscle GLUT4 after exercise. American Journal Physiology and Endocrinology Metabolism, v.285, n.4, p.E729–36, 2003.
37. GARETTO, L.P.; RICHTER, E.A.; GOODMAN, M.N.; RUDERMAN, N.B. Enhanced muscle glucose metabolism after exercise in the rat: the two phases. American Journal Physiology, v.246, p.E471–5, 1984.
38. GAYA, A.; GARLIPP, D.C.; SILVA, M.F; MOREIRA, R.B. Ciências do Movimento Humano: Introcução à Metodologia da Pesquisa. Artimed: Porto Alegre, 2008.
39. GEISLER, S.A. BAZOTTE, R.B. Investigation of the gluconeogenic capacity in livers from rats submitted to glibenclamide induced hypoglycemia. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v. 32, p. 232-236, 2009.
40. GILL, J.M.R.; ALMAMARI, A.; FERRELL, W.R.; CLELAND, S.J.; PERRY,C.G.; SATTAR, N.; PACKARD, C.J.; CASLAKE, M.J.; PETRIE, J.R. Effect of prior moderate exercise on postprandial metabolism in men with type 2 diabetes: Heterogeneity of responses. Atherosclerosis, v.194, p.134–143, 2007.
41. GIROIX, M.H.; PORTHA, B.; KERGOAT, M.; BAILBE, D.; PICON, L. Glucose insensitivity and amino-acid hypersensitivity of insulin release in rats with non-insulin-dependent diabetes: a study with the perfused pancreas. Diabetes, v.32, p.445-451, 1983.
42. GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.; SIBUYA, C.Y.; DE AZEVEDO, J.R.; DOS SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise.Comparative Physiology and Biochemistry, v.30, p.21-7, 2001.
43. GOLDSTEIN, E. R. JACOBS, P. L. WHITEHURST, M. PENHOLLOW, T. ANTONIO, J. Caffeine enhances upper body strength in resistance-trained women. Journal of the International Society of Sports Nutrition, v.7, n.18, 2010.

44. GOODPASTER, B.H.; KATSIARAS, A.; KELLEY, D.E. Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity. Diabetes, v.52, n.9, p.2191–7, 2003.
45. GRAHAM, T.E.; BATTRAM, D.S.; DELA, F.; EL-SOHEMY, A.; THONG, F.S. Does caffeine alter muscle carbohydrate and fat metabolism during exercise? Applied Physiology Nutrition and Metabolism, v.33, p.1311-88, 2008.
46. GRAHAM, T.E. Caffeine and Exercise, Metabolism, Endurance and Performance. Sports Medicine, v.31, n.11, p.785-807, 2001.
47. GRAHAM, T.E. The possible actions of methylxanthines on various tissues. Clinical Pharmacological Sports and Exercise, p.257-270, 1997.
48. GREENBERG, J.A. BOOZER, C.N. GELIEBTER, A. Coffee, diabetes, and weight control. Am J ClinNutr. v.84, p.682–93, 2006.
49. HABER, E.P.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.O.; CARPINELLI,A.R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v.45, n.3, p.219-227, 2001.
50. HACKMAN, R.M.; HAVEL, P.J.; SCHWARTZ, H.J.; RUTLEDGE, J.C.; WATNIK, M.R.; NOCETI, E.M.; STOHS, S.J.; STERN, J.S.; KEEN, C.L. Multinutrient supplement containing ephedra and caffeine causes weight loss and improves metabolic risk factors in obese women: a randomized controlled trial. International Journal of Obesity, v.30, p.1545–1556, 2006.
51. HANSEN, A.K.; CLAUSEN, T.; NIELSEN, O.B. Effects of lactic acid and catecholamines on contractility in fast-twitch muscles exposed to hyperkalemia. American Journal of Physiology - Cell Physiology,v.289, p.104-112, 2005.
52. HAWLEY, J.A.; LESSARD, S.J. Exercise training-induced improvements in insulin action. Acta Physiological (Ox), v.192, n.1, p.127-35, 2008.
53. HEYNE, A.; KIESSELBACH, C.; SAHÚN, I.; MCDONALD, J.; GAIFFI, M.; DIERSSEN, M.; WOLFFGRAMM, J. An animal model of compulsive food-taking behaviour. Addiction Biology,v.4, n.4, p.373-83, 2009.

54. HOWARTH, F.C.; AL-ALI, S.; AL-SHERYANI, S.; AL-DHAHERI, H.; AL-JUNAIBI, S.; ALMUGADDUM, F.A.; QURESHI, M.A.; LJUBISAVIJEVIC, M. Effects of voluntary exercise on heart function in streptozotocin (STZ) – induced diabetic rat. International Journal of Diabetes & Metabolism, v.15, p.32-37, 2007.

55. HOWLETT, K.F.; SAKAMOTO, K.; HIRSHMAN, M.F.; ASCHENBACH, W.G.; DOW, M.; WHITE, M.F.; GOODYEAR,L.J. Insulin Signaling After Exercise in Insulin Receptor Substrate-2–Deficient Mice. Diabetes, v.51, p.479-483, fev. 2002.

56. HU, F.B.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.; LIU, S.; SOLOMON, C.G.; WILLETT,W.C. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. The New England Journal of Medicine, v.345, n.11, p.790-797, 2001.

57. HUGHES, S.J. CHALK, J.G. ASHCROFT, S.J.H. The role of cytosolic free Ca^{2+} and protein kinase C in acetylcholine-induced insulin release in the clonal β-cell line, HIT-T15. Biochemical Journal, v.267, p.227-232, 1990.

58. HULSTON, C.J.; JEUKENDRUP, A.E. Substrate metabolism and exercise performance with caffeine and carbohydrate intake. Medicine Science in Sports & exercise, v.40, n.12, p.2096-2104, 2008.

59. HUXLEY, R.; LEE, C.M.Y.; BARZI, F.; TIMMERMEISTER, L.; CZERNICHOW, S.; PERKOVIC, V.; GROBBEE, D.E.; BATT, D.; WOODWARD, M. Coffee, Decaffeinated Coffee, and Tea Consumption in Relation to Incident Type 2 Diabetes Mellitus. Archives of Internal Medicine, v.169, n.22, p.2053-2063, 2009.

60. IBANEZ, J.; GOROSTIAGA, E.M.; ALONSO, A.M. Lower muscle strength gains in older men with type 2 diabetes after resistance training. Journal of Diabetes Complications, v.22, n.2, p.112–8, 2008.

61. IBGE. InstitutoBrasileiro de Geografia e Estatística. POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional, 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.com.br acesso em: 18 Novembro de 20012.

62. IRIGOYEN, M.C.; DE ANGELIS, K.; SCHAAN, B.D.; FIORINO, P.; MICHELINI, L.C. *Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos?* RSCESP, São Paulo, v.13, n.1, p.20-45, 2003.

63. ISLAM, S. RORSMAN, P. BERGGREN, P. Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release in insulin-secreting cells. Federation of European Biochemical Societies, v.296, n.3, p.287-291, 1992.

64. JOHNSTON, K.L.; CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. American Journal Clinical Nutrition, v.78, n.4, p.728-33, 2003.

65. JONES, C.W.; REYNOLDS, W.A.; HOGANSON, G.E. Streptozotocin Diabetes in the Monkey Plasma Levels of Glucose, Insulin, Glucagon, and Somatostatin, with Corresponding Morphometric Analysis of Islet Endocrine Cells. Diabetes, v. 29, p.536-546, 1980.

66. KANG, S.S. HAN, K. KU, B.M. LEE, Y.K. HONG, J. SHIN, H.Y. ALMONTE, A.G. WOO, D.H. BRAT, D.J. HWANG,E.M. YOO, S.H. CHUNG, C.K. PARK, S. PAEK, S.H. ROH, E.J. LEE, S. PARK, J. TRAYNELIS, S.F. LEE,C.J. Caffeine-Mediated Inhibition of Calcium Release Channel Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subtype 3 Blocks Glioblastoma Invasion and Extends Survival. American Association for Cancer Research, v.70, n.3, 2010.

67. KAPLAN, G.B.; GREENBLATT, D.J.; EHRENBERG, B.L. Dose-dependent pharmacokinetics and psychomotor effects of caffeine in humans.Journal of Clinical Pharmacology, v.37, p.693–703. 1997.

68. KELLEY, G.A.; KELLEY, K.S. Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins in adults with type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized-controlled trials. Public Health, v.121, n.9, p.643-55, 2007.

69. KIRSTEN, V.R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. Medicina (Ribeirão Preto), v.43, n.1, p.3-10, 2010.

70. KNOWLER, W.C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S.E.; HAMMAN, R.F.; LACHIN, J.M.; WALKER, E.A.; NATHAN, D.M. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. New England Journal Medicine, v.346, p.393-403, 2002.
71. KOKUBUN, E. Interações entre o metabolismo de glicose e ácidos graxos livres em músculos esqueléticos. Tese de doutorado em ciências Biomédicas. São Paulo: USP, 1990.
72. KRUL, C.; HAGEMAN, G. Analysis of urinary caffeine metabolites to assess biotransformation enzyme activities by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B BiomedicSciAppl 709:27-34, 1998.
73. KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. K. Robbins &Cotran - Patologia – Bases Patológicas das Doenças, Ed. Elsevier, 7ª ed, 2005, 1504 p.
74. LANE, J.D.; BARKAUSKAS, C.E.; SURWIT, R.S.; FEINGLOS, M.N. Caffeine impairs glucose metabolism in type 2 diabetes. Diabetes Care, v. 27, p.2047–2048, 2004.
75. LARSEN, J.J.; DELA, F.; MADSBAD, S.; VIBE-PETERSEN, J.; GALBO, H. Interaction of Sulfonylureas and Exercise on Glucose Homeostasis in Type 2 Diabetic Patients. Diabetes Care, v.22, n.10, p.1647-1654, 1999.
76. LATINI, R.; BONATI, M.; MARZI, E..; TACCONI, M.T.; SADURSKA, B.; BIZZI, A. Caffeine disposition and effects in Young and one-year-ols rats.Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.32, n.596-599, 1980.
77. LEBLANC, J.; RICHARD, D.; RACOTRAT, I.S. Metabolic and Hormone-Related Responses to Caffeine in Rats. Pharmacological Research, v. 32, n. 3, 1995.
78. LEE, S.; HUDSON, R.; KILPATRICK, K.; GRAHAM, T.E.; ROSS, R. Caffeine ingestion is associated with reductions in glucose uptake independent of obesity and type 2 diabetes before and after exercise training. Diabetes Care, v.28, n.3, p.566-72, 2005.
79. LINDINGER, M.I. Combating muscle fatigue: extracellular lactic acidosis and catecholamines. Journal of Physiology, v.581, n.2, p.419, 2007.

80. MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; GOODMAN, C.; TAYLOR, R.; GREEN, D. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice, v.56, p.115-23, 2002.
81. MATSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; YAMAUCHI, R.; OJIKA, M.; HIRAMITSU, M.; INOUE, T.; KATAGIRI, T.; MURAI, A.; HORIO, F. Coffee and caffeine improve insulin sensitivity and glucose. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v.75, n.12, p.2309-2315, 2011.
82. MCARDLE, W. D.; KATCH, F, I.; KATCH, V. L. Nutrição para o desporto e o exercício. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
83. MCCUSKER, R.R.; GOLDBERGER, B. A.; CONE, E.J. Caffeine content of specialty coffees. Journal of Analytical Toxicology, v.27, p.520-522, 2003.
84. MICHISHITA, R.; SHONO, N.; KASAHARA, T.; TSURUTA, T. Effects of low intensity exercise therapy on early phase insulin secretion in overweight subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. Diabetes Research And Clinical Practice, v.82, p.291–297, 2008.
85. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diabetes Mellitus.Caderno de Atenção Básica. Brasília, 2006, p.56.
86. MINUK, H.L.; VRANIC, M.; HANNA, A.K.; ALBISSER, A.M.; ZINMAN, B. Glucoregulatory and metabolic response to exercise in obese noninsulin- dependent diabetes. American Journal Physiology, v.240, p.E458–64, 1981.
87. MONTI, P.; HENINGER, A.K.; BONIFACIO, E. Differentiation, expansion, and homeostasis of autoreactive T cells in type 1 diabetes mellitus. Current Diabetes Reports, v.9, p.113–8, 2009.
88. MOUGIOS, V.; RING, S.; PETRIDOU, A.; NIKOLAIDIS, M.G. Duration of coffee- and exercise-induced changes in the fatty acid profile of human serum. Journal Applied Physiology, v.94, p.476-484, 2003.

89. MURRAY, R.D.; CHURCHILL, P.C. Concentration dependency of the renal vascular and renin secretory responses to adenosine receptor agonists. J PharmacolExpTher, v.232, p.189-93, 1985.

90. MURUSSI, M.; COESTER, A.; GROSS, J. L.; SILVEIRO, S.P. Nefropatia diabética no diabete melito tipo 2: fatores de risco e prevenção. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v.47, n.3, 2003.

91. NABHOLZ, T.V. Nutrição esportiva: aspectos relacionados à suplementação nutricional. São Paulo: Sarvier, 2007, p. 409.

92. NEHLIG, A.; DAVAL, J.L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. Brain Research Reviews, v.17, p.139-170, 1992.

93. NEHLIG, A.; DAVAL, J.L.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. Brain Res Brain Res Rev, v.17, n.2, p.139-70, 1992.

94. NIEMAN, D.C. Exercício e Saúde. São Paulo: Manole, 2011, p. 600.

95. NOORDZIJ, M.; UITERWAAL, C.S.P.M.; ARENDS, L.R.; KOK, F.J.; GROBBEE, D.E.; GELEIJNS, J.M. Blood pressure response to chronic intake of coffee and caffeine: a meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Hypertension, v.23, n.5, 2005.

96. NOLAN, C.J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. Lancet, v.378, p.169‑81, 2011.

97. NURMINEN M.L.; NIITTYNEN, L.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. European Journal of Clinical Nutrition, v.53, n.11, p.831-839, 1999.

98. O'GORMAN, D.J.; KARLSSON, H.K.; MCQUAID, S. Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. Diabetologia, v.49, n.12, p.2983–92, 2006.

99. PALUSKA, SA. Caffeine and exercise. Current Sports Medicine Report, v.2, p.213-9, 2003.

100. PARK, S.; SCHEFFLER, T.L.; GUNAWAN, A.M.; SHI, H.; ZENG, C.; HANNON, K.M.; GRANT, A.L.; GERRARD, D.E. Chronic elevated calcium blocks AMPK-induced GLUT-4 expression in skeletal muscle. American Journal Physiology - Cell Physiology, v.296, p.106-115, 2009.

101. PARK, S.; JANG, J.S.; HONG, S.M. Long-term consumption of caffeine improves glucose homeostasis by enhancing insulinotropic action through islet insulin/insulin-like growth factor 1 signaling in diabetic rats. Metabolism Clinnical Experimental,v.56, p.599-607, 2007.

102. PASSOS, A. P.; DULLIUS, J.; PORTO, L. G.; LOFRANO, A. Diabetes mellitus tipo 2 e exercício físico aeróbico. Diabetes Clínica, n.5, p.375-80, 2002.

103. PAULI, J.R. Obesidade e Diabetes: Bases Moleculares da Etinopatogenia. In: CYINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular. Savier: São Paulo, 2011.

104. PERSGHIN G; PRICE T.B; PETERSEN K.F; RODEN M; CLINE G.W; GEROW K; et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *N Engl J Med* 1996;335:1357-62.

105. PERSGHIN, G.; PRICE, T.B.; PETERSEN, K.F.; RODEN, M.; CLINE, G.W.; GEROW, K. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. N Engl J Med, v.335, p.1357-62, 1996.

106. PETRIE, H.J.; CHOWN, S.E.; BELFIE, L.M.; DUNCAN, A.M.; MCLAREN, D.H.; CONQUER, J.A.; GRAHAM, T.E. Caffeine ingestion increases the insulin response to an oral-glucose-tolerance test in obese men before and after weight loss. Am J ClinNutr, v.80, p.22–28, 2004.

107. PIMENTEL, G.D.; ZEMDEGS, J.C.S.; THEODORO J.A.; MOTA J.F. Does long-term coffee intake reduce type 2 diabetes mellitus risk? Diabetology& Metabolic Syndrome, v.1, n.6, 2009.

108. PLOCKINGER, U. TOPUZ, M. RIESE, B. REUTER, T. Risk of exercise-induced hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes on intensive insulin therapy: Comparison of insulin glargine with NPH insulin as basal insulin supplement. Diabetes Research And Clinical Practice, v.81, p.290–295, 2008.

109. PORTHA, B.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Chemical diabetes in the adult rats as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. Diabetologia, v.17, p.371-377, 1979.

110. PRADA, P.O.; SAAD, J.M.A. Bases Moleculares da Sinalização da Insulina. In: CYINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular. Savier: São Paulo, 2011.

111. QUESADA, I. TODOROVA, M.G. ALONSO-MAGDALENA, P. BELTRA, M. CARNEIRO, E.M. MARTIN, F. NADAL, A. SORIA, B. Glucose Induces Opposite Intracellular Ca^{2+} Concentration Oscillatory Patterns in Identified α- and β-Cells Within Intact Human Islets of Langerhans. Diabetes, v.55, 2006.

112. RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 904.

113. RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M. CaffeineandAdenosine. J Alzheimer Dis. v.20, p.S3–S15, 2010.

114. ROBINSON, L.E.; SAVANI, S.; BATTRAM, D.S.; MCLAREN, D.H.; SATHASIVAM, P.; GRAHAM, T.E. Caffeine Ingestion Before an Oral Glucose Tolerance Test Impairs Blood Glucose Management in Men with Type 2 Diabetes. J Nutr, v.134, p.2528-2533, 2004.

115. ROPELLE, E.R. Efeitos do Exercício Físico na Obesidade e Diabetes. In: CYINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular. Savier: São Paulo, 2011.

116. RUFFO, A.M.; OSIECKI, R.; FERNANDES, L.C.; FELIPE, C.S.; OSIECKI, A.C.; MALFATTI, C.R.M. Moderate to high dose of maltodextrin before exercise improves glycogen availability in soleus and liver after prolonged swimming in rats. JournalofExercisePhysiology online, v.12, n.4, p.30–38, 2009.

117. SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: O papel da transição nutricional. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.19 (Sup. 1), p.29-36, 2003.

118. SAWYNOK, J.; YAKSH, T.L. Caffeine as an analgesic adjuvant: a review of pharmacology and mechanisms of action. Pharmacol Rev, v.45, p.43-85, 1993.

119. SAYAMA K, LIN S, ZHENG G AND OGUNI I. Effects of green tea on growth, food utilization and lipid metabolism in mice. In Vivo, v.14, p.481-484, 2000.

120. SCHEFFEL, R.S.; BORTOLANZA, D.; WEBER, C.S.; COSTA, L.B.; CANANI, L.H.; SANTOS, K.G. CRISPIM, D.; ROISENBERG, I.; LISBÔA, H.R.K.; TRES, G.S.; TSCHIEDEL, B.; GROSS, J.L. Revalência De Complicações Micro E Macrovasculares E De Seus Fatores De Risco Em Pacientes Com Diabetes Melito Do Tipo 2 Em Atendimento Ambulatorial.Revista da Associação Médica Brasileira, v.50, n.3, p.263-7, 2004.

121. SCHNEDL, W.J.; FERBER, S.; JOHNSON, J.H. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes, v.43, p.1326-33, 1994.

122. SHARMA, V.K. Streptozotocin: An Experimental Tool In Diabetes And Alzheimer's Disease. International Journal of Pharma Research and Development – Online. v.2, n.1, 2010.

123. SIGAL, R.J.; KENNY, G.P.; WASSERMAN, D.H.; CASTANEDA-SCEPPA, C. Physical activity/exercise and type 2 diabetes. Diabetes Care, v.27,n.10, p.2518–39, 2004.

124. SILVEIRA, L.R.; ALVES, A.A.; DENADAI, B.S. Efeito da lipólise induzida pela cafeína na performance e no metabolismo de glicose durante o exercício intermitente. Revista Brasileira de Ciência e Movimento, v.12, n.3, p.21-26, 2004.

125. SNOWLING, N.J.; HOPKINS, W.G. Effects of different modes of exercise training on glucose control and risk factors for complications in type 2 diabetic patients: a meta-analysis. Diabetes Care, v.29, n.11, p.2518–27, 2006.

126. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diagnóstico e tratamento do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2: Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2008.

127. SUH, S.H.; PAIK, I.Y.; JACOBS, K. Regulation of blood glucose homeostasis during prolonged exercise. Molecules and Cells, v.23, n.3, p.272–9, 2003.

128. SULLIVAN, P.W.; GHUSHCHYAN, V.; BEN-JOSEPH, R.H. The effect of obesity and cardiometabolic risk factors on expenditures and productivity in the United States. Obesity (Silver Spring), v.16, n.9, p.2155-2162, 2008.

129. SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiological Research, v.50, p.537-546, 2001.

130. SZKUDELSKI, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. Experimental Biology and Medicine, v.237, p.481-490, 2012.

131. TAKADA, J.; MACHADO, M.A.; PERES, S.B.; BRITO, L.C.; BORGES-SILVA, C.N.; COSTA, C.E.M.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ANDREOTTI, S.; LIMA, F.B. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. Metabolism Clinical and Experimental, v.56, 977–984, 2007.

132. TAVARES, C.; SAKATA, C.K. Cafeína para o tratamento de dor.Revista Brasileira de Anestesiologia, v.62, n.3, p.394-401, 2012

133. THONG, F.S.L.; GRAHAM, T.E. Caffeine-induced impairment of glucose tolerance is abolished by beta-adrenergic receptor blockade in humans.Journal of Applied Physiology, v.92, p.2347-2352, 2002.

134. TUOMILEHTO, J.; LINDSTROM, J.; ERIKSSON, J.G.; VALLE, T.T.; HAMALAINEN, H.; ILANNE-PARIKKA, P. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in

lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. New England Journal Medicine, v.344, p.1343-1350, 2001.

135. VAN BAAK, M.A.; SARIS, W.H.M. The effect of caffeine on endurance performance after nonselective beta-adrenergic blockade. Medicine Science Sports and Exercise,v.32, p.499–503, 2000.
136. VANZYL, B.; GILLESPIE, K.M. Microchimerism in type 1 diabetes. Current Diabetes Reports, v.9, p.125–9, 2009.
137. VERGAUWEN, L.; RICHTER, E.; HESPEL, P. Adenosine exerts a glycogen sparing action in contracting rat skeletal muscle. American Journal Physiology and Endocrinology Metabolism, v.272, p.762–768, 1997.
138. VOSS, A.C.; MAKI, K.C.; GARVEY, T.; HUSTEAD, D.S.; ALISH, C.; FIX, B.; MUSTAD, V.A. Effect of two carbohydrate-modified tube-feeding formulas on metabolic responses in patients with type 2 diabetes. Nutrition, v.24, p. 990-997, 2008.
139. WACHHOLTZ, R.K. ; MALFATTI, C.R.M.; BURGOS, M.S.; JURUENA, G. S.; PEREIRA, M.H.S. Percentual de consumo decarboidratos e lipídeos durante exercício progressivo em paciente diabético tipo II. The FIEP Bulletin, v. 79, p. 611-614, 2009.
140. WAHREN, J.; EKBERG, K. Splanchnic regulation of glucose production.Annual Review of Nutrition, v.27, p.329–45, 2003.
141. WANG, Y.; SIMAR, D.; FIATARONE, S.M.A. Adaptations to exercise training within skeletal muscle in adults with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance: a systematic review.Diabetes/Metabolism Research and Reviews, v.25, n.1, p.13–40, 2009.
142. WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance.The Clinical Biochemist Reviews, v.26, p.19-39, 2005.
143. WILLETT, W.; MANSON, J.; LIU, S. Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes. American Journal Clinical Nutritrion, v.76, p.274S-80S, 2002.

144. WILLEY, K.A.; SINGH, M.A. Battling insulin resistance in elderly obese people with type 2 diabetes: bring on the heavy weights. Diabetes Care, v.26, n.5, p.1580–8, 2003.

145. WILMORE, J. L.; COSTILL, D. L. Fisiologia do esporte e do exercício. 2 ed. São Paulo: Manole, 2001.

146. WINNICK, J.J.; SHERMAN, W.M.; HABASH, D.L. Short-term aerobic exercise training in obese humans with type 2 diabetes mellitus improves whole-body insulin sensitivity through gains in peripheral, not hepatic insulin sensitivity. Journal Clinical Endocrinology and Metabolism, v.93, n.3, p.771-8, 2008.

147. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Definition, diagnosis and classification of diabete mellitus and its complications. Report of a WHO consualation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1999.

148. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diabetes. Nota descritiva, n.312, Nov. 2011.

149. YADA, T. HAMAKAWA, N. YAEKURA, K. Two distinct modes of Ca^{2+}signalling by ACh in rat pancreatic β-cells: concentration, glucose dependence and Ca^{2+} origin. Journal of Physiology, v. 488, n.1, p. 13-24, 1995.

150. YAMAUCHI, R.; MATSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; OJIKA, M.; HIRAMITSU, M.; INOUE, T.; KATAGIRI, T. Coffee and caffeine ameliorate hyperglycemia, fatty liver, and inflammatory adipocytokine expression in spontaneously diabetic KK-Ay mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.58, n.9, p.5597-5603, 2010.

151. YASUDA, N.; INOUE, T.; HORIZOE, T.; NAGATA, K.; MINAMI, H.; KAWATA, T.; HOSHINO, Y.; HARADA, H.; YOSHIKAWA, S.; ASANO, O.; NAGAOKA, J.; MURAKAMI, M.; ABE, S.; KOBAYASHI, S.; TANAKA, I. Functional characterization of the adenosine receptor contributing to glycogenolysis and gluconeogenesis in rat hepatocytes. Eur J Pharmacol, v.459, p.159-166, 2003.

152. YUN, S.Y.; KIM, S.P.; SONG, D.K. Effects of (−)-epigallocatechin-3-gallate on pancreatic beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. European Journal of Pharmacology, v.541, p.115–121, 2006.

153. ZECCHIN, H.G. Transmissão do sinal de insulina e acetilcolina na aorta de modelos animais de resistência à insulina. 2007. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Medica)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

154. ZHENG G.; SAYAMA, K.; OKUBO, T.; JUNEJA, L.R.; OGUNI, I. Anti-obesity Effects of Three Major Components of Green Tea, Catechins, Caffeine and Theanine, in Mice. In Vivo*18*: 55-62, 2004.

8. ANEXOS

Universidade Estadual do Centro-Oeste

UNICENTRO

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 004/2012 - CEUA/UNICENTRO Guarapuava, 23 de abril de 2012

Senhor Professor,

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Efeito da cafeína e do exercício físico sobre as respostas hormonais e metabólicas em ratos diabéticos", parecer 026/2011 foi analisado e considerado **aprovado** pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária no dia 02 de março de 2012.

2. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.

3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:

– Os ***Relatórios Parciais*** deverão ser encaminhados ao CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.

– Os ***Relatórios Finais*** deverão ser encaminhados ao CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa.**

– **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, número de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do CEUA.

Pesquisador: Carlos Ricardo Maneck Malfatti

Atenciosamente,

Prof. Rosilene Rebeca
Presidente do CEUA/UNICENTRO
Port. 1.403/2011 - GR/UNICENTRO

Ao Senhor
Prof. Carlos Ricardo Maneck Malfatti
DEDUF/IRATI - Departamento de Educação Física
SEAA – Setor de Ciências Agrárias e Ambientais
UNICENTRO