

MÁRCIA FERREIRA DA SILVA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS PROPRIEDADES
MORFOLÓGICAS E MECÂNICAS DE MIÓCITOS CARDÍACOS DE RATOS
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

MÁRCIA FERREIRA DA SILVA

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS PROPRIEDADES
MORFOLÓGICAS E MECÂNICAS DE MIÓCITOS CARDÍACOS DE RATOS
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de abril de 2010.

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Paulo Roberto dos Santos Amorim
(Co-orientador)

Prof. Dr. Nilo Resende Viana Lima

Prof. Dr. Ricardo Junqueira Del Carlo

Prof. Dr. Antônio José Natali
(Orientador)

A Deus pela permissão

A meus pais pelo exemplo de vida

A meus irmãos pelo apoio constante

A meus sobrinhos pelo carinho e doçura

*(Eu quase que nada não sei,
mas desconfio de muita coisa.)*

(Guimarães Rosa)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela presença viva em minha vida, tornando possível a realização dos meus sonhos.

Ao meu pai Vicente pelo amor, confiança e amizade sempre me fazendo acreditar que sonhos são realizáveis.

À minha mãe Terezinha pelo amor, pela serenidade e presença constante me ensinando a analisar e refletir cada passo nesse longo caminho.

Aos meus irmãos Marcos, Marylane, Guilherme e Patrícia, pela amizade, amor e incentivo, nosso amor nos unirá para sempre.

Aos meus sobrinhos Túlio, Miguel, Maria Tereza e Luíz Guilherme pelo amor, carinho e cuidado “Tia Márcia você já tratou dos ratinhos?”.

Aos meus avós Tereza, Maria, Antônio e José pelo exemplo de vida e perseverança.

Ao meu orientador Antônio José Natali, minha eterna gratidão por me amparar quando não mais acreditava que esse sonho fosse realmente se realizar, muito obrigado.

À professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio pela co-orientação e sorriso com o qual sempre me recebeu em seu gabinete.

Ao Professor Nilo por me receber no LAFISE e pela atenção com que aceitou meu convite.

Ao professor Paulo Roberto dos Santos Amorim, meu co-orientador, pela atenção e pelos ensinamentos no estágio de ensino.

Ao Professor Ricardo Junqueira Del Carlo pela aceitação do convite.

Ao meu eterno amigo Rafael Andrade por confiar e acreditar em mim sempre.

Aos meus amigos Bárbara, e Bruno pela amizade desde o início dessa caminhada.

À minha amiga Ivani pelo incentivo e apoio constante.

À Minha grande amiga Arlete pela confiança e apoio incondicional (Deus é mais).

Ao amigo Bozi pela amizade e parceria desde o início do experimento.

À minha amiga e companheira de trabalho Natália pela dedicação e confiança.

Aos amigos Miguel e Juliana pela confiança e apoio nessa caminhada.

Ao companheiro Rômulo pelas “idéias” e amizade.

À minha amiga Kely pelo companheirismo.

À Ana Flora pelos ensinamentos e amizade.

Às companheiras de república pelos momentos de descontração.

Aos companheiros Lucas, Vitor, Cynthia, Judson, Aurora, Pedro, Ângela, Regiane, Felipe Rios, Mayra, Felipe Belfort, Karina, Luciano pela amizade e momentos de trabalho e descontração.

Aos funcionários do departamento de Educação Física: Rita, Priscila, Geraldo, José Francisco, Maysa, Rômulo e Milton, obrigada pela disponibilidade e atenção.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. O MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA.....	4.
3.2. ALTERAÇÕES NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE MIÓCITOS CARDÍACOS EM CORAÇÕES DE RATOS DIABÉTICOS.....	5
3.3. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE MIÓCITOS CARDÍACOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	8
3.4. EFEITOS DO DIABETES NA FUNÇÃO CARDÍACA E NA HOMEOSTASE DE Ca^{2+}	9
3.5. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA FUNÇÃO CARDÍACA E HOMEOSTASE DE CÁLCIO EM DIABÉTICOS.....	15
3.6. EFEITOS DO DIABETES NA MORFOLOGIA DO CORAÇÃO.....	19
3.7. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA MORFOLOGIA DO CORAÇÃO.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E TRATAMENTOS.....	25
4.2. INDUÇÃO DE DIABETES.....	26
4.3. PROGRAMA DE TREINAMENTO.....	26
4.4. MASSA DO CORAÇÃO E DOS VENTRÍCULOS.....	27

4.5. ISOLAMENTO DOS MIÓCITOS CARDÍACOS.....	27
4.6. COMPRIMENTO, LARGURA E VOLUME CELULAR.....	28
4.7. CONTRAÇÃO CELULAR.....	30
4.8. SOLUÇÕES.....	32
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS.....	34
5.1.1. GLICEMIA.....	34
5.1.2. MASSA CORPORAL.....	37
5.1.3. MASSA VENTRICULAR.....	40
5.2. PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS DOS CARDIOMIÓCITOS	42
5.3. PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS CARDIOMIÓCITOS.....	45
5.3.1. AMPLITUDE DE CONTRAÇÃO.....	46
5.3.2. TEMPO DE CONTRAÇÃO CELULAR.....	49
5.3.2.1. TEMPO PARA O PICO DE CONTRAÇÃO.....	49
5.3.2.2. VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO.....	50
5.3.3. TEMPO PARA O RELAXAMENTO CELULAR.....	54
5.3.3.1. TEMPO PARA 50% DO RELAXAMENTO.....	54
5.3.3.2. VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPC – Adenosina monofosfato cíclica
- AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
- ANOVA – Análise de variância
- ATP – Adenosina trifosfato
- ATPASE – Enzimas que catalisam a hidrólise do ATP
- °C – Graus Celsius
- Ca²⁺ – Íon cálcio
- % c.c.r– percentual do comprimento celular de repouso
- CEA – Coeficiente de eficiência alimentar
- CaCl₂ – Cloreto de cálcio
- CaMKII – Cálcio calmodulina quinase II
- Cl-Íon cloreto
- cm – Centímetro
- CN – controle não diabético
- CNE – controle não diabético exercitado
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- CO₂ – Dióxido de carbono
- DS– diabético sedentário
- DE – diabético exercitado
- DM – Diabetes mellitus
- DP – Desvio padrão
- EPM – Erro padrão da média
- EGTA – *Ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid*
- FCR – Frequência cardíaca de repouso
- GLUT 4 – Transportador de glicose 4
- GH- Hormônio do crescimento
- g/L – Gramas por litro
- GSK-3 – Glicogênio Sintase quinase 3
- HCO₃ – Íon bicarbonato
- HEPES – *N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid*
- Hz – Hertz
- I_{ca} – corrente de Ca²⁺

K^+ – Íon potássio
KCl – Cloreto de potássio
L – Litro
m – Metro
 μm – Micrômetro
min – Minuto
mmHg – Milímetro de mercúrio
 μM – Micromolar
mg – Miligrama
mL – Mililitro
ms – Milisegundo
seg – Segundo
mM – Milimolar
 $MgCl_2$ – Cloreto de magnésio
M – Molar
 μL – Microlitro
 Mg^{2+} – Íon magnésio
mm – Milímetro
NCX – trocador de sódio-cálcio
NaCl – Cloreto de sódio
 Na^+ – Íon sódio
 O_2 – Oxigênio
pH – Potencial hidrogeniônico
PKA– Proteína quinase dependente de AMPc
PKB– Proteína quinase B
pL – Picolitro
PLB– Fosfolambam
PN– Programa de natação
rpm – Rotações por minuto
RS- Retículo sarcoplasmático
RyR2 – Canais receptores de rianodina
SERCA2 – Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
 SO_4 – Íon sulfato
STZ- Estreptozotocina

u/L – Unidades por litro

VO_{2máx} – Consumo máximo de oxigênio

vs – Versus

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação dos pontos de mensuração da imagem dos miócitos cardíacos.....29
- Figura 2. Câmara experimental acoplada a microscópio invertido..... 30
- Figura 3. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos miócitos cardíacos..... 31
- Figura 4. Registro experimental de encurtamento de uma célula do ventrículo esquerdo estimulada na frequência de 1 Hz.....31
- Figura 5. Diagrama demonstrativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz.....32
- Figura 6. Glicemia de jejum dos animais dos grupos experimentais ao longo de 18 semanas de experimento.....36
- Figura 7. Peso corporal dos animais dos grupos experimentais ao longo de 18 semanas de experimento.....37
- Figura 8. Amplitude de contração de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1 e 3 Hz.....47
- Figura 9. Tempo para o pico de contração de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1 e 3 Hz.....50
- Figura 10. Velocidade máxima de contração de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1 e 3 Hz.....51
- Figura 11. Tempo para 50% do relaxamento de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1 e 3 Hz.....55
- Figura 12. Velocidade máxima de relaxamento de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1 e 3 Hz.....56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Glicemia de jejum (mg/dl) dos grupos experimentais..... 36
- Tabela 2. Massa corporal e comprimento da tíbia dos animais nos grupos experimentais.....38
- Tabela 3. Consumo de ração, ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) durante 8 semanas de experimento.....39
- Tabela 4. Peso corporal, peso dos ventrículos e peso relativo dos ventrículos no final do período experimental.....41
- Tabela 5. Comprimento, largura, volume e relação comprimento/largura de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos grupos experimentais..... 43

RESUMO

SILVA, Márcia Ferreira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2010. **Efeitos do exercício físico sobre as propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos cardíacos de ratos diabéticos.** Orientador: Antônio José Natali. Co-orientadores: Maria do Carmo Gouveia Peluzio e Paulo Roberto dos Santos Amorim.

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos de um programa de natação (PN) sobre as propriedades mecânicas e morfológicas de miócitos cardíacos das regiões do subepicárdico (EPI) e endocárdio (ENDO) do ventrículo esquerdo (VE) de ratos com diabetes experimental. Ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar com trinta dias de idade (massa corporal 250g) foram submetidos à injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 60mg/kg de massa corporal) diluída em 1mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5) ou a mesma dose de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5). Aqueles com glicemia acima de 300 mg/dL foram distribuídos aleatoriamente em diabéticos sedentários (DS, n=20) e diabéticos exercitados (DE, n=20). Os animais que não receberam STZ foram separados em controle não diabéticos (CN, n=10) e controle não diabéticos exercitados (CNE, n=10). Após 45 dias de hiperglicemia os animais DE e os CNE foram submetidos a um PN (5 dias/semana, 90 min/dia), por 8 semanas. Após eutanásia, o coração foi removido e os miócitos das regiões do sub-epicárdio (EPI) e sub-endocárdio (ENDO) do VE foram isolados e estimulados eletricamente a 1 e 3 Hz em temperatura ambiente (~25°C). O diabetes experimental reduziu o peso corporal, o peso relativo dos ventrículos e o comprimento da tibia. O PN não alterou o peso corporal e a glicemia nos animais dos grupos experimentais, mas aumentou o peso relativo dos ventrículos tanto nos animais diabéticos quanto nos controles não diabéticos. Não houve diferenças regionais (EPI vs ENDO) significativas nas propriedades morfológicas e mecânicas em resposta ao diabetes e ao PN. O diabetes experimental reduziu o comprimento, a largura e o volume dos cardiomiócitos. O PN aumentou a largura e o volume dos cardiomiócitos, sem alterar seu comprimento, nos animais diabéticos apenas. A amplitude de contração celular foi reduzida pelo diabetes, mas o PN aumentou essa amplitude tanto nos animais diabéticos quanto nos não diabéticos. O diabetes prolongou o tempo de contração celular, entretanto, o PN reduziu esse tempo em animais diabéticos e não diabéticos. O diabetes prolongou o tempo de relaxamento celular, todavia, o PN reduziu este tempo nos animais diabéticos e nos não diabéticos. Concluiu-se que o PN alterou as propriedades morfológicas dos miócitos do VE de ratos com diabetes experimental e atenuou as disfunções mecânicas destes cardiomiócitos, sem distinção regional.

ABSTRACT

SILVA, Márcia Ferreira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2010. **Effects of exercise on the morphological and mechanical properties of cardiac myocytes from diabetic rats.** Adviser: Antônio José Natali. Co-advisers: Maria do Carmo Gouveia Peluzio and Paulo Roberto dos Santos Amorim.

The aim of this study was to verify the effects of a swimming training (ST) on the morphological and mechanical properties of cardiac myocytes from different regions of the left ventricle (LV) of rats with experimental diabetes. One month old male Wistar rats (body mass ~ 250g) received an intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ, 60mg/kg body mass) diluted in 1 mL sodium citrate buffer (0, 1 M, pH 4.5) or the same dose of sodium citrate buffer (0, 1 M, pH 4.5). Those rats with blood glucose levels above 300 mg/dL were randomly divided into diabetic sedentary (DS, n=20) and diabetics exercised (DE, n=20). Age and body mass-matched animals served as control non diabetic (CN, n=10) and control non diabetic exercised (CNE, n=10). Animals from DE and CNE groups were submitted to a swimming program (SP) (5 days/week, 90 min/day), for 8 weeks. At sacrifice the heart was removed and myocytes from sub-epicardium (EPI) and sub-endocardium (ENDO) regions of the LV were isolated and stimulated at 1 and 3 Hz, at room temperature (~25°C). Experimental diabetes reduced animals' body mass, relative LV mass and tibia length. The SP did not affect body mass and blood glucose levels, but increased the relative LV mass of diabetic and non diabetic animals. No regional differences (EPI vs ENDO) between morphological and mechanical properties were found in response to either diabetes or SP. However, diabetes reduced cell length, width, volume and amplitude of contraction, and prolonged the time course of cell contraction and relaxation. The SP increased cell width and volume of cardiac myocytes of diabetic rats without changing cell length. In addition increased the amplitude of contraction and reduced the time course of cell contraction and relaxation. It was concluded that the SP affected the morphological properties of LV myocytes from rats with experimental diabetes and attenuated the mechanical dysfunctions of these cells with no regional distinction.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio do metabolismo de carboidratos que apresenta, entre outras manifestações, a hiperglicemia contínua ou intermitente. O DM tipo 1 tem como causa primária a destruição auto-imune das células beta pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, ao passo que a causa do DM tipo 1I é a resistência das células alvo à insulina (Fang et al., 2004; Aires, 2008; Howarth et al., 2008).

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas em resposta a alterações nos níveis plasmáticos de nutrientes, em especial a glicose (Ferraninni et al. 1999). Em condições normais, ao ser secretada a insulina se liga a receptores inseridos na membrana das células insulino-dependentes. As principais funções deste hormônio são: transporte de glicose, recrutamento do transportador GLUT-4 do “pool” citoplasmático, estimula tomada de aas, K^+ , PO_4^{-2} , Mg^{+} deposição de substrato, inibição de proteólise/lipólise (Raw, 2006).

Na ausência de insulina, a hiperglicemia crônica advinda do diabetes mellitus, causa alterações funcionais, estruturais e metabólicas em diferentes órgãos. No miocárdio, o DM promove o desenvolvimento de complicações que resultam na cardiomiopatia diabética que gera distúrbios no ritmo e na contratilidade do miocárdio que, em associação a outras alterações, prejudicam o desempenho cardíaco. Por exemplo, ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ) apresentam redução na frequência cardíaca, na variabilidade da frequência cardíaca e exibem contrações espontâneas no átrio direito (Fang et al., 2004).

Em situações fisiológicas normais, os miócitos cardíacos podem utilizar diferentes substratos metabólicos para a obtenção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), incluindo ácidos graxos livres, glicose e, em menor extensão, lactato. Em condições não isquêmicas, aproximadamente 95% do ATP vem da fosforilação oxidativa ocorrida na mitocôndria e o restante é derivado da glicólise e formação de guanosina trifosfato no ciclo do ácido cítrico (Stanley et al., 1997; Stanley et al., 2005 Saunders et., al 2008). A oxidação reduzida de glicose e outros substratos podem diminuir a quantidade de ATP disponível para a contração celular, comprometendo a capacidade de trabalho cardíaco.

Distúrbios na homeostasia de glicose podem afetar a expressão e função das proteínas contráteis no músculo cardíaco, alterando a contratilidade do miocárdio. Isto resulta em alteração da função sistólica e diastólica, principalmente pela diminuição da complacência do músculo cardíaco (Das, 1995; Saunders et al., 2008). Ocorre também o comprometimento da função dos receptores de rianodina e, conseqüentemente, a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Shao et al., 2009).

O exercício físico, por sua vez, tem sido recomendado como tratamento não farmacológico no controle do DM minimizando as alterações estruturais e funcionais nos órgãos afetados pela doença. Os benefícios da atividade física regular na função cardíaca de diabéticos incluem aumento na oxidação de glicose, no volume de ejeção, no débito cardíaco e redução da pressão arterial e da viscosidade sanguínea, além de melhora na sensibilidade dos baroreflexos, na variabilidade da frequência cardíaca, na extensibilidade e desempenho do miocárdio, dentre outros (Albright et al; 2000; Loganathan et al; 2007).

Embora existam evidências que o exercício físico regular causa adaptações importantes no desempenho cardíaco em corações normais e patológicos, adaptações demonstradas em nível celular (Kemi et al., 2008, Kemi & Wisloff, 2010), seus efeitos sobre as propriedades mecânicas (contração e relaxamento) e morfológicas (dimensões) de miócitos cardíacos de ratos diabéticos não são completamente conhecidos. Recentemente, alguns estudos foram realizados buscando esclarecer os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelos potenciais efeitos benéficos do exercício físico regular sobre a função cardíaca em modelos experimentais de diabetes (Howarth et al., 2008; Bidasee et al., 2008; Shao et al., 2009; Howarth et al., 2009).

Tanto na hipertrofia patológica (Gerdes & Capasso, 1995; McCrossan et al., 2004) quanto na hipertrofia fisiológica (Natali et al., 2001, 2002), o processo hipertrófico dos miócitos ventriculares varia de acordo com a região do miocárdio onde estes estão localizados. A hipertrofia é maior nos miócitos localizados próximo ao endocárdio (ENDO) em relação aos localizados próximo ao epicárdio (EPI), provavelmente para preservar o gradiente de tensão sobre a parede ventricular que decresce do endocárdio para o epicárdio (Yin, 1984). Os efeitos regionais do exercício físico regular sobre as dimensões das células ventriculares de ratos diabéticos não são conhecidos.

Considerando que a mecânica de contração de miócitos cardíacos em ratos com hipertrofia patológica difere dependendo da região onde está localizado (McCrossan et al., 2004) e que o exercício físico regular pode afetar a força de contração dos miócitos de forma distinta através da parede ventricular (Natali et al., 2002; Diffie & Nagle, 2003), especula-se que os efeitos do exercício físico regular sobre o ciclo contração-relaxamento de miócitos cardíacos sejam regionalmente distintos em animais diabéticos.

Assim, o presente estudo foi desenvolvido para investigar os efeitos do exercício físico regular nas propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos isolados de diferentes regiões do ventrículo esquerdo de ratos com diabetes experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos de um programa de natação sobre as propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos cardíacos isolados de diferentes regiões do ventrículo esquerdo de ratos com diabetes experimental.

2.2. Objetivos Específicos

Verificar se um programa de natação altera, em miócitos cardíacos isolados de diferentes regiões do ventrículo esquerdo de ratos com diabetes experimental, os seguintes parâmetros morfológicos e mecânicos:

- a) Comprimento, largura e volume celular;
- b) Amplitude de contração, tempo de contração e tempo de relaxamento celular;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio do metabolismo de carboidratos que apresenta, entre outras manifestações, a hiperglicemia contínua ou intermitente. A hiperglicemia crônica advinda dessa patologia causa alterações funcionais, estruturais e metabólicas em diferentes órgãos. No miocárdio, o diabetes promove o desenvolvimento de complicações que resultam em cardiomiopatia. A cardiomiopatia diabética implica em alterações morfológicas e gera distúrbios no ritmo e na contratilidade do miocárdio que, em associação a outras alterações, prejudicam o desempenho cardíaco (Fang, et al., 2004).

Nesta revisão serão abordados os seguintes temas:

- a) O modelo de diabetes em ratos usado nesta dissertação;
- b) As alterações no metabolismo energético de miócitos cardíacos em corações de diabéticos;
- c) Os efeitos do diabetes na função cardíaca;
- d) Na homeostasia de Ca^{2+} e nas propriedades mecânicas e morfológicas dos cardiomiócitos;
- e) Os efeitos do exercício físico regular no metabolismo energético de miócitos cardíacos de corações de diabéticos,
- f) Os efeitos do exercício físico regular na função cardíaca;
- g) Os efeitos do exercício físico regular na homeostasia de Ca^{2+} ;
- h) Os efeitos do exercício físico regular nas propriedades mecânicas e morfológicas; de cardiomiócitos diabéticos.

3.1. O modelo experimental de diabetes induzido por Streptozotocina

A ação diabetogênica da estreptozotocina (STZ), substância isolada do *Streptomyces achromogenes*, foi descrita inicialmente por Rakieten et al. (1963) e Evans et al. (1965). A injeção intravenosa de soluções de STZ induziu diabetes em ratos e cães e, a partir desses achados, o diabetes passou a ser induzido com sucesso em diferentes modelos experimentais.

Os mecanismos da ação diabetogênica da STZ estão relacionados à citotoxicidade e glicosilação de proteínas das ilhotas pancreáticas, uma vez que STZ inibe seletivamente a enzima O-GlcNAcase, responsável pela remoção de N-acetilglucosamina da proteína. Tal ação causa apoptose das células β -pancreáticas

(Konrad et al., 2001). Outro mecanismo proposto para o efeito diabetogênico da STZ é que a droga promove lesão histopatológica nas células β -pancreáticas por reduzir os níveis de NAD (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) disponível nessas células (Akbarzadeh et. al., 2007).

Os ratos com diabetes induzido pela estreptozotocina apresentam algumas características como perda de massa corporal, glicosúria, polifagia, hipoinsulinemia e hiperglicemia (Hakim et al., 1997). A patofisiologia deste tipo de diabetes inclui cardiomiopatia que está freqüentemente associada com distúrbios do ritmo cardíaco e disfunção contrátil do coração. Além disso, ratos com diabetes induzido com STZ apresentam redução na atividade física diária, temperatura corporal e na variabilidade da freqüência cardíaca (Howarth et al., 2006). Redução na freqüência cardíaca (FC) em corações isolados (De Angelis et al., 2000) e contrações espontâneas no átrio direito (Sellers & Chess-Williams, 2000) em ratos tratados com STZ sugerem que alterações intrínsecas são parcialmente responsáveis pelos distúrbios no ritmo cardíaco destes animais.

3.2. Alterações no metabolismo energético de miócitos cardíacos em corações de ratos diabéticos

Em condições fisiológicas normais, o músculo cardíaco utiliza múltiplos substratos energéticos, tais como carboidrato, ácidos graxos, aminoácidos e cetonas. Porém, mudanças no metabolismo energético em função de alterações no fornecimento e utilização de substratos podem levar ao desenvolvimento de anormalidades metabólicas e, conseqüentemente, cardiomiopatia diabética (Saunders et al., 2008).

Na presença de DM a via glicolítica está comprometida. No interior dos cardiomiócitos a glicose é convertida em energia através da glicólise numa série de reações que ocorrem para a conversão de glicose em piruvato e trifosfato de adenosina (ATP). Fosfofrutoquinase 1 (PFK1), enzima chave na via glicolítica, cataliza a produção de frutose 1,6 bifosfato a partir de frutose 6 fosfato. Essa enzima é ativada por difosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e fosfato inorgânico (Pi) e é inibida por frutose 1,6 bifosfato e reduções no pH. Essa e outras enzimas da via glicolítica sofrem inibição em resposta a hiperglicemia (Donthi et al., 2004; Stanley et al., 2005). Além disso, estudos com frações de células mostraram que as enzimas glicolíticas estão agrupadas próximas ao retículo

sarcoplasmático (RS) e sarcolema, sugerindo que as reações glicolíticas não são distribuídas no citoplasma, mas ocorrem em um subdomínio no entorno dos cardiomiócitos (Stanley et al., 2005).

Dessa forma, estudos que analisam os efeitos da inibição de enzimas da via glicolítica sugerem que o ATP gerado pela glicólise é, preferencialmente, utilizado pelo RS para a liberação de Ca^{2+} e pelo sarcolema para manter a homeostase iônica. Além disso, a inibição da glicólise piora o relaxamento celular em situações de isquemia e de reperfusão do miocárdio pós-isquemia, sugerindo que o ATP gerado pela via glicolítica é essencial para o relaxamento celular (Stanley, 2005; An & Rodrigues, 2006).

Por outro lado, na presença de DM o coração rapidamente se adapta passando a usar, exclusivamente, ácidos graxos para a produção de ATP. A hiperglicemia resultante da diminuição da utilização de glicose pelas células e do aumento na produção hepática de glicose incorre em aumento da lipólise no tecido adiposo e isso contribui para elevação na síntese de lipoproteínas e circulação de ácidos graxos. Esses substratos são rapidamente convertidos e acumulados no músculo cardíaco sob a forma de triglicerídeos e ceramida, o que contribui para a lipotoxicidade e redução da função cardíaca. Além disso, o consumo de oxigênio pelo miocárdio aumenta em função da maior utilização de lipídeos como substrato energético (Buchanan, et al., 2005; An & Rodrigues, 2006).

As mitocôndrias são as principais geradoras de energia no miocárdio. Assim, as disfunções mitocondriais na presença de DM podem causar efeitos deletérios nas células cardíacas. Por exemplo, animais *knock out* para Ant1 (gene que controla as modificações no conteúdo de ATP mitocondrial e ADP citosólico) ou Tfam (fator de transcrição mitocondrial que regula a biossíntese e a expressão gênica) apresentam déficit de energia nas células cardíacas em situação de cardiomiopatia (An & Rodrigues, 2006).

O diabetes compromete também a utilização de lactato como fonte de energia em células cardíacas. Em estudos com animais diabéticos verificou-se que a utilização de lactato parece sofrer redução, provavelmente em decorrência da diminuição da lactato desidrogenase (LDH) ou de transportadores de lactato nos cardiomiócitos (An & Rodrigues, 2006).

Outras enzimas importantes da via glicolítica também podem estar alteradas no coração de diabéticos. Chatham & Seymour (2002) observaram que corações de

ratos com DM tipo 2 apresentavam depressão na atividade enzimática de piruvato desidrogenase (PDH) e concomitante redução na oxidação de piruvato, o que pode aumentar os desequilíbrios na utilização de substratos pelas células cardíacas. A atividade de outras enzimas tais como PFK1 e lípase lipoprotéica (LPL) também são diminuídas com o DM (Stanley et al. 1997).

Paralelamente, o excesso de glicose pode afetar o crescimento e o desenvolvimento das células cardíacas, assim como o processo contrátil dessas células. Por exemplo, cardiomiócitos expostos a altas concentrações de glicose, ácido palmítico e ceramida exibem anormalidades nas proteínas contráteis e conseqüente desorganização da maquinaria contrátil cardíaca, além de redução no contato intercelular e concomitante apoptose. Em cardiomiócitos de animais com diabetes, altas concentrações de glicose reduzem a formação de novas miofibrilas, em particular miosina de cadeia pesada (Dyntar et al., 2006).

O processo contrátil do miocárdio pode ser afetado também pela acentuada deposição lipídica, o que aumenta o conteúdo intracelular de acetilcoenzima A (acetil CoA). Este aumento provoca estresse oxidativo, disfunção celular, apoptose e comprometimento da sinalização insulínica nessas células. Essas alterações contribuirão para disfunções no processo contrátil cardíaco com anormalidades na utilização de energia pelas células e redução da capacidade de trabalho da musculatura cardíaca, principalmente em situações onde a demanda energética está aumentada (Owens et al., 2005).

Em nível celular, o aumento na concentração extracelular de glicose implica em prolongamento do potencial de ação dos miócitos cardíacos, afetando o acoplamento excitação-contração e aumenta o tempo para o relaxamento celular (Ren & Davidoff, 1997). Para esses autores as vias de sinalização que levam a alterações no acoplamento excitação-contração na presença de DM ainda não estão bem definidas. No entanto, sugere-se que os efeitos de altas doses de glicose no acoplamento excitação-contração do cardiomiócito pode indicar que os eventos iniciais representam mudanças em proteínas-alvo (ex. canais iônicos) ou proteínas regulatórias (proteína kinase C- PKC ou cálcio calmodulina kinase II- CAMKII).

Muitas proteínas regulatórias são conhecidas principalmente por alterarem diretamente a função de canais iônicos ou bombas na membrana celular [PKC, por exemplo, deprime o fluxo de potássio (K^+) para fora da célula e a atividade de canais

liberadores de Ca^{2+}]. A depressão da corrente iônica de K^+ , em ratos, poderia liderar o prolongamento do potencial de ação das células cardíacas (Bers, 2002).

Outro fator importante é a modificação da matriz intra e extracelular na presença de DM. A glicosilação pode alterar os filamentos do citoesqueleto e a estrutura molecular (F-actina e colágeno) dos miócitos cardíacos. Isto pode resultar em disfunção contrátil dos cardiomiócito (Adeghate, 2004; Fang et al., 2004).

3.3. Efeitos do exercício físico regular no metabolismo energético de miócitos cardíacos de ratos diabéticos

Os tratamentos medicamentosos com insulina e hipoglicemiantes e aqueles não- medicamentosos com dieta e exercício físico têm sido indicados para portadores de DM com o objetivo de aumentar a utilização de substratos energéticos pelas células, em especial a glicose, para que as complicações metabólicas e as alterações na estrutura e funcionamento celular sejam atenuadas.

O exercício físico regular tem sido indicado como uma forma de tratamento capaz de minimizar as alterações decorrentes da hiperglicemia e retardar as complicações cardíacas tanto em seres humanos diabéticos como em modelos animais de DM. Estudos buscam esclarecer os efeitos do exercício físico na homeostasia de glicose, tanto no músculo cardíaco quanto no músculo esquelético, que possam causar redução nos efeitos deletérios do DM (De Angelis et al., 2000; Maionara et al., 2002; Loganathan et al., 2007; Saraceni & Broderick, 2007; Bidasee et al., 2008; Shao et al., 2009).

Ratos Zucker diabéticos e obesos apresentam aumento da glicemia e do glicogênio cardíaco, os quais foram normalizados após 13 semanas de natação. O aumento do glicogênio cardíaco tem sido associado ao aumento da PKB e GSK3 (inibidor de glicogênio sintase). GSK3 é uma serina/treonina proteína quinase que media a adição de moléculas de fosfato de serina e treonina a certos aminoácidos, em particular substratos celulares. A fosforilação de outras proteínas por GSK3 inibe a proteína alvo, neste caso glicogênio sintase. PKB e GSK-3 estão envolvidas na homeostasia de glicose das células cardíacas, sendo a fosforilação dessas proteínas dependente de IGF1 e insulina. A manutenção de GSK-3 em estado desfosforilado remove a inibição da glicogênio sintase e promove acúmulo de glicogênio nas células cardíacas. Consequentemente, a ação fisiológica da insulina diminui,

resultando em complicações presentes no diabetes tipo II como hiperglicemia, insulinemia e resistência hepática à insulina, entre outras (Derave et al., 2000)

Além disso, alguns estudos (Pold et al., 2005; Fujii et al., 2006) sugerem que o exercício físico promove aumento na ativação de enzimas que regulam o metabolismo de glicose e ácidos graxos, como a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). Isso elevaria a oxidação de glicose e lipídeos nas células cardíacas, reduzindo as complicações metabólicas provocadas pela hiperglicemia.

Outros estudos mostraram que os níveis de fosfocreatina, que estavam reduzidos em animais com diabetes, foram aumentados em resposta ao exercício físico (Mokhtar et al., 1992; Mokhtar et al., 1993). Esses autores mostraram que a fosforilação oxidativa e a respiração mitocondrial estavam elevadas após o exercício em esteira, o que poderia explicar a melhora da função cardíaca apresentada pelos animais diabéticos exercitados. Os mesmos autores sugerem ainda que a melhora da função cardíaca em resposta ao exercício ocorre por essas vias, independentes do controle glicêmico.

De acordo com Davidoff et al. (2004), animais com alta ingestão de carboidratos exibiam disfunções nas células cardíacas, porém, quando esses eram tratados com bezafibrate, um redutor dos níveis séricos de lipídeos, ou realizavam corrida voluntária, as alterações cardíacas foram revertidas. Para estes autores o aumento na oxidação de glicose e na sensibilidade a insulina, após esses tratamentos, levam a prevenção das disfunções contráteis nos miócitos cardíacos afetados pelo DM.

Nessa perspectiva parece que as alterações intracelulares (moleculares e estruturais) decorrentes do DM são subjacentes às disfunções contráteis e alterações morfológicas causadas pela hiperglicemia. Porém, as adaptações do miocárdio ao exercício físico são capazes de atenuar essas disfunções, tornando mais eficiente o músculo cardíaco na presença de cardiomiopatia diabética.

3.4. Efeitos do diabetes na função cardíaca e na homeostasia de Ca^{2+}

A função cardíaca de bombear o sangue tem por objetivo atender as demandas fisiológicas do organismo e reflete alterações de volume e pressão em cada câmara cardíaca e nas grandes artérias na medida em que o coração completa cada ciclo. Estas ações resultam em um débito cardíaco que compreende,

resumidamente, frequência cardíaca, volume sistólico e contratilidade do miocárdio (Aires, 2008).

Em nível celular, o acoplamento excitação-contração é um processo iniciado pela estimulação elétrica dos miócitos cardíacos através do potencial de ação (PA). Esse processo compreende quatro fases, descritas em cardiomiócitos de ratos da seguinte forma: Fase 0 - inicia o PA através de rápido influxo de sódio (Na^+) pelos canais de sódio dependente de voltagem, gerando uma corrente (I_{Na}) e rápida despolarização; Fase 1 - inicia-se com a lenta inativação dos canais de Na^+ e conseqüente inativação da I_{Na} , seguida de rápida ativação de canais de potássio (K^+), gerando uma corrente de repolarização precoce, transiente de potássio para fora (I_{to}), dominante nessa fase; Fase 2 - após a repolarização precoce, o PA atinge um platô (fase 2) e o potencial de membrana permanece em um estado relativamente despolarizado. Após um aumento na concentração intracelular de cálcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ através da liberação sarcoplasmática de Ca^{2+} , o potencial reverso do trocador sódio e cálcio (NCX) assume uma direção positiva, gerando um potencial de membrana mais negativo. A diminuição na condutância de K^+ imediatamente depois da despolarização via corrente de potássio (I_{k}) também ajuda a manter o platô do PA; Fase 3 - a fase de platô finaliza com a repolarização da membrana celular caracterizando a fase 3 do PA; e Fase 4 - os miócitos ventriculares mantêm uma diferença de potencial de 70 a 90 mV através da membrana com o interior da célula sendo negativa com relação ao exterior, caracterizando o repouso celular (Katz, 1992; Bers, 1993).

A presença de Ca^{2+} no citosol é essencial na atividade cardíaca, pois o Ca^{2+} ativa os miofilamentos no processo de contração. Durante o PA, apesar de pequena quantidade de Ca^{2+} entrar no citosol através dos canais de Ca^{2+} tipo T e NCX, a grande maioria dos íons Ca^{2+} entra no citosol dos miócitos cardíacos através dos canais de Ca^{2+} tipo L (também denominados de receptores de diidropiridina). Estes íons Ca^{2+} são responsáveis pela estimulação dos receptores de rianodina tipo 2 (RyR2), localizados na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), próximos aos canais de Ca^{2+} tipo L dos túbulos transversos do sarcolema, e induzem a liberação do Ca^{2+} armazenado no RS, processo conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (Bers, 2002). A combinação da entrada de Ca^{2+} e a liberação de Ca^{2+} pelo RS provocam o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, permitindo a ligação do Ca^{2+} à troponina C, o que ativa o processo de contração celular. A magnitude desse evento é modulada por

vários fatores, entre os quais aqueles que agem primariamente nos componentes responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} e os relacionados às proteínas reguladores da movimentação intracelular desse íon. O influxo de Ca^{2+} pode ser modulado ainda por estimulação simpática através de receptores β -adrenérgicos. A estimulação desses receptores por catecolaminas, ativa a adenilato ciclase e, concomitantemente, a formação de adenosina monofosfato cíclica (AMPC). Esse processo resulta em ativação de proteínas quinases e fosforilação de proteínas presentes no sarcolema (ex. cálcio calmodulina quinase 2 - CaMKII, proteína quinase A -PKA e Proteína G), causando aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e rompimento da inibição entre moléculas de actina e miosina, o que resulta em contração dos miócitos cardíacos (Bers, 2002). A liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} é um mecanismo inato de *feedback* positivo, entretanto, a sua cessação é essencial para o enchimento diastólico. A depleção do conteúdo de Ca^{2+} do RS e a inativação dos RyR2 são mecanismos responsáveis por essa cessação (Bers, 2002).

Há evidências de que a liberação de Ca^{2+} do RS não é uniforme em cardiomiócitos de ratos diabéticos (Shao et al., 2007). A fosforilação aumentada da CaMKII e da PKA pode alterar a sensibilidade dos RyR2 à ativação pelo Ca^{2+} (Wehrens et al., 2004). Existem evidências de que a expressão e a função dos RyR2 estão alteradas no miocárdio de ratos com diabetes induzido por STZ (Bidasee et al; 2003; Stolen et al; 2009).

Para que o relaxamento do cardiomiócito ocorra, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ deve ser reduzida, o que provocará a dissociação do Ca^{2+} da troponina C. A redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocorre pelo transporte de Ca^{2+} para fora do citosol. A maioria dos íons Ca^{2+} (~92% em ratos) é seqüestrada para o dentro do RS pela Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA 2), que é regulada pela fosfolambana (PLB). Outros íons de Ca^{2+} (~7% em ratos) são levados para o meio extracelular pelo trocador sódio-cálcio (NCX) e pela Ca^{2+} ATPase presente no sarcolema. Parte do Ca^{2+} (~1% em ratos) é levada para dentro das mitocôndrias pelo transporte de Ca^{2+} mitocondrial (Bassani, 1994; Bers, 2002).

A desorganização da regulação do Ca^{2+} nos miócitos cardíacos é considerada a principal causa de disfunções contráteis e arritmias em condições patológicas (Bers, 2002). Considerando a importância do Ca^{2+} no processo contrátil do miocárdio e no ciclo cardíaco, muitos autores têm investigado as alterações nas estruturas reguladoras da homeostasia de Ca^{2+} na presença de DM que podem contribuir para o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética.

Nessa perspectiva, Ren & Bode (2000) buscaram determinar se a disfunção cardíaca em animais geneticamente predispostos ao diabetes estava associada a alterações no acoplamento excitação-contração em nível celular. Verificaram que as maiores anormalidades mecânicas em miócitos cardíacos diabéticos envolvem a diminuição da amplitude de contração, da velocidade de encurtamento e relaxamento, além da diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ de repouso e do transiente de Ca^{2+} . Esses eventos contribuem para a depressão da função mecânica dos miócitos e, conseqüentemente, para redução do rendimento cardíaco.

Em animais tratados com frutose, resistentes a insulina, verificou-se que as anormalidades observadas no miocárdio destes animais se devem, principalmente, às alterações na estrutura cardíaca e a redução da expressão da SERCA 2, da proteína quinase dependente de AMPc e da proteína quinase dependente de Ca^{2+} nas células cardíacas. Essas complicações ocorrem em estágios anteriores à manifestação do diabetes tipo II (Vasanji et al., 2006).

Para verificar a associação entre cardiomiopatia e distúrbios na sinalização de Ca^{2+} , Kim et al. (2001) utilizaram modelo experimental de diabetes induzido por STZ. Eles demonstraram que a depressão da função cardíaca apresentou correlação positiva com as alterações nos mecanismos responsáveis pela liberação e recaptção de Ca^{2+} pelo RS. Essas alterações no ciclo de Ca^{2+} estavam relacionadas às proteínas reguladoras do Ca^{2+} nos miócitos cardíacos, a saber: diminuição da função dos RyRs, redução na expressão de SERCA2 e do NCX, além da não fosforilação da PLB, proteína reguladora da SERCA2 foram os fatores mais importantes no desenvolvimento da disfunção sistólica e diastólica na presença de cardiomiopatia diabética.

Assim, distúrbios no metabolismo da glicose, com concomitante hiperglicemia e hiperinsulinemia, podem causar alterações na homeostasia de Ca^{2+} . Há evidências de que tais distúrbios afetam a função contrátil de miócitos cardíacos, sendo observadas alterações das proteínas regulatórias, SERCA 2 e NCX, e nas proteínas contráteis (Zarain- Herzberg et al. 1994).

A relação entre a homeostasia de Ca^{2+} e a cardiomiopatia diabética foi investigada também por Noda et al. (1992) que mostraram que miócitos cardíacos de animais diabéticos, quando estimulados, exibiram valores inferiores da $[Ca^{2+}]_i$, se comparados aos animais controle não diabéticos. Isso indica que nos miócitos cardíacos de ratos diabéticos, os mecanismos de liberação e recaptção de Ca^{2+}

estavam deficientes, o que compromete a função cardíaca. Alterações semelhantes foram observadas por Lacombe et al. (2007), onde a liberação de Ca^{2+} pelo RS e a amplitude do transiente de Ca^{2+} estavam reduzidas, 50% e 20%, respectivamente, nos miócitos cardíacos de ratos após a indução do DM. No mesmo estudo, foram encontrados níveis reduzidos de SERCA2 nos miócitos cardíacos dos animais diabéticos, comparados aos dos animais do grupo controle.

Em relação à contratilidade de cardiomiócitos de animais diabéticos, Yu et al. (1994) observaram redução na amplitude de contração, que foi explicada pela redução do número de sítios de ligação de Ca^{2+} ao RyR2, indicando redução na liberação de Ca^{2+} pelo RS. A redução desses sítios de ligação poderia explicar a diminuição de 44% da fração de encurtamento, diminuição de 58% da taxa máxima de encurtamento e de 56% da taxa máxima de relaxamento observadas nos cardiomiócitos destes animais.

Na mesma linha, Bracken et al. (2006) investigaram os efeitos do diabetes induzido por STZ no transporte de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares de ratos. A amplitude do fluxo de Ca^{2+} e a amplitude de contração dessas células estavam reduzidas após a indução do DM. Estes resultados podem ser explicados pelas alterações na mobilização de Ca^{2+} nos miócitos ventriculares, assim como pelas reduções na atividade dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e pelas diminuições nos níveis de NCX, o que limitaria a liberação do Ca^{2+} para o processo contrátil, além de aumentar sua concentração no citosol em função da recaptação reduzida.

Os defeitos na sinalização intracelular de Ca^{2+} no diabetes tipo I ocorrem paralelamente à disfunção contrátil e contribuem para o declínio da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em casos de cardiomiopatia diabética (Choi et al., 2002). Esses defeitos estão relacionados, principalmente, à redução da expressão dos RyR2 do RS, além da depressão da atividade do NCX e aumento da população de PLB em estado desfosforilado, o que leva ao aumento da relação PLB/SERCA2 durante o transito de Ca^{2+} . Juntas, essas disfunções podem comprometer o ciclo cardíaco, pois causam disfunção sistólica e diastólica, pioram a função ventricular esquerda e reduzem a capacidade de trabalho do miocárdio.

Dessa forma, disfunções na contração e relaxamento do miocárdio na presença de cardiomiopatia diabética podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela expressão reduzida de proteínas regulatórias da homeostasia de Ca^{2+}

intracelular, tais como RyR2, SERCA2 e NCX. Além dessas disfunções, Loganathan et al. (2007) e Fang et al. (2004) mostraram, através de ecocardiografia, que animais e humanos diabéticos apresentam diminuição da fração de encurtamento, indicando depressão da função contrátil.

Esses achados indicam que, independente da origem do diabetes, disfunções nos mecanismos reguladores do fluxo de Ca^{2+} intracelular podem comprometer o ciclo cardíaco em nível celular e tecidual o que contribui para a redução da função cardíaca após a instalação da cardiomiopatia diabética.

Entretanto, estudos têm documentado que as alterações na homeostasia de Ca^{2+} , apenas, não explicam o déficit contrátil na cardiomiopatia diabética. Alguns autores sugerem que o remodelamento do ventrículo esquerdo em resposta ao diabetes tem papel crucial na disfunção contrátil (Zhang et al. 2008). Por exemplo, os níveis de proteínas NCX, e respectivo mRNA, apresentaram redução de 30% nos cardiomiócitos dos animais diabéticos, quando comparados aos não diabéticos (Hattori et al., 2000). Para Kim et al. (2001), a redução na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em cardiomiócitos de ratos diabéticos se devem, principalmente, à diminuição da afinidade da SERCA2 pelos íons Ca^{2+} , o que reduz a recaptação de Ca^{2+} pelo RS e aumenta a concentração citosólica desse íon. A diminuição da fosforilação da PLB também é um fator que contribui para a redução na taxa de recaptação de Ca^{2+} .

Na presença de cardiomiopatia diabética, as concentrações sistólicas e diastólicas de Ca^{2+} em miócitos cardíacos apresentaram redução de 52% e 43%, respectivamente, se comparadas às dos controles. Cardiomiócitos de animais diabéticos apresentaram ainda prolongamento no transiente de Ca^{2+} e declínio da fase sistólica do transiente. Além disso, a liberação de Ca^{2+} induzida por cafeína foi reduzida em animais com diabetes (Lagadic-Gossmann et al., 1996).

Esses desequilíbrios na homeostasia do Ca^{2+} associados às alterações na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} sugerem que anormalidades na recaptação e liberação de Ca^{2+} durante o ciclo contração-relaxamento de miócitos cardíacos de ratos diabéticos podem ser os principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de disfunções sistólicas e diastólicas no ciclo cardíaco (Singh et al., 2006).

Recentemente, Shao et al. (2009) demonstraram que miócitos cardíacos de ratos com diabetes induzido por STZ apresentaram redução na velocidade de contração, aumento na frequência de *sparks* de Ca^{2+} e alteração na liberação de Ca^{2+}

pelo RS. Além disso, demonstraram que os cardiomiócitos tinham a resposta dos RyR2 à ativação pelo Ca^{2+} reduzida, a fosforilação dos RyR2 aumentada, a atividade da PKA reduzida e a atividade da CaMKII aumentada. De forma semelhante, Stolen et al. (2009) verificaram que em miócitos cardíacos de animais diabéticos ocorrem alterações na sensibilização dos RyR2 ao Ca^{2+} , aumento na atividade de NCX, reduções na fosforilação de CaMKII, os quais podem comprometer a homeostasia de Ca^{2+} desenvolvendo uma alteração celular denominada vazamento diastólico de Ca^{2+} . Esse fenômeno compromete a função contrátil dos cardiomiócitos e, conseqüentemente, o desempenho cardíaco.

As alterações acima comentadas são freqüentemente associadas às cardiomiopatias nas formas de disfunções sistólicas, reduções na freqüência cardíaca, elevação da pressão arterial, dilatação ventricular esquerda, diminuições da fração de ejeção, assim como aumento do conteúdo de colágeno no miocárdio e necrose de miócitos da cavidade ventricular esquerda. Essas disfunções reduzem a capacidade de trabalho do miocárdio e, conseqüentemente, o débito cardíaco, interferindo no metabolismo de outros tecidos corporais e na capacidade aeróbica do indivíduo, quando se refere ao exercício físico (Fang et al., 2004, Loganathan et al., 2007; Howarth & Qureshi, 2008; Shao et al., 2009; Stolen et al., 2009).

Dessa forma, o DM promove alterações que, juntas, irão contribuir para a redução da capacidade de trabalho do miocárdio, principalmente quando se refere a situações de demanda energética aumentadas (ex. durante o exercício físico) reduzindo a capacidade cardíaca de se ajustar a novas demandas impostas aos sistemas orgânicos corporais.

3.5. Efeitos do exercício físico na função cardíaca e na homeostasia de cálcio em diabéticos

Durante o exercício físico a maior atividade metabólica requer aumento no débito cardíaco (Blomqvist, & Saltin, 1983). Nesse sentido, ocorrem ajustes cardiovasculares para atender a maior demanda de suprimento sangüíneo dos músculos em exercício e, ao mesmo tempo ao estresse sobre as paredes ventriculares (Grossman et al., 1975).

O exercício físico regular, por sua vez, promove benefícios à função contrátil do miocárdio através de adaptações mecânicas, morfológicas, bioquímicas e

moleculares dos miócitos cardíacos, entre outras. Estas adaptações refletem aumento no volume de ejeção e no débito cardíaco (Diffie, 2001, Diffie, 2004; Kemi, 2008).

Em condições patológicas (ex. Diabetes) o miocárdio também se adapta ao exercício físico regular. Por exemplo, um programa de exercício aeróbico (corrida em esteira, 27m/min, 60 minutos por dia) por oito semanas aumentou o débito cardíaco em coração isolado de ratos com diabetes induzido por STZ (De Blieux et al., 1993). O programa de exercício foi capaz de atenuar a severidade da cardiomiopatia diabética. Em modelo experimental de diabetes em porcos, um programa de exercício aeróbico (caminhada) preveniu a disfunção cardíaca e alterações em proteínas miofibrilares (Korte et al., 2005).

Todavia, os mecanismos responsáveis pelos benefícios do exercício físico regular ao miocárdio de diabéticos não estão completamente esclarecidos. Ratos diabéticos exercitados com corrida em esteira (20-25 m/min), durante três semanas, tiveram a piora de função cardíaca minimizada, além de aumentar a expressão dos receptores adrenérgicos β_1 , sem alterar os efeitos do diabetes na redução da expressão dos receptores β_2 , ou no aumento da expressão dos receptores β_3 (Bidasee et al., 2008). Isso resulta em aumento da responsividade cardíaca a estimulação β adrenérgica e conseqüente aumento do Ca^{2+} citosólico, uma vez que esses receptores estão localizados na membrana celular. Eles são acoplados a proteína G, a qual desencadeia uma série de reações via adenilato ciclase e AMPc e induzem a liberação de Ca^{2+} pelo RS, produzindo efeitos inotrópicos positivos (ex. aumento na amplitude do transiente de Ca^{2+} e da contração cardíaca) importantes para a restauração da função cardíaca em animais diabéticos.

O exercício físico pode também agir sobre as células betas pancreáticas. Um programa de 13 semanas de natação aumentou o número e melhorou a função destas células em animais diabéticos, quando comparados aos controles sedentários (Kiraly et al., 2008). Sugere-se que a melhora dos níveis glicêmicos nos animais treinados pode ser devido a resposta adaptativa ao exercício. Na mesma perspectiva, estudos demonstram que a corrida em esteira aumentou a oxidação de glicose e ácidos graxos no miocárdio de animais com diabetes, o que representa redução nos níveis de glicose e lipídios circulantes, adaptação que contribui para reduzir as complicações cardíacas no diabetes (Paulson et al., 1992; Broderick et al., 2005).

Há evidências que o exercício regular pode também atenuar a redução de transportadores de glicose em miócitos cardíacos na presença de DM, além de

promover o aumento da atividade da enzima citrato sintase evidenciando, dessa forma, o efeito benéfico da atividade física no metabolismo glicolítico e oxidativo na presença de cardiomiopatia diabética (Hall et al., 1995; Harmer et al., 2008).

Todavia, o estudo de De Oliveira et al. (2005) mostrou que em animais neonatais com diabetes induzido por aloxana, os efeitos do exercício na reabilitação cardíaca foram apenas parciais, no que se refere às adaptações positivas no metabolismo de ácidos graxos e glicose.

Com relação alterações citoplasmáticas, Searls et al. (2004) verificaram que um programa de corrida em esteira, por nove semanas, atenuou disfunções mitocondriais tais como ruptura de membranas, redução da área mitocondrial e reduziu o conteúdo de colágeno em miócitos ventriculares dos animais diabéticos treinados, quando comparados aos sedentários.

Em nível do órgão, os estudos têm demonstrado que o exercício regular é capaz de melhorar o desempenho do coração. Por exemplo, o débito cardíaco de ratos com diabetes experimental foi aumentado em resposta a um programa de corrida em esteira durante oito semanas (DeBlieux et al., 1993). Loganathan et al. (2007) analisaram os efeitos de nove semanas de treinamento com corrida em esteira sobre a função cardíaca de ratos com diabetes induzido por STZ. Os autores observaram que as reduções na função ventricular esquerda, no volume diastólico final, no volume de ejeção e no débito cardíaco destes animais foram minimizadas pelo exercício. Além disso, as anormalidades na velocidade de fluxo sistólico do ventrículo esquerdo, na aceleração e contração cardíaca e no volume sistólico final observadas nos animais diabéticos foram restauradas para níveis basais nos animais exercitados. Em camundongos db/db, modelo de cardiomiopatia diabética, observou-se que um programa de corrida intervalada em esteira aumentou a fração de encurtamento e volume sistólico (Stolen et al., 2009).

Em adição aos efeitos acima citados, o exercício regular reduz a rigidez do miocárdio presente no diabético, melhorando a elasticidade do músculo cardíaco, o que possibilita melhora da distensibilidade e hemodinâmica cardíaca. Tal efeito aumenta o volume diastólico final e, conseqüentemente, melhora a função cardíaca de animais diabéticos (Woodiwiss et al., 1996).

Em nível celular e molecular, estudos demonstraram que o exercício altera a homeostasia de Ca^{2+} em animais normais através do aumento da expressão de algumas proteínas reguladoras de Ca^{2+} , como SERCA 2, PLB e da CaMKII, sem

alterarão de outras como RyR2 e NCX (Diffie, 2004; Kemi et al., 2008, Delgado et al., 1999, Kemi et al., 2007). Outro aspecto importante da homeostasia de Ca^{2+} é a principal entrada deste íon na membrana celular via canais de Ca^{2+} tipo L. Todavia, três estudos investigaram os efeitos do exercício regular nos canais e corrente de Ca^{2+} tipo L, mas não encontraram alterações (Wang et al., 2008). Essas adaptações promovem aumento na amplitude de contração celular, redução no tempo de contração e de relaxamento, melhorando assim, a função cardíaca.

Todavia, poucos estudos investigaram os efeitos do treinamento físico sobre a função dos miócitos cardíacos em animais diabéticos e os resultados são controversos. Usando o modelo de diabetes induzido por STZ em ratos, Howarth et al. (2008) aplicaram um programa de corrida em esteira, com intensidade leve e moderada, e observaram que estes protocolos não promoveram modificações significativas no transiente de Ca^{2+} e na contratilidade de miócitos cardíacos destes animais. Mais tarde estes pesquisadores aplicaram outro programa de treinamento mais intenso em ratos diabéticos e observaram que o programa de exercício prolongou o tempo para o pico de contração, mas não afetou a amplitude de contração e o transiente de Ca^{2+} nos miócitos cardíacos destes animais (Howarth et al., 2009). Observa-se que estes resultados não são coerentes com a melhora da função cardíaca.

Entretanto, recentemente, Shao et al. (2009), empregaram um programa de corrida em esteira ainda mais intenso em ratos com diabetes e relataram que o exercício: a) cessou a redução na contratilidade cardíaca; b) aumentou a resposta do miocárdio a um agonista beta adrenérgico; c) atenuou o aumento dos *sparks* de Ca^{2+} ; e d) minimizou a liberação de Ca^{2+} diastólico. Além disso, o exercício reduziu a fosforilação dos RyR2, normalizou a reatividade dos RyR2 à ativação pelo Ca^{2+} e as atividades da CaMKII e PKA. Estes resultados indicam que o treinamento físico, nesta intensidade, normalizou a função dos RyR2 e da liberação de Ca^{2+} pelo RS. Estes achados são compatíveis com a melhora da função cardíaca.

Da mesma forma, Stolen et al. (2009) submeteram ratos diabéticos (db/db) a 13 semanas de treinamento intervalado com corrida em esteira rolante e demonstraram que o exercício foi capaz de restaurar a função contrátil dos cardiomiócitos destes animais através da normalização da função do NCX, fosforilação dos RyR2 e da redução da hiperfosforilação de CaMKII.

Portanto, parece que o modelo de exercício é importante para que ocorram as adaptações benéficas nos corações de diabéticos. Assim, destaca-se a necessidade de mais estudos para a compreensão dos efeitos do exercício físico regular sobre a estrutura e função dos miócitos cardíacos na presença de cardiomiopatia diabética.

3.6. Efeitos do diabetes na morfologia do coração

Hipertrofia cardíaca é definida como um aumento na massa muscular cardíaca causada, primariamente, pelo aumento das dimensões dos cardiomiócitos (Hart, 1994; Richey & Brown, 1998). Este é um mecanismo compensatório para o aumento da sobrecarga de pressão e/ou volume imposta ao miocárdio (ex. ajuste mecânico e bioquímico para superar o trabalho extra). Esta sobrecarga pode ser advinda de eventos fisiológicos ou patológicos.

Os mecanismos responsáveis pela hipertrofia cardíaca envolvem processos integrados que regulam o crescimento celular sob uma maior carga hemodinâmica e circulação hormonal. Portanto, o estresse mecânico e substâncias como fatores de crescimento e hormônios, tais como fator de crescimento de fibroblasto, endotelina I, angiotensina II, catecolaminas, glicocorticóides e hormônio tireoideano estão entre os estímulos que podem desencadear o processo hipertrófico no coração. Segundos mensageiros e sinalizadores associados, tais como Ca^{2+} , Na^+ , CaMKII, AMPc, PKA, PKC, diacilglicerol e inositol-1.4.5-trifosfato também participam do processo da hipertrofia cardíaca. A descrição e a discussão destes processos estão além do alcance deste trabalho, mas algumas revisões sobre o envolvimento destes fatores no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca foram publicadas (e.g. Morgan & Baker, 1991; Hefti et al., 1997; Heineke & Molkentin, 2006; Hu et al., 2005; Kneffel et al., 2007; McMullen & Jennings, 2007; Atchley & Douglas, 2007; Baraúna et al., 2007; Baraúna et al., 2008).

A hipertrofia cardíaca patológica ocorre em resposta a diversos estímulos incluindo hipertensão, doença valvular, cardiomiopatia diabética, infarto do miocárdio e mutação gênica. No caso das cardiomiopatias, o estímulo inicial para a hipertrofia pode ser a sobrecarga volumétrica (hipertrofia excêntrica) e/ou pressórica (hipertrofia concêntrica) ou advindo de estímulo tóxico, metabólico, viral ou hereditário, os quais impõem sobrecarga ao miocárdio. Esta sobrecarga induz modificações na morfologia cardíaca como aumento do volume dos miócitos, formação de novos sarcômeros, fibrose intersticial, necrose e apoptose de

cardiomiócitos, acompanhada de depressão da função cardíaca (McMullen & Jennings, 2007).

A hipertrofia cardíaca patológica ocorre inicialmente para normalizar o estresse na parede do coração e manter a função cardíaca em repouso (crescimento compensatório). No entanto, em função da hipertrofia, pode haver descompensação cardíaca levando à dilatação ventricular esquerda e disfunção cardíaca (McMullen & Jennings, 2007).

Em resposta a um estímulo patológico os fibroblastos cardíacos e a matriz extracelular aumentam de maneira desproporcional e excessiva. Isso leva à rigidez mecânica, a qual contribui para a disfunção sistólica e diastólica do miocárdio (McMullen & Jennings, 2007).

A hiperglicemia promove ainda a formação de espécies reativas de oxigênio que alteram a transdução de sinais e ativa vias de sinalização que levam a morte celular programada ou apoptose no miocárdio. Este evento que está associado também à glicosilação de p53 e um incremento na síntese de angiotensina II que, por sua vez, aumenta a fosforilação de p53 e apoptose dos cardiomiócitos (Fang et al., 2004). Todavia, a apoptose não provoca formação de cicatrizes ou acúmulo significativo de colágeno com fragmentação nuclear e retração das células. Inversamente, a necrose dos miócitos resulta na ampliação dos compartimentos extracelulares e aumento na deposição de colágeno de forma difusa ou dispersa decorrentes da fibrose de substituição devido à necrose dos miócitos e proliferação das células do tecido conjuntivo (Anversa et al., 1998; Frustaci et al., 2000). Esse acúmulo de colágeno no miocárdio diabético pode ser, em parte, devido à piora na degradação de colágeno resultante da glicosilação dos resíduos de lisina do colágeno.

Outros estudos têm demonstrado alterações estruturais paralelas às mudanças na função cardíaca em corações de indivíduos com DM. Estudos experimentais com animais diabéticos tipo 2, por exemplo, verificaram que esses animais apresentavam velocidade de pico diastólico mais lenta e prolongada desaceleração, as quais estavam associadas à fibrose extracelular e aumento no número de receptores para angiotensina II em cardiomiócitos da cavidade ventricular esquerda, o que indica que ocorre fibrose ventricular esquerda nos estágios iniciais do DM (Mizushige et al; 2000). Além disso, em ratos com DM a relação massa do coração/massa corporal apresentou aumento (indicativo de hipertrofia cardíaca patológica) e o volume de componentes extracelulares apresentou aumento de três vezes. Enquanto a doença

progride, aumenta a perda de miócitos e a fibrose de substituição. Para Wang et al. (2009), corações de animais com diabetes experimental apresentam aumento de fatores de crescimento para o tecido conectivo, o que contribui para agravar a fibrose cardíaca e desenvolvimento de hipertrofia patológica.

Há relatos de que em indivíduos diabéticos com insuficiência cardíaca ocorre fibrose intersticial e acúmulo de glicoproteínas (Regan et al., 1977). Em corações de cachorros, macacos e coelhos diabéticos, o aumento da formação de tecido colágeno explica as modificações fisiológicas e anatômicas do miocárdio com cardiomiopatia. Assim, a fibrose e a hipertrofia de cardiomiócitos são os mecanismos propostos para explicar as alterações cardíacas na cardiomiopatia diabética (Regan et al., 1981). A doença cardíaca em pacientes diabéticos pode simplesmente refletir a fibrose intersticial, pois o acúmulo de tecido colágeno ocorre, principalmente, como resultado do aumento no conteúdo de colágeno tipo III (Shimizu et al., 1993).

Por outro lado, as anormalidades cardíacas como redução na velocidade de fluxo transmitral (disfunção diastólica) e diminuição na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e no débito cardíaco (disfunção sistólica) podem ocorrer na ausência de fibrose, sugerindo que a função cardíaca anormal nesse modelo pode ser de origem mais metabólica que estrutural (Mihm et al., 2001).

Usando ecocardiografia por ressonância magnética, Loganathan et al. (2006, 2007) mostraram que além de anormalidades no ciclo cardíaco como um todo, corações de animais diabéticos induzidos por STZ apresentam volume cardíaco maior, volume ventricular esquerdo e relação massa do coração/massa corporal aumentados. Consequentemente, as imagens do ciclo cardíaco mostraram 28% de redução no volume diastólico final, aumento de 10% no volume sistólico final, redução de 48% no volume de ejeção e 28% na fração de ejeção ventricular esquerda. Essas alterações sugerem hipertrofia cardíaca patológica que pode estar relacionada à fibrose cardíaca.

Da mesma forma, Frustaci et al. (2000) mostraram que corações de pacientes com cardiomiopatia diabética exibiam quadro de apoptose e necrose de cardiomiócitos, além de miócitos hipertrofiados, massa cardíaca aumentada, dilatação ventricular esquerda e depressão do desempenho ventricular, sendo que estas características anatômicas e funcionais refletiam em hipertrofia excêntrica descompensada. Semelhante a esses autores, Yoshida et al. (1995) analisaram pacientes com cardiomiopatia hipertrófica e verificaram que estes apresentavam

aumento do septo interventricular e falha cardíaca com redução da fração de encurtamento.

As alterações morfológicas decorrentes do DM promovem modificações na estrutura celular e tecidual do miocárdio que, juntas, podem evoluir para hipertrofia patológica, causando disfunção cardíaca e redução da capacidade de bomba do coração.

Com o objetivo de entender as hipóteses existentes sobre os efeitos da hiperglicemia sobre a estrutura e função cardíaca, Poornima et al. (2006) buscaram descrever as diferenças entre os modelos experimentais de diabetes e as disfunções morfológicas e funcionais cardíacas apresentadas por esses modelos. Esses autores mostraram, então, que o DM envolve muito mais que o simples aumento na glicemia. Em modelos experimentais de DM tipo 1 (induzidos por STZ ou aloxana), por exemplo, eles verificaram aumento da massa, aumento do conteúdo de lipídeos cardíacos e redução nas funções sistólica e diastólica, mesmo na ausência de fibrose cardíaca e fluxo coronariano normal. Diferente desses modelos, animais transgênicos ob/ob e db/db com DM tipo II apresentam massa cardíaca aumentada, acúmulo de lipídeos no miocárdio e disfunção sistólica, entretanto, não desenvolvem fibrose.

Da mesma forma, ratos com diabetes e obesidade (ZDF) e OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty), modelo de DM tipo II desenvolvido por Kawano et al. (1991) e Kawano et al. (1992), também apresentam aumento da massa cardíaca, aumento do conteúdo de lipídeos no miocárdio, disfunção sistólica e diastólica, no caso de ZDF, e disfunção diastólica sem fibrose no miocárdio no modelo OLETF. Assim, pode-se perceber que, apesar de apresentarem patologia comum, as alterações na estrutura cardíaca podem variar dependendo do tipo de DM desenvolvido e do modelo de diabetes experimental utilizado nos estudos.

Em situações não patológicas, em nível celular, o aparato contrátil cardíaco ocupa a maior parte do volume celular. Os miócitos cardíacos ocupam cerca de 75% do volume total do miocárdio, mas somente 1/3 de todas as suas células. Os cardiomiócitos apresentam comprimento cerca de 50 a 180 μm e largura de aproximadamente 10 a 30 μm (Moore e Volker, 2005). Porém, o tamanho dessas células varia substancialmente dentro do mesmo coração e depende se o coração é normal, exercitado ou apresenta alguma patologia.

No coração com cardiomiopatia diabética os miócitos apresentam comprimento e largura inferiores, quando comparadas aos controles não diabéticos

(Dyntar et al., 2006; Choi et al., 2002). Porém, em modelo animal experimental db/db, com DM tipo II, não foram encontradas alterações no volume celular (Pereira et al., 2006; Shao et al.; 2009). Da mesma forma, Howarth et al. (2008) e Howarth & Qureshi (2008) não encontraram diferença significativa no comprimento celular de miócitos cardíacos de animais com diabetes tipo I ou tipo II.

Todavia, Fredersdorf et al. (2004) mostraram que animais com diabetes tipo II (ZDF) apresentam aumento do volume dos miócitos cardíacos, sugerindo hipertrofia celular na presença de cardiomiopatia diabética.

Percebe-se que as alterações, principalmente de comprimento dos cardiomiócitos, nos corações diabéticos não são consensuais, porém no que se refere ao volume celular, os estudos tem encontrado resultados que indicam modificações celulares como aumento da área citoplasmática e redução na densidade mitocondrial (Searls et al., 2004), o que sugere hipertrofia patológica.

3.7. Efeitos do exercício físico sobre a morfologia do coração

A hipertrofia cardíaca fisiológica ocorre em resposta a estímulos, tais como exercício crônico e gravidez, e apresenta aumento nas dimensões dos cardiomiócitos e do número de mitocôndrias, proporcional ao aumento no conteúdo de miofibrilas, crescimento de cardiomiocitos sem o desenvolvimento de fibrose ou alterações em artérias intramurais e a função cardíaca é mantida ou melhorada. Esta adaptação é reversível (Chrisman & Tomanek, 1985; White et al., 1987; Laughlin et al., 1987; Pellicia et al., 1990; McMullen & Jennings, 2007).

A hipertrofia cardíaca em resposta ao exercício físico (hipertrofia fisiológica), descrita como “coração de atleta”, inclui alterações morfológicas e funcionais (Atchley & Douglas, 2007, Wang et al., 2008). Este tipo de hipertrofia ocorre em ambos os ventrículos, mas em grau mais elevado no ventrículo esquerdo (VE) (Moore & Korzick, 1995). A hipertrofia cardíaca do tipo excêntrica é induzida por exercícios de resistência aeróbia e ocorre em função do aumento no retorno venoso e sobrecarga volumétrica no músculo cardíaco. Isso leva ao aumento da cavidade ventricular, proporcional a espessura das câmaras cardíacas. Por outro lado, a hipertrofia cardíaca do tipo concêntrica é induzida por exercícios de força e potência que promovem aumento de tensão contra resistência e sobrecarga pressórica no músculo cardíaco. Isto leva a aumento da espessura das paredes do miocárdio,

sem aumento das cavidades dos ventrículos (Fleck, 1988; Douglas, 1989; Moore & Korzick, 1995; Díaz-Herrera et al., 2001., Naylor et al., 2008).

Em nível celular, os cardiomiócitos de animais treinados exibem modificações morfológicas. Estudos revelam que o exercício regular de resistência aeróbica com intensidade baixa a moderada leva a hipertrofia cardíaca com o aumento principalmente do comprimento dos cardiomiócitos e que o exercício de intensidade alta, contínuo ou intermitente, promove hipertrofia cardíaca com aumento da largura dos cardiomiócitos (Moore et al., 1993; Wisloff et al; 2001; Natali, 2001, 2002; Diffie & Nagle, 2003; Kemi et al., 2004; Wang et al., 2008; Galindo et al., 2009). Porém, Schultz et al. (2007) e Eisele et al. (2008) verificaram que a corrida voluntária não alterou o comprimento, a largura ou o volume de cardiomiócitos de ratos, entretanto, essas células exibiam maior número de mitocôndrias e o ventrículo esquerdo apresentou maior volume total.

Em corações de animais diabéticos, Loganathan et al. (2007) verificaram que, apesar do exercício físico melhorar a função cardíaca destes animais, não alterou a massa cardíaca. De forma semelhante, outros estudos não encontraram alterações na massa cardíaca de animais diabéticos treinados (Lajoie et al., 2004; Searls et al., 2004; Howarth et al., 2009; Shao et al., 2009).

Em nível celular, todavia, poucos estudos investigaram os efeitos do treinamento físico sobre a morfologia de cardiomiócitos de ratos diabéticos. Alguns estudos não encontraram alterações na morfologia (comprimento, largura e volume) dos miócitos cardíacos de animais treinados, comparados aos sedentários (Howarth et al., 2008; Howarth et al., 2009; Shao et al., 2009). Todavia, Stolen et al. (2009) mostraram que animais com DM tipo II treinados apresentaram volume celular inferior aos seus controles sedentários, sugerindo que o exercício físico é capaz de bloquear a hipertrofia patológica causada pela hiperglicemia.

Portanto, apesar de alguns resultados diferentes, a maioria dos estudos mostra que o exercício físico é capaz de promover adaptações morfológicas em nível celular e tecidual que juntas contribuem para a melhora da capacidade cardíaca tanto em corações normais quanto na presença de cardiomiopatia diabética.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais de experimentação e tratamentos

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar com 30 dias idade e massa corporal média de 87,42 g provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Após a aclimação de sete dias, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, a saber:

- Controle não diabético sedentário (CN, n=10), animais que receberam injeção de tampão citrato de sódio e não exercitaram;
- Controle não diabético exercitado (CNE, n= 10), animais que receberam injeção de tampão citrato de sódio e exercitaram;
- Diabético Sedentário (DS, n=20), animais que receberam injeção de estreptozotocina e não exercitaram (veja item 4.2);
- Diabético Exercitado (DE, n=20), animais que receberam injeção de estreptozotocina e exercitaram (veja item 4.2).

Os animais dos respectivos grupos experimentais foram alojados em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola) em ambiente com temperatura média de 22°C e regime de luminosidade de 12 horas de escuridão e 12 horas de claridade, e receberam água e ração comercial *ad libitum*. Todos os animais foram pesados, as 8:00 horas no primeiro dia de cada semana ao longo do período experimental. Para isso utilizou-se uma balança eletrônica digital (Marte – Brasil, modelo AS5500C) com precisão de 0,01g. O consumo de ração dos animais foi monitorado semanalmente e o coeficiente de eficiência alimentar foi calculado [CEA= (ganho de massa / consumo de dieta) x 100] 45 dias após a indução do diabetes mellitus.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (processo nº03/2009).

4.2. Indução de Diabetes

Após jejum de 12 horas, os animais dos grupos DE e DS receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de massa corporal) de estreptozotocina (Sigma, St. Louis, EUA), diluída em 1mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5). Os animais dos grupos CN e CNE recebiam a mesma dose de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5) sem STZ. Sete dias após a aplicação de STZ e jejum de 12 horas, aproximadamente 10 µL de sangue foram coletados por meio de um corte transversal na ponta da calda do animal e a glicemia foi aferida utilizando-se o glicosímetro One touch ultra (Johnson & Johnson, México). Aqueles animais que apresentavam glicemia de jejum superior a 300 mg\dl foram considerados diabéticos. A glicemia de jejum e a massa corporal foram monitoradas semanalmente durante o período experimental pela manhã (8:00). Animais com glicemia de jejum inferior a 300 mg\dl recebiam nova dose da droga, sendo a glicemia de jejum aferida sete dias após a nova aplicação.

4.3. Programa de Treinamento

Alguns estudos demonstram que 60 dias após aplicação de STZ é período suficiente para promover alterações nas propriedades mecânicas de cardiomiócitos de ratos diabéticos (Howarth et al., 2008). Porém, sete dias após a aplicação dessa droga notam-se alterações na contratilidade das células cardíacas (Howarth et al., 2009).

Após 45 dias de hiperglicemia (diabetes), os animais do grupo DE e CE foram submetidos a um programa de treinamento em natação (adaptado de Medeiros et al., 2000), por 8 semanas. No primeiro dia da primeira semana os animais exercitaram na água, sem sobrecarga, durante 10 minutos. A duração do exercício foi aumentada em 10 minutos por dia nos quatro dias subsequentes desta semana. Na segunda semana, foi afixada ao corpo do animal uma carga de 1% de sua massa corporal (arruelas de metal atadas ao corpo com tiras de borracha flexível) e a duração do exercício continuou sendo aumentada em 10 minutos por dia até que os animais atingissem 90 minutos de natação ininterruptos ao final desta semana. A partir da terceira semana, a carga foi aumentada semanalmente em 1% da massa corporal, sendo que quando os animais não suportavam a nova carga (1%), a carga

utilizada foi aumentada em 0.5% até que atingissem carga total de 4% da massa corporal na última semana de treinamento.

O treinamento físico foi realizado no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados tanques de alvenaria quadrados, com 55 cm de largura por 65 cm de profundidade, cheios com água com temperatura entre 28 e 30 °C. Os animais dos grupos DS e CN eram colocados em uma caixa de polipropileno com água aquecida (28-30°C) e profundidade de 10 cm.

4.4. Massa do coração e dos ventrículos

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento físico foi realizada a eutanásia (inalação de gás carbônico) alternando os animais dos grupos, CN, CNE, DE e DS, dois animais por dia. Os animais restantes permaneceram em seus tratamentos até a eutanásia. Após eutanásia o coração foi removido, lavado em solução contendo 750 mM de CaCl₂ para retirar o excesso de sangue e imediatamente pesado em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200). Após a perfusão, os ventrículos (direito e esquerdo) foram separados dos átrios e pesados. Os índices de hipertrofia cardíaca e ventricular foram calculados pelas razões das massas dos corações e dos ventrículos, respectivamente, pela massa corporal.

4.5. Isolamento dos miócitos cardíacos

Após remoção, o coração foi canulado via artéria aorta e perfundido com solução de isolamento contendo 750 µM de CaCl₂ (solução A, item 4.8) em um fluxo constante até que os vasos coronários estivessem limpos de sangue. Em seguida, trocou-se a perfusão para a solução livre de cálcio contendo 0,1 mM de *ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)* (solução B, item 4.8), durante 4 a 6 minutos, para a destruição das bandas escalariformes. Na sequência, o coração foi perfundido com solução contendo 1 mg. ml⁻¹ de colagenase tipo 2 (Worthington, EUA) e 100 µM de CaCl₂ (solução C, item 4.8) durante 20 a 25 minutos, para a destruição das fibras de colágeno e matriz extracelulares. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O₂ 100% – White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 35°C. Ao final da perfusão os ventrículos foram separados dos átrios e pesados. O ventrículo direito foi removido e

o ventrículo esquerdo foi aberto na região do septo interventricular. Fragmentos finos (< 1 mm) foram obtidos das regiões próximas ao epicárdio (EPI) e ao endocárdio (ENDO). Os fragmentos foram colocados, separadamente, em frascos contendo 5 mL da solução enzimática (colagenase) e albumina sérica bovina (solução D, item 4.8). Os frascos foram agitados moderadamente durante 5 minutos, em “banho-maria” à temperatura de 37°C, sendo o tecido cardíaco oxigenado (O₂ 100% – White Martins, Brasil). A seguir, os fragmentos de tecido foram retirados dos frascos e o restante foi centrifugado (3000 rpm) por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e os miócitos cardíacos foram suspensos em solução contendo 750 µM de CaCl₂ (solução A, item 4.8). Esse processo foi repetido. Os miócitos cardíacos foram armazenados em placas de Petri em refrigerador (5°C) até serem utilizados.

4.6. Comprimento, largura e volume celular

Os miócitos cardíacos foram acomodados em uma câmara experimental (Figura 2), banhados pela solução de perfusão tampão (item 4.8) em temperatura ambiente (~ 25°C). O comprimento e a largura dos miócitos foram medidos usando-se um sistema de captação de imagens. As imagens das células foram visualizadas horizontalmente (aumento de 400x - lente de imersão em óleo S Flúor) no monitor de um microcomputador através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA), utilizando-se um programa de captação de imagens (M-Vision 5XX, Ionoptix, EUA). O comprimento celular foi determinado medindo-se a imagem da célula gerada no monitor, desde a borda direita até a borda esquerda, no ponto médio da largura do cardiomiócito. A largura celular foi determinada medindo-se a imagem gerada no monitor, desde a borda superior até a borda inferior, no ponto médio do comprimento dos miócitos cardíacos (Figura 1).

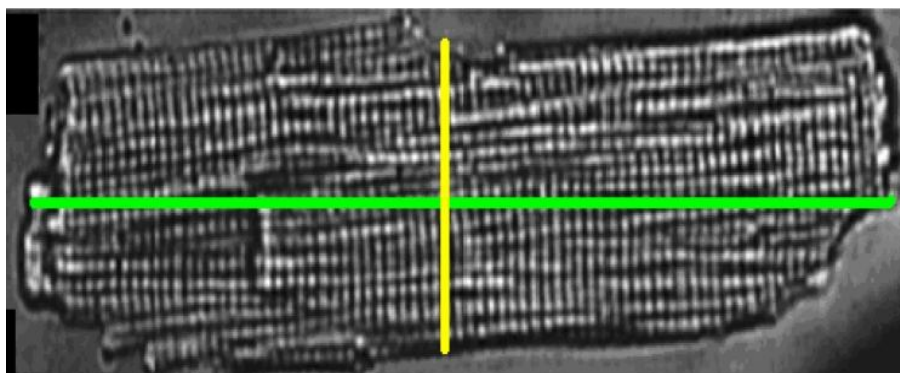


Figura1. Representação dos pontos de mensuração da imagem dos miócitos cardíacos. As linhas indicam como foram obtidos o comprimento (azul) e a largura (verde).

Para a mensuração do comprimento e da largura dos miócitos cardíacos, utilizou-se uma régua com precisão de 1 milímetro. Na calibração do sistema cada centímetro correspondia a 12 micrômetros. Somente foram utilizadas para as medições, as células que estavam em boas condições, com as bordas (direita/esquerda e superior/inferior) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxadas em repouso, sem apresentar contrações voluntárias.

O volume celular foi calculado usando-se a fórmula proposta por Satoh et al., 1996:

$$\text{Volume (pL)} = \text{comprimento } (\mu\text{m}) \times \text{largura } (\mu\text{m}) \times (7,59 \times 10^{-3} \text{ pL}/\mu\text{m}^2)$$

Onde:

* pL = picolitros

* μm = micrômetros

* $7,59 \times 10^{-3} \text{ pL}/\mu\text{m}^2$ = constante obtida pela medida direta do volume celular através de microscopia confocal, dada em picolitros por micrômetros ao quadrado, conforme Satoh et al. (1996).

4.7. Contração celular

As contrações celulares foram medidas através da técnica de alteração do comprimento dos miócitos cardíacos usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA). Os miócitos foram acomodados em uma câmara experimental com a base de vidro e banhados pela solução de perfusão tampão (item 4.8) em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$, Figura 2) e visualizada em um monitor, com aumento de 400x, através de uma lente de imersão em óleo (S Flúor, 40x, Nikon, EUA). Foram utilizadas para as análises das contrações somente os miócitos cardíacos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações voluntárias.

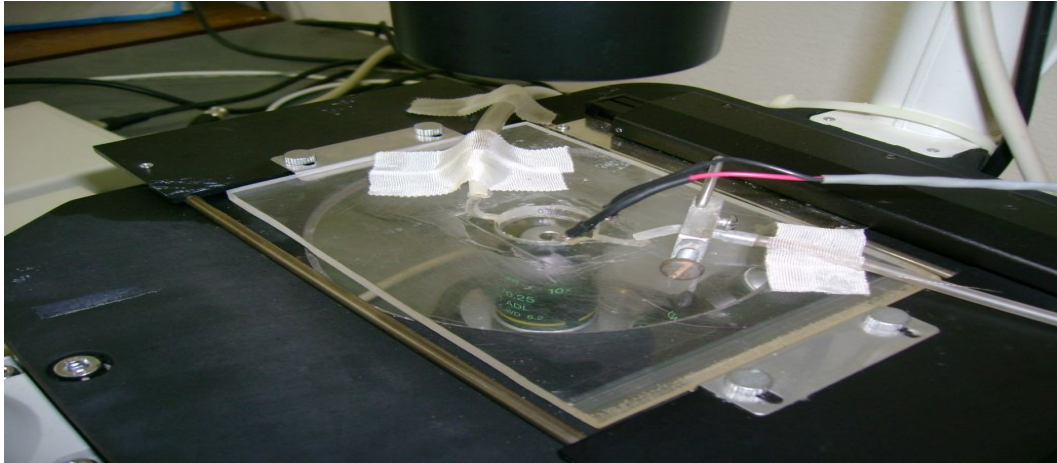


Figura 2. Câmara experimental acoplada a microscópio invertido. Observam-se o par de eletrodos conectados ao estimulador (fios preto e vermelho) e os tubos (setas verdes) usados para levar e retirar a solução de perfusão dessa câmara.

Os miócitos cardíacos foram estimulados externamente nas frequências de 1 e 3Hz (10 Volts, duração de 5 ms) utilizando-se um par de eletrodos de aço, colados nas bordas internas da câmara, através de um estimulador elétrico de campo (Myopacer, Ionoptix, EUA). Os miócitos foram visualizados em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com uma frequência de 240 Hz.

As bordas dos miócitos cardíacos foram identificadas com duas janelas (direita e esquerda) alinhadas ao longo do comprimento das células. A definição das bordas foi ajustada através do contraste (preto e branco) gerado pela qualidade da imagem projetada dos miócitos cardíacos (Figura 3).

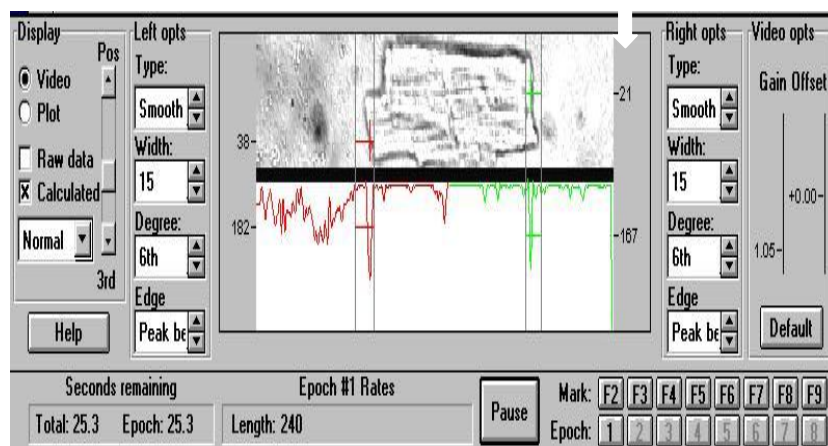


Figura 3. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos miócitos cardíacos (Ionopotix, EUA). As bordas direita e esquerda da célula são projetadas pelos picos verde e vermelho para baixo.

Os movimentos das bordas dos miócitos foram capturados pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA, Figura 3) durante 30 segundos e armazenados para análise posterior (Figura 4).

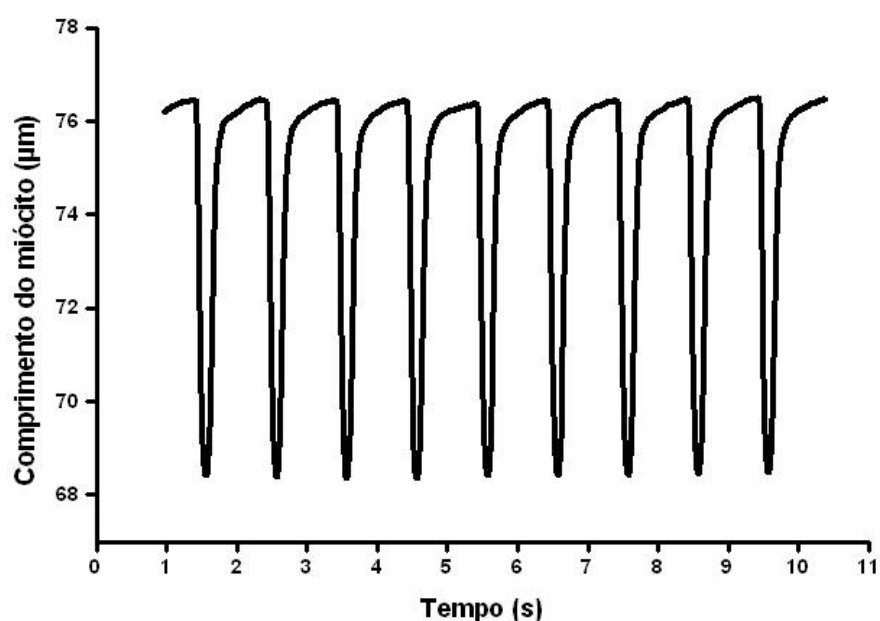


Figura 4. Registro experimental de encurtamento de uma célula do ventrículo esquerdo estimulada na frequência de 1 Hz em temperatura ambiente (~25°C).

Foram analisadas a amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), o tempo para o pico de contração (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a amplitude máxima de contração, ms), o tempo para 50% do relaxamento (tempo compreendido desde a amplitude máxima de contração até 50% do relaxamento, ms), a velocidade máxima de contração (velocidade pico de encurtamento celular, $\mu\text{m}/\text{seg}$) e a velocidade máxima de relaxamento (velocidade pico de relaxamento celular, $\mu\text{m}/\text{seg}$) (Figura 5). Estes parâmetros da contração foram analisados após a sobreposição de pelo menos seis contrações estáveis de cada cardiomiócito, conforme Roman - Campus et al. (2009).

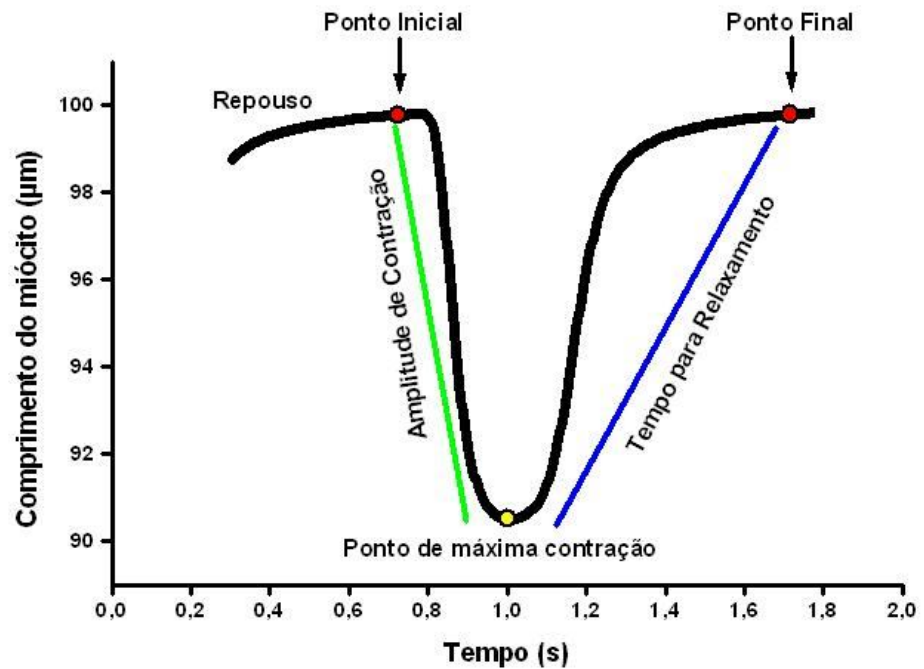


Figura 5. Diagrama demonstrativo do encurtamento de um cardiomiócito estimulado na frequência de 1 Hz (~25°C) e dos respectivos parâmetros da contração analisados. O ponto inicial representa um estímulo elétrico (célula em repouso) e o ponto final representa o final do estímulo (célula em repouso).

4.8. Soluções

As soluções utilizadas para o isolamento dos miócitos cardíacos ventriculares foram feitas usando-se uma solução básica com água milli-Q e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/l; MgCl₂ (1,43) – 0,28 g/l; KCl (5,4) – 0,4 g/L; *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) (5) – 0,062 g/L; glicose (10) – 1,8 g/L; taurina (20) – 2,38 g/L; creatina (10) – 1,3 g/L; pH = 7,3; temperatura ambiente.

Solução A:

Para se fazer a solução de isolamento contendo Ca²⁺, foram adicionados 375 µL de CaCl₂ (1 M) em 500 mL da solução básica.

Solução B:

Para a solução de isolamento livre de Ca^{2+} , foram adicionados 250 μL de EGTA (100 mM) em 250 mL da solução básica.

Solução C:

Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 20 mg de colagenase e 15 μL de CaCl_2 (100 mM) em 20 mL da solução básica.

Solução D:

Para a solução com 1% de albumina bovina, foram adicionados 500 mg de albumina sérica bovina em 5 mL de solução básica. Após o isolamento, 1 mL de albumina foi adicionado para cada 10 mL da solução enzimática C.

Solução de perfusão tampão HEPES:

Para fazer um litro da solução de perfusão tampão HEPES, foram adicionados 100 mL da solução estoque (abaixo), 10 mL da solução sopa (abaixo) e 1 mL de CaCl_2 (1) em água milli-Q. Esta solução foi equilibrada para um pH = 7,4 e mantida em temperatura ambiente.

Solução estoque (em mM): NaCl (113) – 65,99 g/L; HEPES (5) – 11,9 g/L; NaH_2PO_4 (1) – 1,42 g/L; MgSO_4 (1) – 2,46 g/L; KCl (5) – 3,72 g/L;

Solução sopa (em mM): Na acetato (20) – 16,4 g/100 mL; glicose (10) – 18,1 g/100 mL; insulina (5 u/L) – 0,5 g/100 mL.

4.9. Análise estatística

Os dados serão apresentados como média e erro padrão da média. Para a comparação das médias das variáveis glicemia, massa corporal, massa do coração, massa dos ventrículos e massas relativos entre os quatro grupos (fatores exercício e diabetes, 2 grupos cada) utilizou-se a Análise de Variância de duas entradas (ANOVA *two-way*) e *post-hoc* de Tukey para as comparações múltiplas. Para a comparação das médias das variáveis morfologia e contração celular dos miócitos das regiões EPI e ENDO entre os quatro grupos (fatores exercício, diabetes e região, 2 grupos cada) e utilizou-se a Análise de Variância de três entradas (ANOVA *three-way*) e *post-hoc* de Tukey para as comparações múltiplas. Essa análise foi feita através do software Sigma Start versão 3.0. Adotou-se o nível de significância de até 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período experimental, ocorreram perdas de animais nos grupos experimentais DS, DE e CNE. Após essas perdas, esses grupos apresentaram os seguintes números de animais: DS, n=10; DE, n=13 e CNE, n=6 e CN=10.

5.1. Características gerais dos animais

5.1.1. Glicemia

A Figura 6 mostra os valores médios da glicemia de jejum dos grupos CN, CNE, DS e DE ao longo do período experimental. A semana 1 corresponde ao período de aclimação dos animais ao Biotério de Experimentação Animal. A semana 2 corresponde à aplicação de STZ para indução do diabetes nos animais dos grupos DS e DE. A semana 7 corresponde ao final do período de indução e início do exercício físico dos grupos DE e CNE. Da semana 7 a semana 14 os animais dos grupos DE e CNE exercitaram e os dos grupos DS e CN permaneceram sedentários. Os dados das semanas 15 e 16 correspondem à última aferição antes da eutanásia. Foram sacrificados dois animais de cada grupo por dia, assim, o número de animais por grupo foi menor nas semanas 15 e 16.

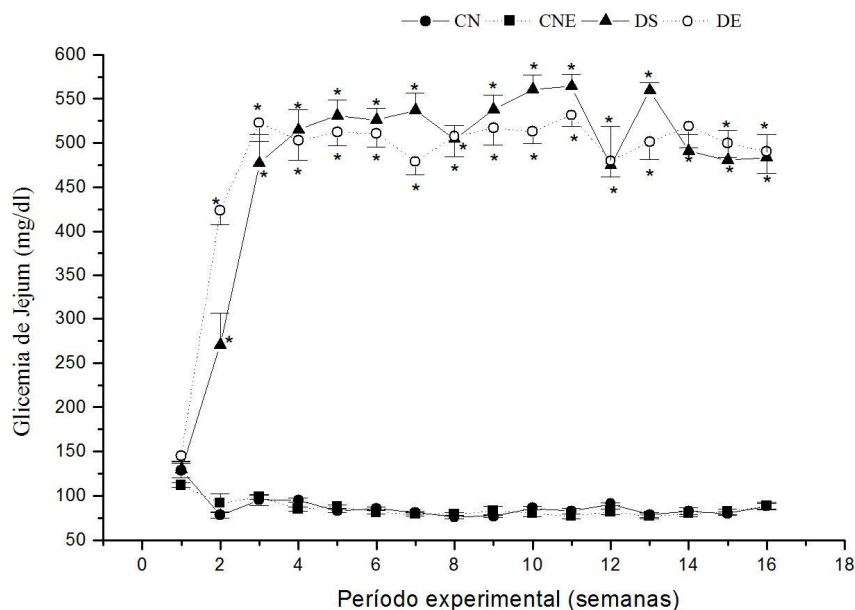


Figura 6. Glicemia de jejum dos animais dos respectivos grupos experimentais ao longo das semanas de experimento. DS, diabéticos sedentários, DE diabéticos exercitados, CN, controle não-diabético, CNE, controle não diabético exercitado. Os dados são expressos em média \pm EPM. *, DS e DE diferente de CN e CNE, $p < 0,001$.

Observa-se que a STZ induziu hiperglicemia nos animais dos grupos DS e DE na primeira semana de aplicação e os níveis glicêmicos destes animais aumentaram da semana cinco até o final do experimento. Nos animais que não receberam aplicação de STZ (CN e CNE) os níveis glicêmicos apresentaram redução na semana dois, sendo mantidos sem alterações até o final do período experimental.

Os dados da glicemia dos animais nos seus respectivos grupos experimentais em diferentes etapas do experimento estão apresentados na Tabela 1. Antes da aplicação de STZ não houve diferença de glicemia entre os grupos experimentais. Quarenta e cinco dias após a aplicação de STZ, momento em que os grupos DE e CNE iniciaram o programa de natação e ao final do experimento, no momento do sacrifício, os animais que receberam injeção de STZ apresentaram glicemia de jejum elevado, comparado aos animais não diabéticos. A glicemia de jejum não foi alterada pelo programa de natação aplicado tanto nos animais diabéticos (DE vs DS) quanto nos não diabéticos (CNE vs CN).

Tabela 1. Glicemia de jejum dos animais nos grupos experimentais.

Grupos	Glicemia inicial (mg/dl)	Glicemia 45 dias após indução (mg/dl)	Glicemia final (mg/dl)
CN (N=10)	82,4±4,2	87,8±11,3	88,3 ± 32,1
CNE (N=6)	84,0±4,2	76,2±11,3	86,8 ± 45,5
DS (N=10)	89,0±4,5	525,1±11,3*	475,8 ±32,1*
DE (N= 13)	93,0±4,0	520,1±11,9*	483,7±32*

Os dados são expressos em média± EPM. N, número de animais; DS, diabéticos sedentários; DE diabéticos exercitados; CN, controle não-diabético; CNE, controle não diabético exercitado. *, diferente de CN e CNE na mesma coluna. p<0,05.

Os efeitos do exercício regular sobre a glicemia plasmática parecem ser mais evidentes em diabéticos tipo 2, quando comparados ao diabético tipo 1. Albright et al. (2000), por exemplo, sugerem que o exercício físico aeróbio promove o aumento da sensibilidade celular à insulina e conseqüente redução dos níveis glicêmicos em indivíduos diabéticos tipo 2. Da mesma forma, o exercício físico foi capaz de aumentar o número e melhorar a função das células beta pancreáticas em animais Zucker diabéticos e obesos que apresentam resistência insulínica (Kiraly et al., 2008), o que resultou em redução dos níveis de glicose nesses animais.

Diferente desses estudos, Fujii et al. (2006) sugerem que, em nível celular, o exercício aeróbio promove aumento da utilização de glicose pelas células cardíacas, o que minimiza as alterações celulares causadas pela hiperglicemia. Assim, é possível que o treinamento físico aeróbio seja capaz de reduzir os níveis celulares de glicose, os quais não são diagnosticados através da aferição da glicemia plasmática apenas, principalmente em animais com diabetes tipo 1.

Além disso, a etiologia do diabetes e a diferença nos protocolos de exercício podem explicar as diferenças entre respostas glicêmicas de diabéticos tipo 1 e 2 após o treinamento físico aeróbio. A destruição permanente das células beta pancreáticas no diabetes tipo 1 pode explicar os achados do presente estudo, no qual o exercício não alterou a glicemia plasmática no diabetes experimental induzido por STZ.

Apesar de utilizar protocolos de exercício diferentes, outros estudos observaram também que os níveis plasmáticos de glicose não foram alterados em animais diabéticos exercitados (Loganathan et al. 2007; Bidasee et al., 2008; Howarth et al., 2008, Howarth et al., 2009; Shao et al. 2009).

5.1.2. Massa corporal

A Figura 7 mostra os dados da massa corporal dos animais dos grupos CN, CNE, DS e DE ao longo do período experimental. A cronologia desta figura é a mesma da figura 6. Observa-se que a massa corporal aumentou progressivamente, de forma mais acentuada, nos animais dos grupos CN e CNE a partir da primeira semana até o final do experimento. Todavia, a partir da semana 8 após o início do programa de natação, o aumento da massa corporal no grupo CNE foi menor que no CN. Nos animais que receberam aplicação de STZ (DS e DE) a massa corporal aumentou, de forma menos acentuada, com pequenas alterações até o final do período experimental. A massa corporal dos animais diabéticos foi inferior aos controles não diabéticos ao longo do período experimental.

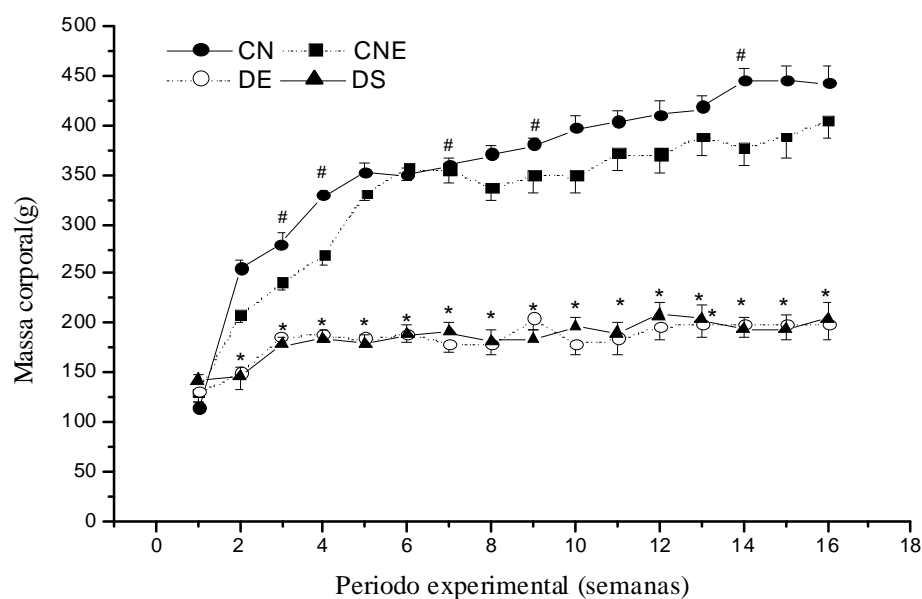


Figura 7. Massa corporal dos animais dos grupos experimentais ao longo das semanas de experimento. DS, diabéticos sedentários; DE diabéticos exercitados; CN, controle não-diabético; CNE controle não diabético exercitado. Os dados são expressos em média \pm EPM. *, DS e DE diferente de CN e CNE, $p < 0,001$, # CN diferente de CNE, $p < 0,05$.

Os dados da massa corporal e comprimento da tíbia dos animais nos seus respectivos grupos experimentais estão apresentados na Tabela 2. Antes da aplicação de STZ (Semana 1) os animais apresentaram massa corporal semelhante ao CN sendo que 45 dias após a aplicação de STZ (Semana 7), momento em que os grupos DE e CNE iniciaram o programa de natação a massa dos animais dos grupos DS e DE foi inferior aos controles CN e CNE. Ao final do experimento (Semanas 15 e 16), no momento do sacrifício, os grupos DS e DE apresentaram menor massa e menor comprimento da tíbia quando comparados a CN e CNE. Apesar de o grupo CNE apresentar massa corporal média inferior à CN, a diferença não atingiu significância estatística. Da mesma forma, o programa de natação não alterou esses parâmetros dos animais do grupo DE, quando comparados à DS e nem CNE comparado à CN.

Tabela 2. Massa corporal e comprimento da tíbia dos animais nos grupos experimentais.

Grupos	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal após 45 dias de indução (g)	Massa corporal final (g)	Comprimento da tíbia final (cm)
CN (N=10)	83,51±1,9	353,93±11,3*	443,50 ± 18,1*	4,17±0,11*
CNE (N=6)	82,72±1,8	352,12±11,3*	410,81 ± 25,7*	4,33±0,06*
DS (N=10)	87,80±2,0	193,72±11,9	198,82 ± 18,1	3,71±0,07
DE (N= 13)	82,71±1,8	186,91±10,7	204,25±18,1	3,50±0,25

Os dados são expressos em média± EPM. N, número de animais; DS, diabéticos sedentários; DE diabéticos exercitados; CN, controle não-diabético; CNE controle não diabético exercitado*, diferente de DS e DE na mesma coluna. p<0, 001.

Os dados do consumo de ração, ganho de massa corporal e coeficiente de eficiência alimentar (CEA) estão apresentados na tabela 3. Observa-se que o consumo de ração foi maior em CNE, DE e DS, comparados à CN. Da mesma forma, nos animais diabéticos, aqueles do grupo DE apresentaram maior consumo de ração

quando comparados aos do DS. No que se refere ao ganho de massa e ao coeficiente de eficiência alimentar, os animais do grupo CN apresentaram maior ganho de massa corporal quando comparados aos demais grupos experimentais, sendo que nos animais diabéticos ou não diabéticos esses parâmetros não sofreram alterações após o PN.

Tabela 3. Consumo de ração, ganho de massa e coeficiente de eficiência alimentar nos grupos experimentais.

Grupos	Consumo de ração (g/semana)	Ganho de massa corporal (g/semana)	Coeficiente de eficiência alimentar (%)
CN (N=10)	153,10±5,1*	24,07±3,5**	0,20±0,03**
CNE (N=6)	235,61±3,7*	21,96±4,9	0,09±0,02*
DS (N=10)	191,52±3,7*	7,10±3,3	0,03±0,16
DE (N= 13)	221,42±3,4**	6,28±3,5	0,05±0,01

Os dados são expressos em média± EPM. N, número de animais; DS, diabéticos sedentários; DE diabéticos exercitados; CN, controle não-diabético; CNE controle não diabético exercitado*, diferente de CN na mesma coluna. **, diferente de DS na mesma coluna. p<0,001.

A menor massa corporal final e menor comprimento da tíbia em animais diabéticos mostram que estes animais tiveram o crescimento prejudicado. Sabe-se que a insulina é um importante hormônio anabólico e sua deficiência poderia afetar ainda a quantidade de outros hormônios como hormônio de crescimento (GH), o que poderia inibir o crescimento de animais com diabetes (Gomes et al. 2009). A distribuição da insulina e de outros hormônios produzidos pelas células pancreáticas, como glucagon e polipeptídio pancreático, estava alterada em ratos após indução de diabetes tipo I (De Almeida et al.,2009; Howarth et al.,2009). Em estudo semelhante, Pesce et al. (1994) mostraram que o DM tipo 1 induzido por STZ, por 5 a 9 dias, reduziu as concentrações séricas de GH, que foram restauradas após a administração de insulina. Isto demonstra a importância da insulina na secreção de GH. Paralelamente, Menon et al. (1994) verificaram que animais com DM tipo 1 induzido por STZ apresentavam anormalidades na secreção de GH e na regulação tecido-específica de receptores para esse hormônio. Esses autores mostraram que na presença desse tipo de diabetes, os níveis de receptores de GH e de RNAm para

proteína carreadora de GH estavam reduzidas no coração e fígado e aumentados no rim. Em vista desses resultados, Menon et al. (1994) sugerem que a redução dos receptores de GH no tecido hepático, por exemplo, pode explicar a resistência celular a GH em termos de geração de IGF-1 e conseqüente redução do crescimento linear, prejudicado em animais DM tipo 1. Essas alterações podem justificar menor massa corporal, menor comprimento da tíbia e reduzida relação massa corporal/comprimento da tíbia nos animais de DS e DE.

Outro fator a ser considerado é que o DM produz um estado catabólico por aumentar a utilização de ácidos graxos, além de acelerar o catabolismo protéico (Howarth et al. 2008).

Por fim, o CEA foi menor nos animais diabéticos, apesar de apresentarem maior consumo de ração quando comparados à CN, os animais diabéticos apresentaram massa corporal significativamente menor. Isto significa que o diabetes reduziu a eficiência no aproveitamento dos componentes da dieta responsáveis por processos relacionados ao crescimento celular e tecidual (síntese protéica, por exemplo), contribuindo para o pequeno ganho de massa de DS e DE.

Em relação ao PN, os dados indicam que o protocolo de natação aplicado não foi capaz de alterar significativamente a massa corporal final dos animais diabéticos e não diabéticos. Sabe-se que a redução de massa corporal pode refletir aumento da taxa de metabolismo ou gasto energético (Brooks & Fahey, 1984) e que exercícios tais como natação e corrida podem reduzir a massa corporal de ratos (Chang et al., 2001; Huang et al., 2003; Asami et al., 1998, Noble et al., 1999). Assim, parece que a carga (duração e intensidade das sessões) imposta aos animais pelo PN não foi suficiente para promover alterações na massa corporal.

5.1.3. Massa ventricular

Os animais diabéticos sedentários apresentaram menor massa ventricular quando comparados aos não diabéticos sedentários (DS vs CN, Tabela 4). A menor massa ventricular dos animais DS reflete a menor massa corporal destes animais comparados aos CN.

Conforme mencionado anteriormente, a redução nas concentrações de GH e altas concentrações de glicose podem inibir o crescimento dos miócitos cardíacos e reduzir a formação de novas miofibrilas no miocárdio diabético (Gomes et al., 2009; Dyntar et al., 2006). Contudo, vale lembrar que algumas evidências indicam que os efeitos benéficos do exercício físico sobre o crescimento dos cardiomiócitos são

consistentes com a estimulação por hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). O GH aumenta a secreção localizada de IGF em órgãos alvos e os cardiomiócitos apresentam receptores para ambos, GH e IGF, e respondem a estimulação por esses hormônios. IGF por exemplo, pode agir como um hormônio parácrino dentro do miocárdio (Copeland, et al., 2002). Assim, a menor massa ventricular pode ser explicada, em parte, pela redução das concentrações de GH em animais com diabetes, como mostrado por Gomes et al. (2009).

O programa de natação aplicado não alterou a massa dos ventrículos em animais diabéticos (DS vs DE). Diferente desse achado, nos animais não diabéticos, a massa dos ventrículos foi superior em animais exercitados quando comparados aos sedentários (CNE vs CN) (Tabela 4).

Tabela 4. Massa corporal e massa dos ventrículos dos animais nos grupos experimentais.

Grupos	Massa corporal final (g)	Massa dos ventrículos (mg)	Massa relativa dos ventrículos (mg/g)
CN (N=10)	443,50 ± 18,1*	1590,00 ± 0,08**	3,59 ± 0,4
CNE (N=6)	410,81 ± 25,7*	1930,00 ± 0,11#	4,72 ± 0,6#
DS (N=10)	198,82 ± 18,1	1120,00 ± 0,08	5,98 ± 0,4‡ #
DE (N= 13)	204,25 ± 18,1	1330,00 ± 0,08	7,97 ± 0,4‡**

Os dados são expressos em média± EPM. N, número de animais; DS, diabéticos sedentários; DE diabéticos exercitados; CN, controle não-diabético; CNE controle não diabético exercitado. *, diferente de DS e DE na mesma coluna; **, diferente de DS na mesma coluna; # diferente de CN na mesma coluna; ‡, diferente de CN e CNE na mesma coluna; p<0,05.

Os resultados da massa relativa dos ventrículos (Tabela 4), índice usado de hipertrofia ventricular, mostraram que os animais do grupo DS apresentaram maior massa relativa dos ventrículos quando comparados aos do grupo CN. Isso evidencia hipertrofia patológica induzida pelo diabetes.

Entre os animais diabéticos, os DE apresentaram massa relativa dos ventrículos maior que os DS. Isso indica hipertrofia ventricular induzida pelo programa de natação nestes animais. É importante salientar que a massa corporal dos

animais DE não é menor que o dos DS. O aumento da massa ventricular ocorre pelo aumento da síntese de proteínas, seja pela adição de novos sarcômeros em série (no comprimento) ou em paralelo (na largura) nos elementos contráteis dos miócitos, ou pela combinação das duas (Moore & Volker, 2005). Alterações na matriz extracelular também podem afetar a massa ventricular. Sabe-se que o diabetes reduz a densidade capilar, aumenta a deposição de tecido colágeno (Warley, Powell & Skepper, 1995) e que o exercício pode reduzir essas alterações (Shehadeh and Regan, 1995). O padrão de hipertrofia ventricular depende das características do estímulo mecânico e da carga humoral imposta ao miocárdio. Neste caso, parece que os estímulos advindos do diabetes (hipertrofia cardíaca patológica de estímulo metabólico) com os impostos pelo PN (hipertrofia fisiológica devido à sobrecarga volumétrica) foram superpostos.

Essa adaptação em corações de animais diabéticos pode contribuir para melhora da função cardíaca desses animais através de aumentos na fração de encurtamento, volume de ejeção, débito cardíaco e, conseqüentemente, melhora na capacidade aeróbica via aumento do consumo máximo de oxigênio (Loganathan et al., 2007; Rodrigues et al., 2007; Shao et al., 2009).

Em animais não diabéticos o aumento da massa relativa dos ventrículos sugere aumento da massa ventricular esquerda em resposta ao PN. Apesar de não apresentarem aumento do comprimento, largura e volume dos cardiomiócitos, o aumento da massa relativa dos ventrículos pode ter ocorrido pelo aumento no número de capilares por fibra muscular nas paredes do ventrículo esquerdo em resposta ao PN (Rakusan & Wicker, 1990; Kemi et al., 2005; Marini et al., 2008).

5.2. Propriedades morfológicas dos cardiomiócitos

Após análise dos dados de morfologia considerando os fatores exercício, diabetes e região, observou-se que não houve diferença estatística entre os valores das regiões EPI e ENDO. Desta forma, os dados destas regiões foram colocados juntos e analisados como dados de miócitos isolados do ventrículo esquerdo como um todo.

Os resultados da morfologia celular estão apresentados na Tabela 5. O diabetes reduziu significativamente o comprimento dos miócitos cardíacos nos animais sedentários (DS vs CN) e treinados (DE vs CNE). Todavia, o PN aplicado

não foi capaz de aumentar significativamente o comprimento dos miócitos cardíacos nos animais diabéticos (DE vs DS) e nos não diabéticos (CN vs CNE).

Tabela 5. Comprimento, largura e volume de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos grupos experimentais.

Grupos	Comprimento celular (μm)	Largura celular (μm)	Volume celular (pL)	Relação comprimento/largura
CN (N=10)	157,32 \pm 1,6*	22,38 \pm 0,41*	26,73 \pm 0,55*	7,48 \pm 0,19
CNE (N=6)	159,77 \pm 1,8 [#]	22,97 \pm 0,44 [#]	27,65 \pm 0,65 [#]	7,25 \pm 0,19
DS (N=10)	150,49 \pm 1,5	19,48 \pm 0,4	22,19 \pm 0,5	7,51 \pm 0,15
DE (N= 13)	151,29 \pm 1,5	20,74 \pm 0,4*	24,00 \pm 0,5*	7,91 \pm 0,15

Os dados são expressos em média \pm EPM. N, número de animais; DS, diabéticos sedentários (256 células); DE diabéticos exercitados (233 células); CN, controle não-diabético (190 células); CNE controle não diabético exercitado (149 células). *, diferente de DS na mesma coluna; # diferente de DS e DE na mesma coluna; p<0,05.

Em relação à largura celular, observa-se que o diabetes reduziu a largura dos miócitos nos animais sedentários (DS vs CN) e treinados (DE vs CNE). Todavia, o PN aplicado aumentou significativamente a largura dos cardiomiócitos nos animais diabéticos (DE vs DS). Isso não ocorreu nos animais não diabéticos (CNE vs CN).

Houve redução significativa do volume celular no grupo DS comparado ao grupo CN, o que reflete o efeito do diabetes. O programa de natação aplicado aumentou significativamente o volume celular nos animais diabéticos (DE vs DS), mas não nos animais não diabéticos (CNE vs CN).

Observa-se também que a razão comprimento/largura dos cardiomiócitos não foi afetada pelo diabetes ou pelo programa de natação.

De acordo com Dyntar et al., 2001; Dyntar et al., 2006, a redução nas dimensões dos miócitos cardíacos de animais diabéticos é decorrente de altas concentrações de glicose que levam ao desenvolvimento de disfunções celulares como redução do contato entre os miócitos, inibição da formação miofibrilar e diminuição na expressão de miosina de cadeia pesada e actina cardíacas. Porém, deve-se considerar que os animais não diabéticos eram maiores que os animais diabéticos, por isso apresentaram cardiomiócitos com dimensões maiores. Estes

dados são coerentes com as maiores massas ventriculares apresentadas pelos animais não diabéticos. Conforme discutido anteriormente, os cardiomiócitos de animais diabéticos apresentam redução do número de receptores para GH (Menon et al. 1994), o que pode contribuir para o menor tamanho dos miócitos cardíacos em DS e DE, como sugere Kawaguchi et al.(1997).

O programa de natação, por outro lado, promoveu aumento na largura e no volume dos miócitos cardíacos dos ratos diabéticos. Isso sugere que a inibição do crescimento celular provocada pelo DM foi atenuada pelo exercício físico aplicado. O aumento na largura celular sugere formação de novos sarcômeros em paralelo que resulta em aumento da espessura da parede ventricular (Mooren & Volker, 2005).

O aumento do volume dos miócitos cardíacos nos animais diabéticos em resposta ao exercício também denota hipertrofia celular. Esta resposta reflete a hipertrofia ventricular induzida pelo exercício nestes animais. O exercício aeróbio implica em sobrecarga volumétrica ao miocárdio (Diffie, 2004). Isso resultaria em aumento, principalmente no comprimento dos miócitos, mantendo a mesma relação do volume mitocondrial com o volume celular. Todavia, em animais diabéticos o coração sofre sobrecarga pressórica (Fang et al., 2004). Uma sobrecarga de pressão induz aumento do volume dos miócitos, sem alterar o comprimento. Há também o aumento da densidade mitocondrial, mas sem alteração no volume celular (Searls et al., 2004). Essas adaptações a diferentes sobrecargas ocorrem para reduzir o estresse nas paredes do miocárdio (Atchley et al., 2007).

Considerando que o PN não promoveu aumento nas dimensões dos cardiomiócitos dos animais não diabéticos, parece que o aumento das dimensões celulares observada nos animais diabéticos exercitados foi uma adaptação ao diabetes e ao exercício conjuntamente. De fato, o aumento da massa relativa do ventrículo nos animais do grupo DE foi mais pronunciado que nos animais CNE (33,3% vs 31,5%, respectivamente).

O aumento na largura dos miócitos, sem aumento no comprimento, é um indicativo de hipertrofia concêntrica, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Mooren & Volker, 2005). Entretanto, a relação do comprimento com a largura dos miócitos, no presente estudo, não foi alterada nos animais diabéticos e não diabéticos. Isto sugere que a hipertrofia ventricular em resposta ao programa de natação aplicado não caracterizou hipertrofia concêntrica ou excêntrica nos animais. Porém, uma limitação deste estudo foi não ter medido o diâmetro da cavidade

ventricular e a espessura da parede ventricular (histomorfometria ou ecocardiografia), o que auxiliaria no esclarecimento deste ponto.

A hipertrofia celular induzida por exercício tem implicação direta no nível de força desenvolvida por cardiomiócitos (Natali et al., 2002) que, por sua vez, tem implicação na função ventricular. Bidasee et al.(2008) demonstraram melhoras na contratilidade cardíaca *in vivo* em animais diabéticos exercitados. No presente estudo, os animais DE apresentaram maior amplitude de contração.

5.3. Propriedades mecânicas

A frequência cardíaca de ratos, em repouso, é aproximadamente 300 bpm (5 Hz), porém, raramente miócitos cardíacos isolados respondem a esta frequência de estimulação em temperatura ambiente. Por isso, optou-se por usar as frequências de estimulação de 1 e 3 Hz, uma vez que com os equipamentos existentes no laboratório do DES-UFV é possível trabalhar apenas em temperatura ambiente.

Além disso, optou-se por investigar apenas os miócitos que apresentaram uma relação positiva entre frequência de estimulação e amplitude de contração. Alguns miócitos ventriculares de ratos podem apresentar esta relação negativa (Natali et al., 2001), fato que pode mascarar os resultados. A relação positiva entre frequência de estimulação e amplitude de contração resulta de movimento iônico através do sarcolema que aumenta a disponibilidade de íons Ca^{2+} no interior dos miócitos cardíaco e conseqüente ativação de miofilamentos. A hipótese de que existe uma relação linear entre o pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sistólico e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólico seguidos de um aumento na frequência de estimulação indica que o aumento de Ca^{2+} , assim como o aumento na frequência de estimulação, resulta em maior influxo de Ca^{2+} via corrente de cálcio tipo L (I_{CaL}) por unidade de tempo. Um aumento na frequência de potenciais de ação também causa aumento do influxo de Na^+ por unidade de tempo. Como conseqüência, a entrada de Ca^{2+} via trocador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ é favorecida, enquanto a saída de Ca^{2+} é menos favorecida. Esse evento aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e estimula liberação de Ca^{2+} pelo RS, resultando em maior amplitude de contração (Langer, 1987; Lewartowski & Pytkowski, 1987; Layland & Kentsuh, 1999; Bers, 1993; Cook et al. 1997, Bers, 1993; Natali, 2000).

Após análise dos dados de contratilidade, considerando os fatores exercício, diabetes e região, observou-se que não houve diferença estatística entre os valores das regiões EPI e ENDO. Desta forma, os dados destas regiões foram colocados

juntos e analisados como dados de miócitos isolados do ventrículo esquerdo como um todo.

5.3.1. Amplitude de contração celular

A Figura 8 mostra a amplitude de contração (% de encurtamento celular) de cardiomiócitos dos grupos CN, CNE, DS e DE estimulados na frequência de 1 e 3 Hz. Verificou-se que em estimulação na frequência de 1Hz (Figura 8 A), o diabetes não afetou a amplitude de contração dos cardiomiócitos (DS, $8,6 \pm 0,1$ % vs CN, $8,8 \pm 0,2$ %, respectivamente, $p=0,494$). Entretanto, o programa de natação aplicado aumentou a amplitude de contração nesses animais (DS, $8,6 \pm 0,1$ % vs DE, $9,5 \pm 0,1$ %, respectivamente, $p<0,001$). Nos animais não diabéticos, da mesma forma, o programa de natação aumentou a amplitude de contração dos miócitos (CN, $8,8 \pm 0,2$ % vs CNE, $9,4 \pm 0,2$ %, respectivamente, $p=0,045$).

Todavia, quando estimulados a 3 Hz (figura 8 B), a amplitude de contração foi reduzida pelo diabetes (CN, $11,0 \pm 0,2\%$ μm vs DS, $10,2 \pm 0,2\%$ μm ., respectivamente, $p<0,001$). Entretanto, o programa de natação aumentou a amplitude de contração dos cardiomiócitos nestes animais (DS, $10,2 \pm 0,2$ % vs DE, $11,6 \pm 0,2\%$, respectivamente, $p<0,001$). Entre os animais não diabéticos, da mesma forma, o programa de natação aumentou a amplitude de contração celular (CN, $11,0 \pm 0,2$ % vs CNE, $12,4 \pm 0,2$ %, respectivamente, $p<0,001$).

Esses resultados mostram que 105 dias de diabetes foram suficientes para reduzir a amplitude de contração dos miócitos cardíacos quando estimulados em frequência próxima à fisiológica (3Hz), em temperatura ambiente. Esta redução da amplitude de contração reflete alterações importantes, tais como redução na fração de encurtamento, no diâmetro diastólico final, no diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo e no débito cardíaco em corações de ratos diabéticos *in vivo* (Shao, et al., 2009). Caracteristicamente, corações com cardiomiopatia diabética apresentam menor volume diastólico final, volume de ejeção, fração de ejeção, débito cardíaco e maior volume sistólico final (Loganathan, et al., 2007), alterações estas observadas tanto em modelos experimentais de DM quanto em seres humanos. Ressalta-se que Howarth et al.(2008) verificaram que dois meses de diabetes não foram suficientes para alterar a amplitude de contração de miócitos cardíacos diabéticos estimulados a 1Hz.

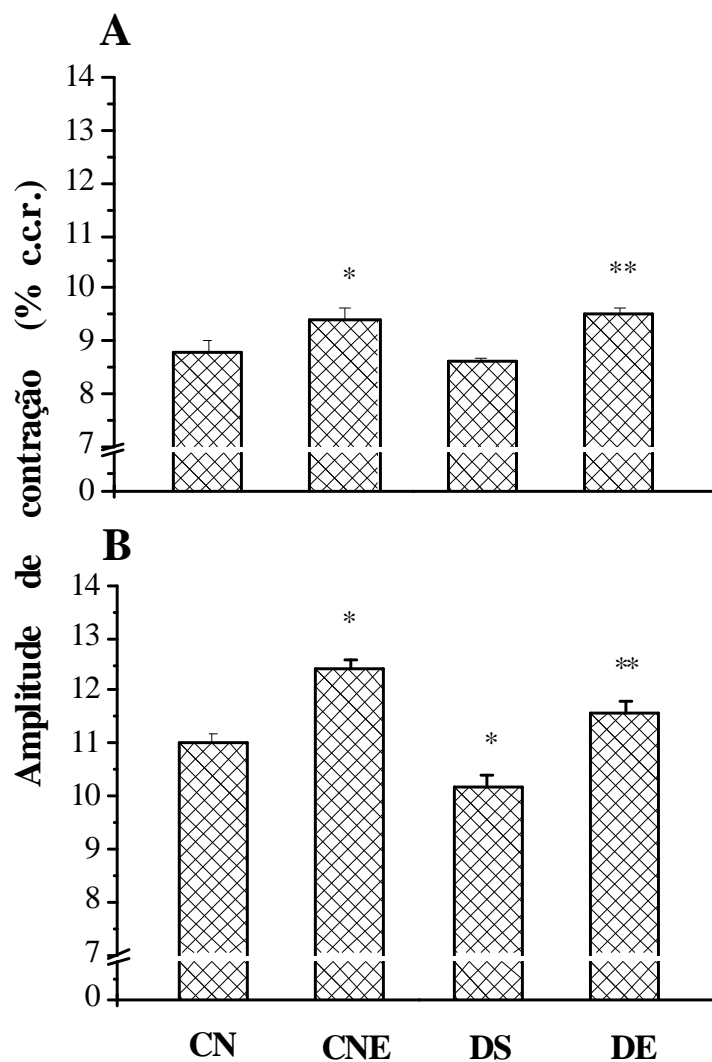


Figura 8. Amplitude de contração de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1 Hz (A) e 3 Hz (B) em temperatura ambiente. Controle não diabético (CN) (de 106 a 227 células); controle não diabético exercitado (CNE) (78 a 173 células); diabético sedentário (DS) (de 109 a 316 células); e diabético exercitado (DE) (de 153 a 354 células). Dados são expressos em média \pm erro padrão da média. *, diferente de CN. **, diferente de DS ($p < 0,05$).

Alguns mecanismos são responsáveis pela redução da amplitude de contração do cardiomiócito. Um deles é a redução da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} (Bers & Weber, 2002, Bers, 2002; Fang et al., 2004; Moore & Volker, 2005; Howarth et al. 2008), fenômeno que pode ser afetado por diferentes

fatores, tais como diminuição da temperatura, acidose e altas concentrações de fosfato. Entretanto, cardiomiócitos de ratos Goto-Kakizaki com DM tipo 1 apresentaram aumento da amplitude de contração associada a uma redução na amplitude do transiente de Ca^{2+} . Isto sugere que a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} estava aumentada, o que poderia ser um mecanismo compensatório para preservar a função mecânica do coração no DM (Howarth & Qureshi, 2008).

Outro possível mecanismo é a redução da $[\text{Ca}]_i$. Estudos mostraram que a $[\text{Ca}]_i$ apresenta-se reduzida em cardiomiócitos de animais com diabetes experimental (Lagadic-Gossmann et al., 1996; Ren & Bode, 2000). Essa alteração da $[\text{Ca}]_i$ pode ser explicada principalmente pela diminuição da taxa de armazenamento de Ca^{2+} pelo RS e redução na liberação de cálcio pelo RS. Em cardiomiócitos de animais com diabetes experimental, o armazenamento de cálcio do RS estava reduzido em função do aumento da atividade do NCX e da diminuição da recaptção de Ca^{2+} pelo RS via SERCA2 (Stolen et al., 2009). Há evidências que a liberação de Ca^{2+} do RS via RyR2, está alterada nos cardiomiócitos de animais diabéticos, pois os RyR2 sofrem redução da expressão e/ou função na presença de DM (Bidasee et al. 2001, 2003, 2008). Além disso, uma redução na densidade de túbulos transversos destes miócitos pode alterar o espaço entre os canais de cálcio tipo L e os RyR2, que se tornam menos eficientes durante o acoplamento excitação-contração (Stolen et al., 2009). Em consequência, pode ocorrer redução na amplitude de contração.

O programa de natação empregado no presente estudo aumentou a amplitude de contração dos miócitos de animais diabéticos e não diabéticos. Para os animais diabéticos, isso indica que o exercício promoveu adaptações positivas nos cardiomiócitos de maneira a atenuar ou recuperar algumas anormalidades mecânicas. Isto tem impacto importante no ventrículo esquerdo desses animais. Por exemplo, corações de ratos diabéticos exercitados apresentam melhoras na contratilidade cardíaca, especificamente com aumento, *in vivo*, no débito cardíaco, na fração de encurtamento e no diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo, assim como redução no diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo, *in vivo* (Loganathan et al., 2007; Bidasee et al., 2008; Shao et al., 2009;). Os achados do presente estudo, em cardiomiócitos isolados, auxiliam na explicação da melhora da função cardíaca observada em animais com diabetes experimental após um programa de exercício.

Em miócitos cardíacos isolados de animais não diabéticos, alguns mecanismos têm sido propostos como responsáveis pelo aumento da amplitude de

contração em resposta ao exercício físico regular, a saber: aumento na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e hipertrofia do aparato contrátil dos cardiomiócitos (Diffie, 2004; Kemi 2007; Kemi et al., 2008; Wisloff et al., 2009).

Em cardiomiócitos de animais diabéticos, apesar de alguns resultados em contrário (Howarth et al., 2008; Howarth et al., 2009), há evidências que o exercício físico regular promove aumento na amplitude de contração (Stolen et al., 2009; Shao et al; 2009). Estes autores justificaram o aumento da amplitude em função da normalização da função do NCX, da CaMKII e da redução do vazamento de Ca^{2+} do RS e aumento do conteúdo de Ca^{2+} do RS. Estas adaptações promovem o aumento do inotropismo dos cardiomiócitos após o treinamento físico.

5.3.2. Tempo de contração celular

5.3.2.1. Tempo para o pico de contração

A Figura 9 A mostra que os miócitos dos animais diabéticos sedentários apresentaram tempo para o pico de contração superior ao dos animais não diabéticos sedentários (DS, $500,0 \pm 5,9$ ms vs CN $417,0 \pm 7,0$ ms, respectivamente, $p < 0,001$), quando estimulados a 1 Hz. Entretanto, o programa de natação foi capaz de reduzir significativamente o tempo para o pico de contração nos animais diabéticos (DS, $500,0 \pm 5,9$ ms vs DE, $477,0 \pm 5,6$ ms, respectivamente, $p = 0,005$). Porém, em animais não diabéticos, o programa de natação aplicado não alterou significativamente o tempo para o pico de contração (CN, $417,0 \pm 7,0$ ms vs CNE, $402,0 \pm 8,0$ ms, $p = 0,157$).

Quando estimulados a 3 Hz (figura 9 B), os miócitos cardíacos dos animais do grupo DS apresentaram tempo para o pico de contração mais longo, quando comparados aos do grupo CN ($361 \pm 5,7$ ms vs $319,0 \pm 5,8$ ms, respectivamente, $p < 0,001$). O programa de natação foi capaz de reduzir significativamente o tempo para o pico de contração nos animais diabéticos (DS, $361 \pm 5,7$ ms vs DE, $333,0 \pm 4,8$ ms, $p < 0,001$). Nos animais não diabéticos, da mesma forma, esse programa reduziu o tempo para o pico de contração dos miócitos (CNE, $289,0 \pm 6,8$ ms vs CN, $319,0 \pm 5,8$ ms, $p < 0,001$).

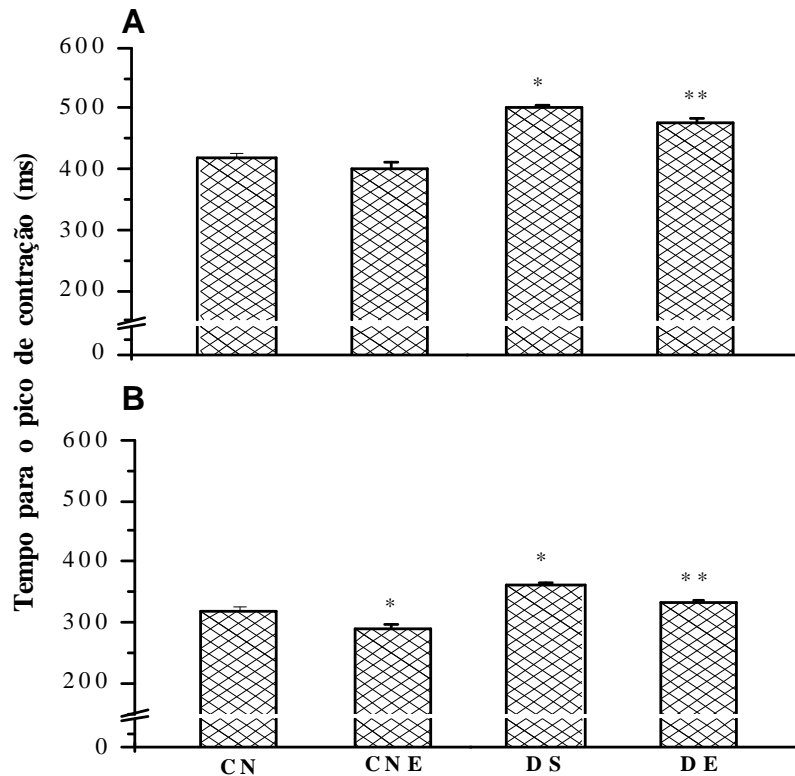


Figura 9. Tempo para o pico de contração de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1Hz (A) e 3Hz (B). Controle não diabético (CN) (de 106 a 227células); controle não diabético exercitado (CNE) (78 a 173células); diabético sedentário (DS) (de 109 a 316 células); e diabético exercitado (DE) (de 153 a 354 células). Dados são expressos em média \pm erro padrão da média. *, diferente de CN. **, diferente de DS, $p < 0,05$.

5.3.2.2. Velocidade máxima de contração ($\mu\text{m/s}$)

Os dados de velocidade máxima de contração estão apresentados na Figura 10 reforçam aqueles da Figura 9. Quando estimulados a 1 Hz, os cardiomiócitos dos animais diabéticos sedentários apresentaram redução de aproximadamente 21,4% na velocidade máxima de contração, quando comparados a animais não diabéticos (DS, $44,3 \pm 1,3 \mu\text{m/s}$ vs CN, $56,3 \pm 1,5 \mu\text{m/s}$, $p < 0,001$). O programa de natação, por sua vez, aumentou em 13% a velocidade máxima de contração nos animais diabéticos (DE, $50,4 \pm 1,2 \mu\text{m/s}$ vs DS, $44,3 \pm 1,3 \mu\text{m/s}$, $p < 0,001$). Nos animais não diabéticos, da mesma forma, o programa de natação aumentou em 12% a velocidade máxima de contração (CNE, $63,3 \pm 1,8 \mu\text{m/s}$ vs CN, $56,3 \pm 1,5 \mu\text{m/s}$, $p = 0,004$).

Quando estimulados a 3 Hz (Figura 10 B), a velocidade máxima de contração foi significativamente reduzida nos animais diabéticos sedentários, comparados aos não diabéticos sedentários (DS, $62,3 \pm 2,4 \mu\text{m/s}$ vs CN, $88,3 \pm 2,5 \mu\text{m/s}$, $p < 0,001$). O programa de natação aumentou a velocidade máxima de contração nos cardiomiócitos dos animais diabéticos (DE, $73,2 \pm 2,0 \mu\text{m/s}$ vs DS, $62,3 \pm 2,4 \mu\text{m/s}$, $p < 0,001$). Nos animais não diabéticos, houve aumento significativo da velocidade máxima de contração nos cardiomiócitos dos animais do grupo CNE, comparado ao CN ($96,9 \pm 2,9 \mu\text{m/s}$ vs $88,3 \pm 2,5 \mu\text{m/s}$, respectivamente, $p = 0,045$).

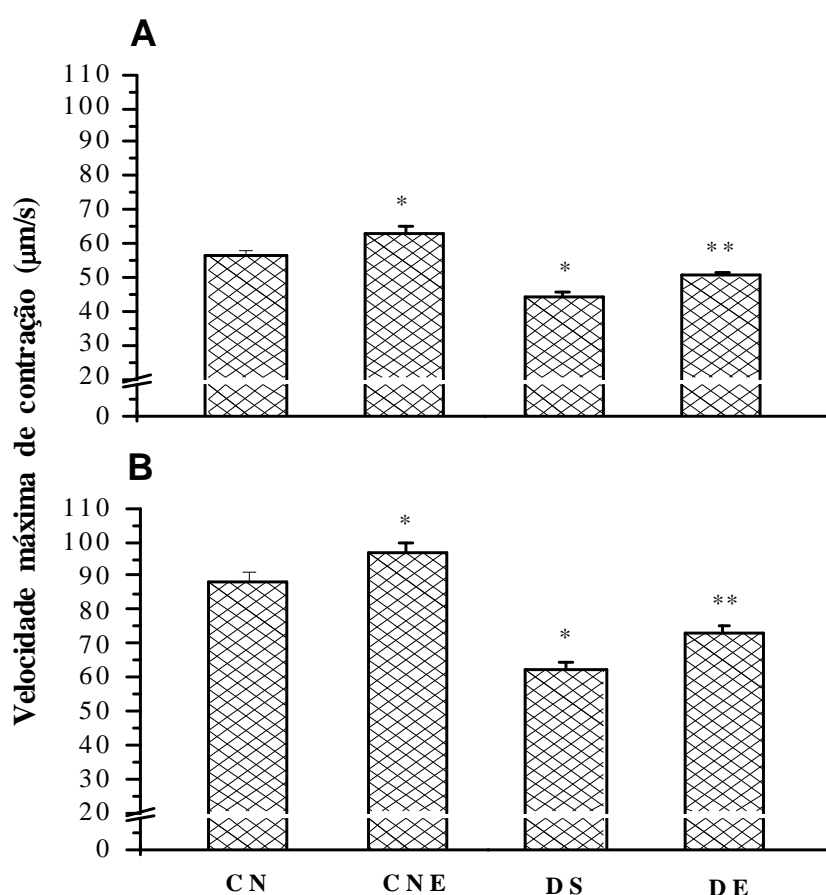


Figura 10. Velocidade máxima de contração de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1 Hz (A) e a 3Hz (B). Controle não diabético (CN) (de 106 a 227 células); controle não diabético exercitado (CNE) (78 a 173 células); diabético sedentário (DS) (de 109 a 316 células); e diabético exercitado (DE) (de 153 a 354 células). Dados são expressos em média \pm erro padrão da média. *, significativamente diferente de CN, $p < 0,05$. **, Significativamente diferente de DS, $p < 0,05$.

Estes dados mostram que o diabetes promoveu um prolongamento do tempo necessário para o pico de contração celular e reduziu a velocidade máxima de contração, indicando que cardiomiócitos de animais com diabetes se contraem mais lentamente que seus controles não diabéticos. Esta alteração tem implicações negativas na função cardíaca destes animais.

A velocidade de contração das células cardíacas é controlada pelas proteínas reguladoras da movimentação de Ca^{2+} intracelular e pela taxa de hidrólise de ATP que, por sua vez, regula a taxa de formação de pontes cruzadas (Diffie, 2004; Bers, 2002). Em função da redução da quantidade de substrato (glicose) para produção de energia (ATP) em cardiomiócitos de animais diabéticos, a oxidação de ácidos graxos aumenta, porém, a velocidade de produção de ATP por essa via é mais lenta (An & Rodrigues, 2006). Em consequência, o processo contrátil fica mais lento.

Em relação à regulação da movimentação de Ca^{2+} , sabe-se que cardiomiócitos de animais diabéticos apresentam redução na expressão de proteínas regulatórias da movimentação de Ca^{2+} (ex. RyR2, CaMKII, PLB, SERCA2 e NCX - Bidasee et al., 2001; Kim et al., 2001; Choi et al., 2002; Bidasee et al., 2003; Bidasee et al., 2004; Shao et al., 2009; Stolen et al., 2009), o que pode comprometer o acoplamento excitação contração. Além disso, há evidências que o DM reduz a funcionalidade (capacidade de vincular [3H] rianodina) e a expressão dos RyR2 (Bidasee et al. 2001, 2003, 2008) em apenas 4-6 semanas.

A redução na velocidade de contração em cardiomiócitos de animais com DM pode ser explicada, pelo menos em parte, pela redução da densidade de receptores RyR2 e /ou redução no número de receptores funcionais e pela diminuição da sensibilidade desses receptores e das proteínas contráteis aos íons Ca^{2+} . Essas alterações levam à dessincronização da liberação de Ca^{2+} e compromete o processo contrátil (Bidasee et al., 2001; Fang et al., 2004 Shao et al., 2009).

Nesse sentido, a estabilidade reduzida de RyR2 pode comprometer a liberação e o armazenamento de Ca^{2+} pelo RS num processo descrito por Stolen et al. (2009) como vazamento de Ca^{2+} . Esses autores sugerem que a disfunção de SERCA2, o aumento de NCX e a hiperfosforilação de CaMKII podem explicar o conteúdo reduzido de Ca^{2+} do RS. A hiperfosforilação de CaMKII, poderia alterar a função dos RyR2 e promover o vazamento de Ca^{2+} do RS. Além disso, o aumento da atividade de NCX compete com a SERCA2 pela remoção citoplasmática de Ca^{2+} diminuindo o conteúdo de Ca^{2+} armazenado pelo RS. Conseqüentemente, há uma

falta de sincronia entre liberação de Ca^{2+} do RS e acoplamento excitação-contração. Em outras palavras, a disponibilidade de Ca^{2+} para a contração celular é retardada.

Dessa forma, na presença de DM, as alterações nos RyR2 citadas anteriormente, podem explicar o prolongamento no tempo para o pico de contração e a velocidade máxima de contração mais lenta das células cardíacas nos animais de DS e DE, quando comparados aos controles CN e CNE.

Entretanto, após o programa de natação, houve redução no tempo para o pico de contração e aumento na velocidade máxima de contração dos cardiomiócitos, tanto em animais diabéticos como em não diabéticos, comparados aos seus controles sedentários. As adaptações ao exercício regular que aceleram a disponibilidade de Ca^{2+} no citosol e aumentam a taxa de hidrólise de ATP, contribuem para aumentar a velocidade da contração celular e reduzir o tempo para o pico de contração em cardiomiócitos.

A velocidade de disponibilidade de Ca^{2+} no citosol é regulada principalmente pela velocidade de saída de Ca^{2+} do RS. Em cardiomiócitos de animais diabéticos db/db a restauração da função contrátil em resposta ao treinamento físico se deve principalmente à restauração da sincronia na liberação de Ca^{2+} do RS, paralela à redução da fosforilação de CAMKII citosólica que é responsável pela fosforilação dos RyR2 (Stolen et al., 2009).

Há evidências que o exercício físico regular aumenta a expressão e ou atividade dos RyR2, a sensibilidade de RyR2 e dos miofilamentos aos íons Ca^{2+} em animais diabéticos e não diabéticos (Diffie et al., 2001; Wisloff et al., 2002; Diffie & Nagle, 2003; Diffie, 2004; Kemi et al., 2008; Shao et al., 2009). Todavia, o exercício regular não altera o influxo Ca^{2+} através da membrana celular, via canais Ca^{2+} de tipo L, principal responsável pela ativação dos RyR2.

Além disso, o exercício físico é capaz de aumentar a densidade e responsividade dos receptores β -adrenérgicos (Bidasee et al., 2008), que podem afetar a velocidade de contração celular.

Coletivamente, essas adaptações resultam em melhora nas propriedades contráteis dos cardiomiócitos em resposta ao exercício e aumento na capacidade contrátil do miocárdio e, conseqüentemente, em aumento do volume de ejeção e débito cardíaco destes animais.

5.3.3. Tempo de relaxamento celular

5.3.3.1. Tempo para 50% de relaxamento

A Figura 11A mostra que os cardiomiócitos dos animais diabéticos, quando estimulados a 1 Hz, exibiram um aumento significativo no tempo para 50% do relaxamento (DS, $781,0 \pm 11,4$ ms vs CN, $708,0 \pm 13,4$ ms, $p < 0,001$). O programa de natação reduziu o tempo para 50% do relaxamento nos animais diabéticos (DE, $737,0 \pm 10,8$ ms vs DS, $781,0 \pm 11,4$ ms, $p = 0,005$). Nos animais não diabéticos, da mesma forma, o programa de natação reduziu o tempo para 50% do relaxamento (CN, $708,0 \pm 13,4$ ms vs CNE, $646,0 \pm 15,5$ ms, respectivamente, $p = 0,002$).

Quando estimulados a 3 Hz (Figura 11 B), verificou-se que o tempo para 50% do relaxamento estava significativamente aumentado nos cardiomiócitos dos animais diabéticos (DS, $756 \pm 22,1$ ms vs CN, $619,0 \pm 22,2$ ms, respectivamente, $p < 0,001$). O programa de natação reduziu o tempo para 50% do relaxamento nos cardiomiócitos destes animais (DS, $756 \pm 22,1$ ms vs DE, $698 \pm 18,6$ ms $p = 0,044$). O mesmo ocorreu nos cardiomiócitos dos animais não diabéticos (CNE, $516,0 \pm 26,1$ ms vs CN, $619,0 \pm 22,2$ ms, $p = 0,003$).

5.3.3.2. Velocidade máxima de relaxamento

Os dados relativos à velocidade máxima de relaxamento celular estão apresentados na Figura 12 e complementam aqueles apresentados na figura 11. Quando estimulados a 1 Hz (Figura 12 A), a velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos não foi alterada pelo diabetes (CN, $44,5 \pm 1,7$ $\mu\text{m/s}$ vs $42,5 \pm 1,4$ $\mu\text{m/s}$, $p = 0,386$). Entretanto, o programa de natação aplicado aumentou, em aproximadamente 11%, a máxima velocidade de relaxamento dos cardiomiócitos nos animais diabéticos (DE, $47,4 \pm 1,3$ $\mu\text{m/s}$ vs DS, $42,5 \pm 1,4$ $\mu\text{m/s}$, $p = 0,015$). Nos animais não diabéticos, da mesma forma, o programa de natação aumentou, em aproximadamente 15% a velocidade máxima de relaxamento (CN, $44,5 \pm 1,7$ $\mu\text{m/s}$ vs CNE, $51,5 \pm 2,0$ $\mu\text{m/s}$, $p = 0,008$).

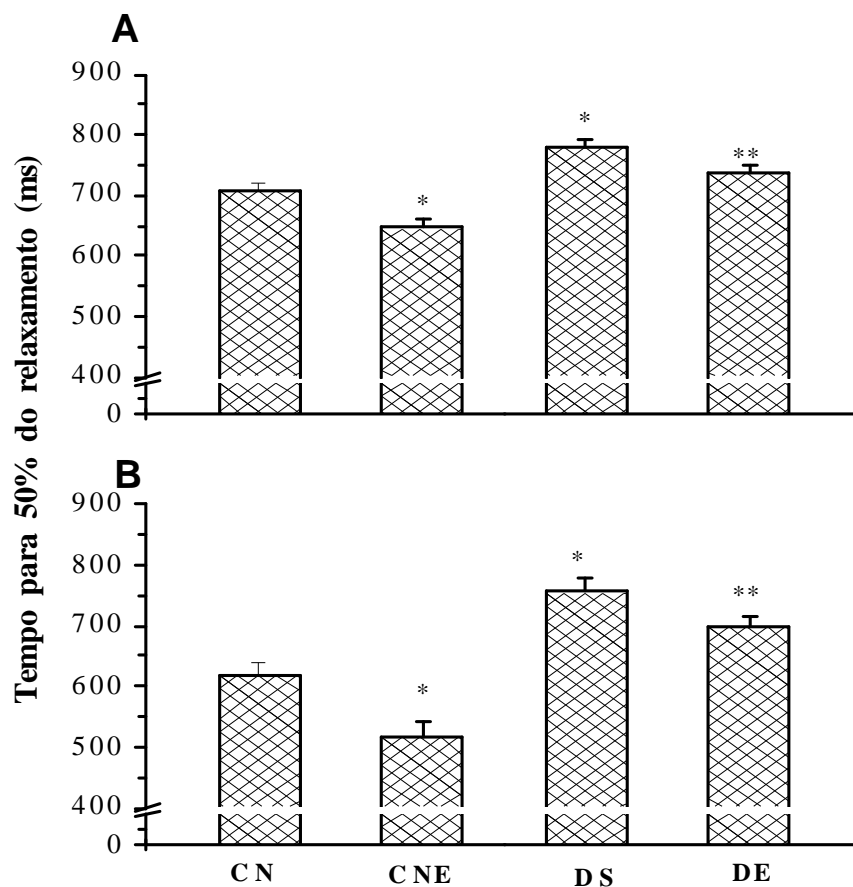


Figura 11. Tempo para 50% do relaxamento de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1Hz (A) e 3Hz (B). Controle não diabético (CN) (de 106 a 227 células); controle não diabético exercitado (CNE) (78 a 173 células); diabético sedentário (DS) (de 109 a 316 células); e diabético exercitado (DE) (de 153 a 354 células). Dados são expressos em média \pm erro padrão da média. *, significativamente diferente de CN, $p < 0,05$. **, Significativamente diferente de DS, $p < 0,05$.

Na frequência de 3 Hz (Figura 12 B), é possível observar que os cardiomiócitos dos animais diabéticos sedentários apresentaram menor velocidade máxima de relaxamento que os controles não diabéticos (DS, $63,0 \pm 2,7 \mu\text{m/s}$ vs CN, $78,0 \pm 2,7 \mu\text{m/s}$ $p < 0,001$). O programa de natação aumentou a velocidade máxima de relaxamento nos animais diabéticos (DS, $63,0 \pm 2,7 \mu\text{m/s}$ vs DE, $71,0 \pm 2,0 \mu\text{m/s}$, $p = 0,020$). Paralelamente, nos animais não diabéticos, o programa de natação aumentou significativamente a velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos (CN, $78,0 \pm 2,7 \mu\text{m/s}$ vs CNE, $88,0 \pm 3,0 \mu\text{m/s}$, $p = 0,014$).

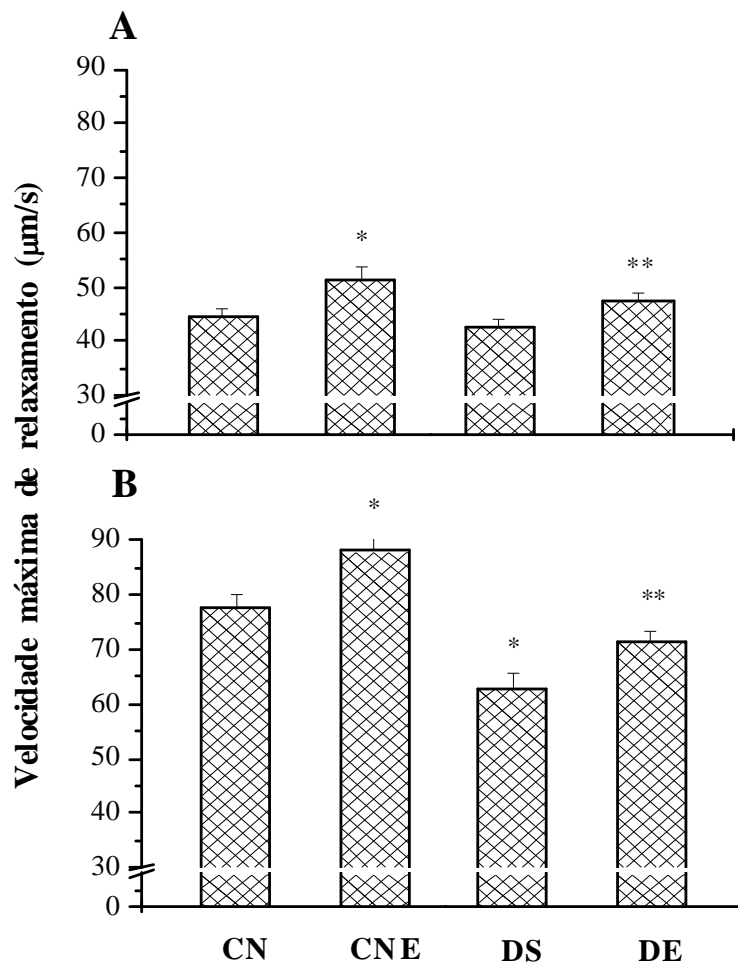


Figura 12. Velocidade máxima de relaxamento de miócitos do ventrículo esquerdo estimulados a 1Hz (A) e 3Hz (B). Controle não diabético (CN) (de 106 a 227 células); controle não diabético exercitado (CNE) (78 a 173 células); diabético sedentário (DS) (de 109 a 316 células); e diabético exercitado (DE) (de 153 a 354 células). Dados são expressos em média \pm erro padrão da média. *, significativamente diferente de CN, $p < 0,05$. **, significativamente diferente de DS, $p < 0,05$.

Esses resultados mostram que 105 dias de diabetes induzida por STZ prolongou o tempo de relaxamento celular e reduziu a velocidade máxima de relaxamento, demonstrando que cardiomiócitos de animais diabéticos relaxam mais lentamente que aqueles de animais não diabéticos.

Sabe-se que para o cardiomiócito relaxar é necessário que o Ca^{2+} seja removido do citosol. Isso depende principalmente do retorno do Ca^{2+} para o RS (via

SERCA2, PLB), para o meio extracelular (NCX, Ca^{2+} ATPase do sarcolema) e para a mitocôndria (transporte de Ca^{2+} mitocondrial). Há evidências que cardiomiócitos de animais diabéticos apresentam expressão e função de SERCA2 e PLB reduzidas (Bidasee et al., 2001; Choi et al., 2002; Bidasee et al., 2004; VasANJI et al., 2006; Bidasee et al., 2008). Isto diminui a velocidade com que esses íons são removidos do citosol. Essas alterações foram associadas ainda à depressão da PKA e CaMKII, responsáveis pela fosforilação de PLB. Além disso, a não fosforilação de PLB por CaMKII diminui a afinidade de SERCA2 por Ca^{2+} e inibe a recaptação de Ca^{2+} pelo RS, o que contribui para tornar mais lento o relaxamento celular (Choi et al. 2002).

Em relação ao NCX, cardiomiócitos de animais com diabetes apresentam expressão reduzida de proteínas de NCX e seu RNAm, o que dificulta o retorno de Ca^{2+} para o sarcolema e contribui para o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diastólico (Hattori et al. (2000).

O relaxamento mais lento tem impacto importante no ciclo cardíaco levando a disfunção diastólica e redução da eficiência do coração desses animais (Belke & Dillaman, 2004; Shao et al., 2009; Stolen et al., 2009). Estes achados em nível celular são compatíveis com aqueles observados no órgão. Em estudos experimentais corações *in vivo* foram observadas disfunções diastólicas (Shao et al., 2009; Loganathan et al., 2007). Além disso, o coração de diabéticos pode apresentar propriedades de relaxamento comprometidas, como prolongado tempo de desaceleração, dissincronia diastólica, relaxamento atrasado e enchimento anormal (Burguess et al., 2007).

O programa de natação aplicado aqui, por sua vez, provocou uma redução no tempo para 50% do relaxamento e aumentou a velocidade máxima de relaxamento dos miócitos cardíacos dos animais diabéticos e não diabéticos. Esses resultados indicam um efeito positivo do PN em melhorar a função contrátil dessas células em animais não diabéticos e retornar a velocidade de relaxamento dos cardiomiócitos aos níveis dos animais não diabéticos sedentários (CN).

Há evidências de que o aumento da velocidade de relaxamento dos cardiomiócitos de animais diabéticos em resposta ao exercício regular ocorre, principalmente, pelo aumento da velocidade de remoção de Ca^{2+} do citosol. Isto se deve ao aumento da expressão de SERCA2 e PLB (Shao et al., 2009; Stolen et al., 2009), normalização da expressão e função dos NCX, redução na fosforilação de CaMKII e restauração da densidade de túbulos transversos (Stolen et al. 2009). Em

animais não diabéticos, da mesma forma, foi demonstrado que o exercício físico regular promove aumento no sequestro de, via SERCA2 e PLB (expressão e função), mas sem alterações no NCX (Wisloff et al., 2002, Kemi et al., 2007).

O relaxamento mais rápido dos cardiomiócitos tem impacto importante na função cardíaca destes animais diabéticos e não diabéticos, revelado através do aumento da capacidade de trabalho, do volume de ejeção e do débito cardíaco (Stolen et al., 2009; Loganathan et al., 2007; Kemi et al., 2008).

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o programa de natação aplicado não alterou de forma distinta o comprimento, largura e volume celulares, bem como a amplitude de contração, tempo de contração e tempo de relaxamento celular em miócitos cardíacos isolados de diferentes regiões (EPI e ENDO) do VE de ratos com DM tipo 1 experimental. Porém, de forma independente da região de origem dos cardiomiócitos, o programa de natação:

- 1) aumentou a largura e o volume celular nos animais com DM tipo 1 experimental, mas não alterou o comprimento celular nestes animais ou nos animais não diabéticos;
- 2) aumentou a amplitude de contração celular nos animais com DM tipo 1 experimental e nos animais não diabéticos;
- 3) aumentou a velocidade de contração celular nos animais com DM tipo 1 experimental e nos animais não diabéticos;
- 4) aumentou a velocidade de relaxamento celular nos animais com DM tipo 1 experimental e nos animais não diabéticos.

Neste trabalho nós verificamos os efeitos do exercício físico em atenuar as disfunções morfológicas e contráteis em cardiomiócitos de animais com diabetes experimental. Esses achados são importantes para o entendimento, em nível celular, dos benefícios do exercício físico para o músculo cardíaco de indivíduos com diabetes mellitus. Todavia, novos estudos são sugeridos para que se possa conhecer os mecanismos moleculares responsáveis pelas melhoras da contratilidade dos miócitos cardíacos observadas no presente estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires MM. **Fisiologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Adeghate, E. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. Mol Cell Biochem, v.261, n.1-2, Jun, p.187-91. 2004.
- Akbarzadeh, A; Norouziyan, D. Mehrabi, M. R Jamshidi, A. Farhangi, S.h; Allah A. V; Mofidian, S. M. A; Lame, B. R. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. Indian J Clin Bioch. V. 22, p.60-64 Sep, 2007.
- Albright, A., Franz, M., Hornsby, G., Kriska, A., Marrero, D., Ullrich, I. and Verity, L. S. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. Med Sci Sports Exerc, v.32, n.7, Jul, p.1345-60. 2000.
- An, D. and Rodrigues, B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.291, n.4, Oct, p.H1489-506. 2006.
- Anversa, P., Cheng, W., Liu, Y., Leri, A., Redaelli, G. and Kajstura, J. Apoptosis and myocardial infarction. Basic Res Cardiol, v.93 Suppl 3, p.8-12. 1998.
- Asami, S.; Hirano, T.; Yamaguchi, R.; Tsurudomf, Y.; Itoh, H.;Kasai, H. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxyguanosine levels in rat organs. Biophys ResComm, v.24, p. 678-682, 1998.
- Atchley, A. E., Jr. and Douglas, P. S. Left ventricular hypertrophy in athletes: morphologic features and clinical correlates. Cardiol Clin, v.25, n.3, Aug, p.371-82, v. 2007.
- Barauna, V. G., Rosa, K. T., Irigoyen, M. C. and De Oliveira, E. M. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. Clin Med Res, v.5, n.2, Jun, p.114-20. 2007.
- Barauna, V. G., Magalhaes, F. C., Krieger, J. E. and Oliveira, E. M. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.295, n.2, Aug, p.R381-7. 2008.
- Bassani, R. A. and Bers, D. M. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. J Mol Cell Cardiol, v.26, n.10, Oct, p.1335-47. 1994.
- Belke, D. D. and Dillmann, W. H. Altered cardiac calcium handling in diabetes. Curr Hypertens Rep, v.6, n.6, Dec, p.424-9. 2004.
- Bers, D. M., Bassani, R. A., Bassani, J. W., Baudet, S. and Hryshko, L. V. Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. J Mol Cell Cardiol, v.25, n.9, Sep, p.1047-57. 1993.

Bers, D. M. and Weber, C. R. Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes. Ann N Y Acad Sci, v.976, Nov, p.500-12. 2002.

Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, v.415, n.6868, Jan 10, p.198-205. 2002a.

Bers, D. M Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. Front Biosci, v.7, Jul 1, p.d1697-711. 2002b.

Bers, D.M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. Annu Rev Physiol, v.70, p.23-49. 2008.

Bidasee, K. R., Dincer, U. D. and Besch, H. R., Jr. Ryanodine receptor dysfunction in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Pharmacol, v.60, n.6, Dec, p.1356-64. 2001.

Bidasee, K. R., Nallani, K., Yu, Y., Cocklin, R. R., Zhang, Y., Wang, M., Dincer, U. D. and Besch, H. R., Jr. Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. Diabetes, v.52, n.7, Jul, p.1825-36. 2003.

Bidasee, K. R., Zhang, Y., Shao, C. H., Wang, M., Patel, K. P., Dincer, U. D. and Besch, H. R., Jr. Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Diabetes, v.53, n.2, Feb, p.463-73. 2004.

Bidasee, K. R., Zheng, H., Shao, C. H., Parbhu, S. K., Rozanski, G. J. and Patel, K. P. Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of beta-adrenoceptors. J Appl Physiol, v.105, n.3, Sep, p.907-14. 2008.

Blomqvist, C. G. and Saltin, B. Cardiovascular adaptations to physical training. Annu Rev Physiol, v.45, p.169-89. 1983.

Bracken, N., Howarth, F. C. and Singh, J. Effects of streptozotocin-induced diabetes on contraction and calcium transport in rat ventricular cardiomyocytes. Ann N Y Acad Sci, v.1084, Nov, p.208-22. 2006.

Broderick, T. L., Poirier, P. and Gillis, M. Exercise training restores abnormal myocardial glucose utilization and cardiac function in diabetes. Diabetes Metab Res Rev, v.21, n.1, Jan-Feb, p.44-50. 2005.

Brooks, G.A.; Fahey, T.D. Exercise physiology: human bioenergetics and its applications. New York, John Wiley, 1984.564p.

Buchanan, J., Mazumder, P. K., Hu, P., Chakrabarti, G., Roberts, M. W., Yun, U. J., Cooksey, R. C., Litwin, S. E. and Abel, E. D. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. Endocrinology, v.146, n.12, Dec, p.5341-9. 2005.

Burgess, M. I., Fang, Z. Y. and Marwick, T. H. Role of diastolic dyssynchrony in the delayed relaxation pattern of left ventricular filling. J Am Soc Echocardiogr, v.20, n.1, Jan, p.63-9. 2007.

Chang FL, Huang TH, Hsieh SS, Yang RS, Lin CC. The effects of different endurance training intensity on systematic and peripheral citrate synthase activity. Med Sci Sports Exerc. S33:295, 2001.

Chatham, J. C. and Seymour, A. M. Cardiac carbohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats. Cardiovasc Res, v.55, n.1, Jul, p.104-12. 2002.

Choi, K. M., Zhong, Y., Hoit, B. D., Grupp, I. L., Hahn, H., Dilly, K. W., Guatimosim, S., Lederer, W. J. and Matlib, M. A. Defective intracellular Ca²⁺ signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.283, n.4, Oct, p.H1398-408. 2002.

Cook, S. J, Lancaster, M.K, O'Neil, S.C. Regional differences in the regulation of intracellular sodium and action potential configuration in rabbit left ventricle . Pflugers Arch. V.43, p. 515-522, 1997.

Cooper, G. T. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. Annu Rev Med, v.48, p.13-23. 1997.

Copeland, J. L., Consitt, L. A. and Tremblay, M. S. Hormonal responses to endurance and resistance exercise in females aged 19-69 years. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v.57, n.4, Apr, p.B158-65. 2002.

Crisman, R. P. and Tomanek, R. J. Exercise training modifies myocardial mitochondria and myofibril growth in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol, v.248, n.1 Pt 2, Jan, p.H8-14. 1985.
97.

Das, A. K. Diabetic heart disease--current problems and their management. J Assoc Physicians India, v.37, n.2, Feb, p.163-5. 1989.

Davidoff, A. J., Mason, M. M., Davidson, M. B., Carmody, M. W., Hintz, K. K., Wold, L. E., Podolin, D. A. and Ren, J. Sucrose-induced cardiomyocyte dysfunction is both preventable and reversible with clinically relevant treatments. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.286, n.5, May, p.E718-24. 2004.

De Almeida Leme, J. A., De Araujo, M. B., De Moura, L. P., Gomes, R. J., De Moura, R. F., Rogatto, G. P., De Mello, M. A. and Luciano, E. Effects of physical training on serum and pituitary growth hormone contents in diabetic rats. Pituitary, v.12, n.4, p.304-8. 2009.

De Angelis, K. L., Oliveira, A. R., Dall'ago, P., Peixoto, L. R., Gadonski, G., Lacchini, S., Fernandes, T. G. and Irigoyen, M. C. Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Braz J Med Biol Res, v.33, n.6, Jun, p.635-41. 2000.

- De Oliveira, C. A., Luciano, E. and De Mello, M. A. The role of exercise on long-term effects of alloxan administered in neonatal rats. Exp Physiol, v.90, n.1, Jan, p.79-86. 2005.
- Deblieux, P. M., Barbee, R. W., Mcdonough, K. H. and Shepherd, R. E. Exercise training improves cardiac performance in diabetic rats. Proc Soc Exp Biol Med, v.203, n.2, Jun, p.209-13. 1993.
- Delgado, J., Saborido, A., Moran, M. and Megias, A. Chronic and acute exercise do not alter Ca²⁺ regulatory systems and ectonucleotidase activities in rat heart. J Appl Physiol, v.87, n.1, Jul, p.152-60. 1999.
- Derave, W., Hansen, B. F., Lund, S., Kristiansen, S. and Richter, E. A. Muscle glycogen content affects insulin-stimulated glucose transport and protein kinase B activity. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.279, n.5, Nov, p.E947-55. 2000.
- Diffie, G. M., Seversen, E. A. and Titus, M. M. Exercise training increases the Ca (2+) sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. J Appl Physiol, v.91, n.1, Jul, p.309-15. 2001.
- Diffie, G. M. and Nagle, D. F. Exercise training alters length dependence of contractile properties in rat myocardium. J Appl Physiol, v.94, n.3, Mar, p.1137-44. 2003.
- Diffie, G. M. and Chung, E. Altered single cell force-velocity and power properties in exercise-trained rat myocardium. J Appl Physiol, v.94, n.5, May, p.1941-8. 2003.
- Diffie, G. M. Adaptation of cardiac myocyte contractile properties to exercise training. Exerc Sport Sci Rev, v.32, n.3, Jul, p.112-9. 2004.
- Diaz-Herrera, P., Torres, A., Morcuende, J. A., Garcia-Castellano, J. M., Calbet, J. A. and Sarrat, R. Effect of endurance running on cardiac and skeletal muscle in rats. Histol Histopathol, v.16, n.1, Jan, p.29-35. 2001.
- Donthi, R. V., Ye, G., Wu, C., McClain, D. A., Lange, A. J. and Epstein, P. N. Cardiac expression of kinase-deficient 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase inhibits glycolysis, promotes hypertrophy, impairs myocyte function, and reduces insulin sensitivity. J Biol Chem, v.279, n.46, Nov 12, p.48085-90. 2004.
- Douglas, P. S. Cardiac considerations in the triathlete. Med Sci Sports Exerc, v.21, n.5 Suppl, Oct, p.S214-8. 1989.
- Dyntar, D., Eppenberger-Eberhardt, M., Maedler, K., Pruschy, M., Eppenberger, H. M., Spinass, G. A. and Donath, M. Y. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. Diabetes, v.50, n.9, Sep, p.2105-13. 2001.

Dyntar, D., Sergeev, P., Klisic, J., Ambuhl, P., Schaub, M. C. and Donath, M. Y. High glucose alters cardiomyocyte contacts and inhibits myofibrillar formation. J Clin Endocrinol Metab, v.91, n.5, May, p.1961-7. 2006.

Eisele, J. C., Schaefer, I. M., Randel Nyengaard, J., Post, H., Liebetanz, D., Bruel, A. and Muhlfeld, C. Effect of voluntary exercise on number and volume of cardiomyocytes and their mitochondria in the mouse left ventricle. Basic Res Cardiol, v.103, n.1, Jan, p.12-21. 2008.

Evans, D. A. Conjoint Clinic on Drugs and Genes. J Chronic Dis, v.18, Jan, p.59-76. 1965.

Fang, Z. Y., Leano, R. and Marwick, T. H. Relationship between longitudinal and radial contractility in subclinical diabetic heart disease. Clin Sci (Lond), v.106, n.1, Jan, p.53-60. 2004.

Fang, Z. Y., Prins, J. B. and Marwick, T. H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. Endocr Rev, v.25, n.4, Aug, p.543-67. 2004.

Fleck, S. J. Cardiovascular adaptations to resistance training. Med Sci Sports Exerc, v.20, n.5 Suppl, Oct, p.S146-51. 1988.

Fredersdorf, S., Thumann, C., Ulucan, C., Griese, D. P., Luchner, A., Riegger, G. A., Kromer, E. P. and Weil, J. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. Cardiovasc Pathol, v.13, n.1, Jan-Feb, p.11-9. 2004.

Frustaci, A., Kajstura, J., Chimenti, C., Jakoniuk, I., Leri, A., Maseri, A., Nadal-Ginard, B. and Anversa, P. Myocardial cell death in human diabetes. Circ Res, v.87, n.12, Dec 8, p.1123-32. 2000.

Fujii, N., Jessen, N. and Goodyear, L. J. AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.291, n.5, Nov, p.E867-77. 2006.

Galindo, C. L., Skinner, M. A., Errami, M., Olson, L. D., Watson, D. A., Li, J., McCormick, J. F., Mciver, L. J., Kumar, N. M., Pham, T. Q. e Garner, H. R. Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure. BMC Physiol, v.9, p.23. 2009.

Gerdes, A. M. and Capasso, J. M. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. J Mol Cell Cardiol, v.27, n.3, Mar, p.849-56. 1995.

Gomes, R. J., Leme, J. A., De Moura, L. P., De Araujo, M. B., Rogatto, G. P., De Moura, R. F., Luciano, E. and De Mello, M. A. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. Cell Biochem Funct, v.27, n.4, Jun, p.199-204. 2009.

Grossman, W., Jones, D. and McLaurin, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. J Clin Invest, v.56, n.1, Jul, p.56-64. 1975.

Haider, B., Yeh, C. K., Thomas, G., Oldewurtel, H. A., Lyons, M. M. and Regan, T. J. Influence of diabetes on the myocardium and coronary arteries of rhesus monkey fed an atherogenic diet. Circ Res, v.49, n.6, Dec, p.1278-88. 1981.

Hakim, Z. S., Patel, B. K. and Goyal, R. K. Effects of chronic ramipril treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. Indian J Physiol Pharmacol, v.41, n.4, Oct, p.353-60. 1997.

Hall, J. L., Sexton, W. L. and Stanley, W. C. Exercise training attenuates the reduction in myocardial GLUT-4 in diabetic rats. J Appl Physiol, v.78, n.1, Jan, p.76-81. 1995.

Harmer, A. R., Chisholm, D. J., Mckenna, M. J., Hunter, S. K., Ruell, P. A., Naylor, J. M., Maxwell, L. J. and Flack, J. R. Sprint training increases muscle oxidative metabolism during high-intensity exercise in patients with type 1 diabetes. Diabetes Care, v.31, n.11, Nov, p.2097-102. 2008.

Hart, G. Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure. Cardiovasc Res, v.28, n.7, Jul, p.933-46. 1994.

Hart, G. Exercise-induced cardiac hypertrophy: a substrate for sudden death in athletes? Exp Physiol, v.88, n.5, Sep, p.639-44. 2003.

Hattori, Y., Matsuda, N., Kimura, J., Ishitani, T., Tamada, A., Gando, S., Kemmotsu, O. and Kanno, M. Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. J Physiol, v.527 Pt 1, Aug 15, p.85-94. 2000.

Hefti, M. A., Harder, B. A., Eppenberger, H. M. and Schaub, M. C. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. J Mol Cell Cardiol, v.29, n.11, Nov, p.2873-92. 1997.

Heineke, J. and Molkenin, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. Nat Rev Mol Cell Biol, v.7, n.8, Aug, p.589-600. 2006.

Howarth, F. C., Al-Shamsi, N., Al-Qaydi, M., Al-Mazrouei, M., Qureshi, A., Chandranath, S. I., Kazzam, E. and Adem, A. Effects of brain natriuretic peptide on contraction and intracellular Ca²⁺ in ventricular myocytes from the streptozotocin-induced diabetic rat. Ann N Y Acad Sci, v.1084, Nov, p.155-65. 2006.

Howarth, F. C., Chandler, N. J., Kharche, S., Tellez, J. O., Greener, I. D., Yamanushi, T. T., Billeter, R., Boyett, M. R., Zhang, H. and Dobrzynski, H. Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein expression in ventricular muscle. Mol Cell Biochem, v.319, n.1-2, Dec, p.105-14. 2008.

Howarth, F. C., Marzouqi, F. M., Al Saeedi, A. M., Hameed, R. S. and Adeghate, E. The effect of a heavy exercise program on the distribution of pancreatic hormones in the streptozotocin-induced diabetic rat. Jop, v.10, n.5, p.485-91. 2009.

Howarth, F. C. and Qureshi, M. A. Myofilament sensitivity to Ca²⁺ in ventricular myocytes from the Goto-Kakizaki diabetic rat. Mol Cell Biochem, v.315, n.1-2, Aug, p.69-74. 2008.

Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. J Appl Physiol.v. 95,p.300-7. 2003.

Hu, Y. Z., Cheng, B. C., Wang, H. P. e Hu, S. [The ultrastructure change of cardiomyocyte in Athlete's Heart]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, v.33, n.10, Oct, p.936-9. 2005.

Kawaguchi, M., Techigawara, M., Ishihata, T., Asakura, T., Saito, F., Maehara, K. e Maruyama, Y. A comparison of ultrastructural changes on endomyocardial biopsy specimens obtained from patients with diabetes mellitus with and without hypertension. Heart Vessels, v.12, n.6, p.267-74. 1997.

Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M. and Natori, T. New inbred strain of Long-Evans Tokushima lean rats with IDDM without lymphopenia. Diabetes, v.40, n.11, Nov, p.1375-81. 1991.

Katz, A. M. Molecular basis of calcium channel blockade. Am J Cardiol, v.69, n.13, Apr 30, p.17E-22E. 1992.

Kemi, O. J., Haram, P. M., Wisloff, U. and Ellingsen, O. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. Circulation, v.109, n.23, Jun 15, p.2897-904. 2004.

Kemi, O. J., Haram, P. M., Loennechen, J. P., Osnes, J. B., Skomedal, T., Wisloff, U. and Ellingsen, O. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. Cardiovasc Res, v.67, n.1, Jul 1, p.161-72. 2005.

Kemi, O. J., Ellingsen, O., Ceci, M., Grimaldi, S., Smith, G. L., Condorelli, G. and Wisloff, U. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. J Mol Cell Cardiol, v.43, n.3, Sep, p.354-61. 2007.

Kemi, O. J., Ceci, M., Condorelli, G., Smith, G. L. and Wisloff, U. Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase function is increased by aerobic interval training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, v.15, n.2, Apr, p.145-8. 2008.

Kemi,O.J & Wisloff. High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. J Cardiopulm Rehabil Prev, v.30, n. 1, Jan-Feb, p.2-11 2010.

Kim, H. W., Ch, Y. S., Lee, H. R., Park, S. Y. and Kim, Y. H. Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression. Life Sci, v.70, n.4, Dec 14, p.367-79. 2001.

Kiraly, M. A., Bates, H. E., Kaniuk, N. A., Yue, J. T., Brumell, J. H., Matthews, S. G., Riddell, M. C. and Vranic, M. Swim training prevents hyperglycemia in ZDF rats: mechanisms involved in the partial maintenance of beta-cell function. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.294, n.2, Feb, p.E271-83. 2008.

Kneffel, Z., Horvath, P., Petrekanits, M., Nemeth, H., Sido, Z. and Pavlik, G. Relationship between relative aerobic power and echocardiographic characteristics in male athletes. Echocardiography, v.24, n.9, Oct, p.901-10. 2007.

Konrad, R. J., Mikolaenko, I., Tolar, J. F., Liu, K. and Kudlow, J. E. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. Biochem J, v.356, n.Pt 1, May 15, p.31-41. 2001.

Korte, F. S., Mokolke, E. A., Sturek, M. and McDonald, K. S. Exercise improves impaired ventricular function and alterations of cardiac myofibrillar proteins in diabetic dyslipidemic pigs. J Appl Physiol, v.98, n.2, Feb, p.461-7. 2005.

Lacombe, V. A., Viatchenko-Karpinski, S., Terentyev, D., Sridhar, A., Emani, S., Bonagura, J. D., Feldman, D. S., Gyorke, S. and Carnes, C. A. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.293, n.5, Nov, p.R1787-97. 2007.

Lagadic-Gossmann, D., Buckler, K. J., Le Prigent, K. and Feuvray, D. Altered Ca²⁺ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. Am J Physiol, v.270, n.5 Pt 2, May, p.H1529-37. 1996.

Lajoie, C., Calderone, A., Trudeau, F., Lavoie, N., Massicotte, G., Gagnon, S. and Beliveau, L. Exercise training attenuated the PKB and GSK-3 dephosphorylation in the myocardium of ZDF rats. J Appl Physiol, v.96, n.5, May, p.1606-12. 2004.

Langer, G. A., Frank, J. S., Rich, T. L. e Orner, F. B. Calcium exchange, structure, and function in cultured adult myocardial cells. Am J Physiol, v.252, n.2 Pt 2, Feb, p.H314-24. 1987.

Laughlin, M. H., Hale, C. C., Novela, L., Gute, D., Hamilton, N. e Ianuzzo, C. D. Biochemical characterization of exercise-trained porcine myocardium. J Appl Physiol, v.71, n.1, Jul, p.229-35. 1991.

Layland, J. & Kentish, J.C. Positive force and Ca²⁺ frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. Am J. Physiol. v.248, p.9-18, 1999.

Lewartowski, B & Pytkowshi, B. Cellular mechanism of the relationship between myocardial force and frequency of contraction. Prog. Biophys Mol Biol. v. 50, p.1335-1347

Loganathan, R., Bilgen, M., Al-Hafez, B. and Smirnova, I. V. Characterization of alterations in diabetic myocardial tissue using high resolution MRI. Int J Cardiovasc Imaging, v.22, n.1, Feb, p.81-90. 2006.

Loganathan, R., Bilgen, M., Al-Hafez, B., Zhero, S. V., Alenezy, M. D. and Smirnova, I. V. Exercise training improves cardiac performance in diabetes: in vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. J Appl Physiol, v.102, n.2, Feb, p.665-72. 2007.

Lundgren M. Interplay between hormones, nutrients and adiposedepts in the regulation of insulin sensitivity- an experimental study in rat and human adipocytes. Umea University Medical Dissertations, 2006. Proceedings of the Nutrition Society. v.66, n.2 p.171–182, 2007.

Marini, M., Falcieri, E., Margonato, V., Trere, D., Lapalombella, R., Di Tullio, S., Marchionni, C., Burattini, S., Samaja, M., Esposito, F. and Veicsteinas, A. Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat. Histochem Cell Biol, v.129, n.4, Apr, p.479-87. 2008.

Mccrossan, Z. A., Billeter, R. and White, E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. Cardiovasc Res, v.63, n.2, Aug 1, p.283-92. 2004.

Mcmullen, J. R. and Jennings, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.34, n.4, Apr, p.255-62. 2007.

Medeiros, A; Gianolla, R. M; Kalil, L. M. P; Bacurau, R. F. P;Rosa, L. F. B. C;Negrão, C. E; Brum, P. C. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. Rev. Paul. Educ. Fís.v.14, p.7-15, jan./jun. 2000

Menon, R. K., Stephan, D. A., Rao, R. H., Shen-Orr, Z., Downs, L. S., Jr., Roberts, C. T., Jr., Leroith, D. and Sperling, M. A. Tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozocin-induced diabetes in the rat. J Endocrinol, v.142, n.3, Sep, p.453-62. 1994.

Mihm, M. J., Seifert, J. L., Coyle, C. M. and Bauer, J. A. Diabetes related cardiomyopathy time dependent echocardiographic evaluation in an experimental rat model. Life Sci, v.69, n.5, Jun 22, p.527-42. 2001.

Mizushige, K., Yao, L., Noma, T., Kiyomoto, H., Yu, Y., Hosomi, N., Ohmori, K. and Matsuo, H. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. Circulation, v.101, n.8, Feb 29, p.899-907. 2000.

Mokhtar, N., Lavoie, J. P., Rousseau-Migneron, S. and Nadeau, A. Physical training reverses defect in mitochondrial energy production in heart of chronically diabetic rats. Diabetes, v.42, n.5, May, p.682-7. 1993.

Mokhtar, N., Rousseau-Mignerot, S., Tancrede, G. and Nadeau, A. Partial correction of impaired creatine kinase activity in diabetic rat heart by physical training. Metabolism, v.41, n.9, Sep, p.1004-8. 1992.

Moore, R. L., Musch, T. I., Yelamarty, R. V., Scaduto, R. C., Jr., Semanchick, A. M., Elensky, M. and Cheung, J. Y. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. Am J Physiol, v.264, n.5 Pt 1, May, p.C1180-9. 1993.

Moore, R. L. and Korzick, D. H. Cellular adaptations of the myocardium to chronic exercise. Prog Cardiovasc Dis, v.37, n.6, May-Jun, p.371-96. 1995.

Mooren & Volker. Molecular and Cellular Physiology. Canada. Human Kinetics, 2005

Morgan, H. E. and Baker, K. M. Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence. Circulation, v.83, n.1, Jan, p.13-25. 1991.

Natali, A.J: Effects of voluntary exercise on the function of cardiac myocytes. School of Biomedic Sciences, University of Leeds, Leeds, 2000 p.7-20.

Natali, A. J., Turner, D. L., Harrison, S. M. and White, E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. J Exp Biol, v.204, n.Pt 6, Mar, p.1191-9. 2001.

Natali, A. J., Wilson, L. A., Peckham, M., Turner, D. L., Harrison, S. M. and White, E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. J Physiol, v.541, n.Pt 3, Jun 15, p.863-75. 2002.

Naylor, L. H., George, K., O'driscoll, G. e Green, D. J. The athlete's heart: a contemporary appraisal of the 'Morganroth hypothesis'. Sports Med, v.38, n.1, p.69-90. 2008.

Noda, N., Hayashi, H., Miyata, H., Suzuki, S., Kobayashi, A. and Yamazaki, N. Cytosolic Ca²⁺ concentration and pH of diabetic rat myocytes during metabolic inhibition. J Mol Cell Cardiol, v.24, n.4, Apr, p.435-46. 1992.

Ouwens, D. M., Boer, C., Fodor, M., De Galan, P., Heine, R. J., Maassen, J. A. and Diamant, M. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. Diabetologia, v.48, n.6, Jun, p.1229-37. 2005.

Paulson, D. J., Mathews, R., Bowman, J. and Zhao, J. Metabolic effects of treadmill exercise training on the diabetic heart. J Appl Physiol, v.73, n.1, Jul, p.265-71. 1992.

Pereira, L., Matthes, J., Schuster, I., Valdivia, H. H., Herzig, S., Richard, S. and Gomez, A. M. Mechanisms of [Ca²⁺]_i transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. Diabetes, v.55, n.3, Mar, p.608-15. 2006.

Pesce, G., Guillaume, V., Dutour, A., Dadoun, F., Joanny, P., Steinberg, J. and Oliver, C. Effect of streptozotocin-induced diabetes on somatostatin receptors in the anterior pituitary, hypothalamus and cerebral cortex of the male rat. Life Sci, v.54, n.24, p.1927-33. 1994.

Pold, R., Jensen, L. S., Jessen, N., Buhl, E. S., Schmitz, O., Flyvbjerg, A., Fujii, N., Goodyear, L. J., Gotfredsen, C. F., Brand, C. L. and Lund, S. Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats. Diabetes, v.54, n.4, Apr, p.928-34. 2005.

Poornima, I. G., Parikh, P. and Shannon, R. P. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. Circ Res, v.98, n.5, Mar 17, p.596-605. 2006.

Rakieten, N., Rakieten, M. L. and Nadkarni, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep, v.29, May, p.91-8. 1963.

Rakusan, K. and Wicker, P. Morphometry of the small arteries and arterioles in the rat heart: effects of chronic hypertension and exercise. Cardiovasc Res, v.24, n.4, Apr, p.278-84. 1990.

Isaias Raw. Mecanismo de ação da insulina. Revista de Medicina. v.4 n. 85, p. 124-129. São Paulo, out.-dez, 2006.

Regan, T. J., Lyons, M. M., Ahmed, S. S., Levinson, G. E., Oldewurtel, H. A., Ahmad, M. R. and Haider, B. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. J Clin Invest, v.60, n.4, Oct, p.884-99. 1977.

Regan, T. J., Wu, C. F., Yeh, C. K., Oldewurtel, H. A. e Haider, B. Myocardial composition and function in diabetes. The effects of chronic insulin use. Circ Res, v.49, n.6, Dec, p.1268-77. 1981.

Ren, J. and Bode, A. M. Altered cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from spontaneously diabetic BB rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.279, n.1, Jul, p.H238-44. 2000.

Ren, J. and Davidoff, A. J. Diabetes rapidly induces contractile dysfunctions in isolated ventricular myocytes. Am J Physiol, v.272, n.1 Pt 2, Jan, p.H148-58. 1997.

Reuter, H., Gronke, S., Adam, C., Ribati, M., Brabender, J., Zobel, C., Frank, K. F., Wippermann, J., Schwinger, R. H., Brixius, K. and Muller-Ehmsen, J. Sarcoplasmic Ca²⁺ release is prolonged in nonfailing myocardium of diabetic patients. Mol Cell Biochem, v.308, n.1-2, Jan, p.141-9. 2008.

Richey, P. A. and Brown, S. P. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. J Sports Sci, v.16, n.2, Feb, p.129-41. 1998.

Rodrigues, B., Figueroa, D. M., Mostarda, C. T., Heeren, M. V., Irigoyen, M. C. e De Angelis, K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and

oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. Cardiovasc Diabetol, v.6, p.38. 2007.

Roman-Campos, D., Duarte, H. L., Sales, P. A., Jr., Natali, A. J., Ropert, C., Gazzinelli, R. T. e Cruz, J. S. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Basic Res Cardiol, v.104, n.3, May, p.238-46. 2009.

Sadoshima, J. and Izumo, S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Annu Rev Physiol, v.59, p.551-71. 1997.

Saraceni, C. and Broderick, T. L. Cardiac and metabolic consequences of aerobic exercise training in experimental diabetes. Curr Diabetes Rev, v.3, n.1, Feb, p.75-84. 2007.

Satoh, H., Delbridge, L. M., Blatter, L. A. and Bers, D. M. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. Biophys J, v.70, n.3, Mar, p.1494-504. 1996.

Saunders, J., Mathewkutty, S., Drazner, M. H. and Mcguire, D. K. Cardiomyopathy in type 2 diabetes: update on pathophysiological mechanisms. Herz, v.33, n.3, Apr, p.184-90. 2008.

Schultz, R. L., Swallow, J. G., Waters, R. P., Kuzman, J. A., Redetzke, R. A., Said, S., De Escobar, G. M. e Gerdes, A. M. Effects of excessive long-term exercise on cardiac function and myocyte remodeling in hypertensive heart failure rats. Hypertension, v.50, n.2, Aug, p.410-6. 2007.

Searls, Y. M., Smirnova, I. V., Fegley, B. R. and Stehno-Bittel, L. Exercise attenuates diabetes-induced ultrastructural changes in rat cardiac tissue. Med Sci Sports Exerc, v.36, n.11, Nov, p.1863-70. 2004.

Sellers, D. J. and Chess-Williams, R. The effects of streptozotocin-induced diabetes and aldose reductase inhibition with sorbinil, on left and right atrial function in the rat. J Pharm Pharmacol, v.52, n.6, Jun, p.687-94. 2000.

Shao, C. H., Rozanski, G. J., Patel, K. P. and Bidasee, K. R. Dyssynchronous (non-uniform) Ca²⁺ release in myocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. J Mol Cell Cardiol, v.42, n.1, Jan, p.234-46. 2007.

Shao, C. H., Wehrens, X. H., Wyatt, T. A., Parbhu, S., Rozanski, G. J., Patel, K. P. and Bidasee, K. R. Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. J Appl Physiol, v.106, n.4, Apr, p.1280-92. 2009.

Shehadeh, A. and Regan, T. J. Cardiac consequences of diabetes mellitus. Clin Cardiol, v.18, n.6, Jun, p.301-5. 1995.

Shimizu, M., Umeda, K., Sugihara, N., Yoshio, H., Ino, H., Takeda, R., Okada, Y. and Nakanishi, I. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. J Clin Pathol, v.46, n.1, Jan, p.32-6. 1993.

Singh, J., Chonkar, A., Bracken, N., Adeghate, E., Latt, Z. and Hussain, M. Effect of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus on contraction, calcium transient, and cation contents in the isolated rat heart. Ann N Y Acad Sci, v.1084, Nov, p.178-90. 2006.

Stanley, W. C., Hall, J. L., Hacker, T. A., Hernandez, L. A. and Whitesell, L. F. Decreased myocardial glucose uptake during ischemia in diabetic swine. Metabolism, v.46, n.2, Feb, p.168-72. 1997.

Stanley, W. C., Recchia, F. A. and Lopaschuk, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. Physiol Rev, v.85, n.3, Jul, p.1093-129. 2005.

Stolen, T. O., Hoydal, M. A., Kemi, O. J., Catalucci, D., Ceci, M., Aasum, E., Larsen, T., Rolim, N., Condorelli, G., Smith, G. L. and Wisloff, U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. Circ Res, v.105, n.6, Sep 11, p.527-36. 2009.

Vasanji, Z., Cantor, E. J., Juric, D., Moyen, M. and Netticadan, T. Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. Am J Physiol Cell Physiol, v.291, n.4, Oct, p.C772-80. 2006.

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest, v.103 n. 7, p. 931-943, 1999.

Wang, J., Song, Y., Wang, Q., Kralik, P. M. and Epstein, P. N. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. Rev Diabet Stud, v.3, n.3, Fall, p.108-17. 2006.

Wang, S., Ma, J. Z., Zhu, S. S., Xu, D. J., Zou, J. G. and Cao, K. J. Swimming training can affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. Eur J Appl Physiol, v.104, n.3, Oct, p.549-55. 2008.

Wang, X., McLennan, S. V., Allen, T. J., Tsoutsman, T., Semsarian, C. and Twigg, S. M. Adverse effects of high glucose and free fatty acid on cardiomyocytes are mediated by connective tissue growth factor. Am J Physiol Cell Physiol, v.297, n.6, Dec, p.C1490-500. 2009.

Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R. and Marks, A. R. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. Circ Res, v.94, n.6, Apr 2, p.e61-70. 2004.

White, F. C., Mckirnan, M. D., Breisch, E. A., Guth, B. D., Liu, Y. M. e Bloor, C. M. Adaptation of the left ventricle to exercise-induced hypertrophy. J Appl Physiol, v.62, n.3, Mar, p.1097-110. 1987.

Wisloff, U., Loennechen, J. P., Falck, G., Beisvag, V., Currie, S., Smith, G. and Ellingsen, O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. Cardiovasc Res, v.50, n.3, Jun, p.495-508. 2001.

Wisloff, U., Stoylen, A., Loennechen, J. P., Bruvold, M., Rognum, O., Haram, P. M., Tjonna, A. E., Helgerud, J., Slordahl, S. A., Lee, S. J., Videm, V., Bye, A., Smith, G. L., Najjar, S. M., Ellingsen, O. e Skjaerpe, T. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. Circulation, v.115, n.24, Jun 19, p.3086-94. 2007.

Wisloff, U., Ellingsen, O. and Kemi, O. J. High-intensity interval training to maximize cardiac benefits of exercise training? Exerc Sport Sci Rev, v.37, n.3, Jul, p.139-46. 2009.

Woodiwiss, A. J., Kalk, W. J. and Norton, G. R. Habitual exercise attenuates myocardial stiffness in diabetes mellitus in rats. Am J Physiol, v.271, n.5 Pt 2, Nov, p.H2126-33. 1996.

Yin, F. C. Ventricular wall stress. Circ Res, v.49, n.4, Oct, p.829-42. 1981.

Pelliccia, A. ; Maron, b. J ; Spartaro, A.; Proschan, M.A; Spirito, P. The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. N. Engl.J.Med. v. 324 p. 295-301.1991.

Yoshida, R., Ishida, Y., Abo, K., Hozumi, T., Ueno, H., Shiotani, H., Kishimoto-Hashiramoto, M., Hashiramoto, M., Matsunaga, K., Kasuga, M. and Et Al. Hypertrophic cardiomyopathy in patients with diabetes mellitus associated with mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene mutation. Intern Med, v.34, n.10, Oct, p.953-8. 1995.

Yu, Z., Tibbits, G. F. and Mcneill, J. H. Cellular functions of diabetic cardiomyocytes: contractility, rapid-cooling contracture, and ryanodine binding. Am J Physiol, v.266, n.5 Pt 2, May, p.H2082-9. 1994.

Zarain-Herzberg, A., Yano, K., Elimban, V. and Dhalla, N. S. Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. Biochem Biophys Res Commun, v.203, n.1, Aug 30, p.113-20. 1994.

Zhang, L., Cannell, M. B., Phillips, A. R., Cooper, G. J. and Ward, M. L. Altered calcium homeostasis does not explain the contractile deficit of diabetic cardiomyopathy. Diabetes, v.57, n.8, Aug, p.2158-66. 2008.