

Treinamento em Nataação Atenua a Disfunção Contrátil de Cardiomiócitos de Ratos Diabéticos

Swimming Training Attenuates Contractile Dysfunction in Diabetic Rat Cardiomyocytes

Márcia Ferreira da Silva, Maria do Carmo Gouveia Pelúzio, Paulo Roberto dos Santos Amorim, Vitor Neiva Lavorato, Natália Pereira do Santos, Luiz Henrique Marchesi Bozi, Arlete Rita Penitente, Daniel Luciano Falkoski, Felipe Gomes Berfort, Antonio Jose Natali
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG - Brasil

Resumo

Fundamento: O diabetes experimental promove disfunção contrátil em cardiomiócitos, mas os efeitos do treinamento em nataação nesta disfunção não são conhecidos.

Objetivo: Testar os efeitos de um programa de treino em nataação (PTN) sobre a disfunção contrátil de cardiomiócitos de ratos com diabetes experimental.

Métodos: Ratos Wistar (idade: 30 dias; peso corporal médio: 84,19 g) com diabetes induzida por estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal; glicemia > 300 mg/dl) foram alocados em diabéticos sedentários (DS, n = 10) e diabéticos exercitados (DE, n = 13). Animais da mesma idade e peso serviram de controles sedentários (CS, n = 10) e controles exercitados (CE, n = 06). Os animais DE e CE foram submetidos a um PTN (05 dias/semana, 90 min/dia), por 08 semanas. Os miócitos do ventrículo esquerdo (VE) foram isolados e estimulados eletricamente a 3,0 Hz em temperatura ambiente (~ 25° C).

Resultados: O diabetes reduziu a função contrátil nos cardiomiócitos dos animais em relação aos controles (i.e., menor amplitude de contração, maior tempo de contração e relaxamento). O PTN atenuou a redução na amplitude de contração (CS, 11 ± 0,2% vs DE, 11,6 ± 0,2%), o tempo para o pico de contração (CS, 319 ± 5,8 ms vs DE, 333 ± 4,8 ms) e o tempo para 50% de relaxamento (CS, 619 ± 22,2 ms vs DE, 698 ± 18,6 ms) dos cardiomiócitos dos animais diabéticos. O diabetes reduziu as dimensões dos cardiomiócitos, porém, o PTN minimizou a redução da largura e volume celular, sem alterar o comprimento.

Conclusão: O programa de treino em nataação atenuou a disfunção contrátil dos miócitos do VE de ratos com diabetes experimental. (Arq Bras Cardiol. 2011; [online].ahead print, PP.0-0)

Palavras-chave: Nataação, esforço físico, miócitos cardíacos, ratos, diabetes melito.

Abstract

Background: Experimental diabetes promotes contractile dysfunction in cardiomyocytes, but the effects of swimming in this disorder are not known.

Objective: To test the effects of a swimming training program (STP) on cardiomyocyte contractile dysfunction in rats with experimental diabetes.

Methods: Wistar rats (age: 30 days; mean body weight: 84.19 g) with diabetes induced by streptozotocin (60 mg/kg body weight; glucose > 300 mg/dl) were divided into sedentary diabetic rats (SD, n = 10) and exercised diabetic rats (ED, n = 13). Animals of same age and weight served as sedentary controls (SC, n = 10) and exercised controls (EC, n = 06). Animals and ED and EC underwent a STP (05 days/week, 90 min/day) for 08 weeks. Left ventricular (LV) myocytes were isolated and electrically stimulated at 3.0 Hz at room temperature (~ 25° C).

Results: Diabetes reduced contractile function in cardiomyocytes of animals compared to controls (i.e., lower amplitude of contraction, longer duration of contraction and relaxation). The STP attenuated the reduced amplitude of contraction (SC, 11 ± 0.2% vs ED, 11.6 ± 0.2%), time to peak contraction (SC, 319 ± 5.8 ms vs ED, 333 ± 4.8 ms) and time to 50.0% of relaxation (SC, 619 ± 22.2 ms vs ED 698 ± 18.6 ms) of cardiomyocytes of diabetic rats. Diabetes reduced the size of cardiomyocytes, however, the STP minimized the reduction of cell volume and width, without changing length.

Conclusion: The swimming training program attenuated the contractile dysfunction of the LV myocytes of rats with experimental diabetes. (Arq Bras Cardiol. 2011; [online].ahead print, PP.0-0)

Keywords: Swimming; physical exertion; myocytes, cardiac; rats; diabetes mellitus.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Antonio Jose Natali •

Av. PH Rolfs, s/n - Departamento de Educação Física - Campus Universitário da Universidade Federal de Viçosa - 36570-000 - Viçosa, MG - Brasil
E-mail: anatali@ufv.br

Artigo recebido em 06/08/10; revisado recebido em 29/10/10; aceito em 21/12/10.

Introdução

O diabetes melito do tipo 1 é um fator de risco para eventos cardiovasculares, incluindo o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética. A incapacidade em manter a homeostase da glicose no miocárdio compromete a estrutura e a função cardíaca em humanos e em animais com diabetes experimental¹⁻⁴. Em nível celular, foi demonstrado que o diabetes prejudica a função contrátil dos cardiomiócitos, principalmente por provocar alterações estruturais e funcionais na regulação do cálcio (Ca^{2+}) intracelular⁵⁻⁷.

O exercício físico regular tem sido usado como um agente efetivo de proteção cardíaca para diabéticos, uma vez que as anormalidades estruturais e funcionais do coração diabético respondem favoravelmente ao exercício⁸⁻¹⁰. Por exemplo, em animais diabéticos, o exercício crônico atenuou alterações na função ventricular esquerda, tais como redução nos volumes sistólico, diastólico final e de ejeção, no débito cardíaco e na fração de encurtamento^{7,11,12}.

Em nível celular, entretanto, poucos estudos sobre os efeitos do exercício crônico na função contrátil de cardiomiócitos de animais diabéticos foram realizados e, além de usarem exclusivamente a corrida em esteira, apresentaram resultados controversos. Por exemplo, programas de corrida contínua em esteira com intensidade leve (09 m/min, 0% de inclinação, 30 min/dia) ou moderada (18 m/min, 0% de inclinação) não afetaram a contração dos cardiomiócitos de ratos¹³. Outro programa de corrida contínua com intensidade alta (18 m/min, 5% de inclinação, 60 min/dia) provocou adaptações negativas, pois prolongou o tempo de contração celular e não alterou a amplitude de contração dos cardiomiócitos de ratos¹⁴. Entretanto, programas de corrida em esteira com intensidade mais alta (20-25 m/min, 5% de inclinação, 60 min/dia) foram capazes de restaurar a função contrátil dos cardiomiócitos de ratos e camundongos^{7,15}. Portanto, até o momento, os efeitos do exercício contínuo com duração superior a 60 minutos diários, especificamente a natação, sobre a função contrátil de cardiomiócitos de ratos diabéticos não são conhecidos.

Assim, este estudo tem como objetivo testar se um programa de natação, com duração diária de 90 minutos, altera a função contrátil de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos com diabetes experimental.

Métodos

Animais de experimentação e tratamentos

Ratos Wistar (idade 30 dias; peso corporal médio de 84,19 g) foram divididos em 04 grupos: Controle sedentário (CS, n = 10); Controle exercitado (CE, n = 10); Diabético sedentário (DS, n = 20); e Diabético exercitado (DE, n = 20) e foram mantidos em ambiente com temperatura média de 22° C e regime de luminosidade invertido de 12/12 horas claro/escuro com água e ração comercial *ad libitum*.

Foram seguidas as normas estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1996)* e respeitados os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Viçosa (processo nº 03/2009).

Indução do diabetes

Após jejum de 12 horas, os animais dos grupos DE e DS receberam uma injeção intraperitoneal (60 mg/kg de peso corporal) de estreptozotocina (STZ, Sigma, St. Louis, EUA), diluída em 1,0 ml de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4,5). Os animais dos grupos CS e CE receberam 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, a glicose sanguínea de repouso foi aferida (One touch ultra - Johnson & Johnson, México). Animais com níveis de glicose sanguínea de jejum superior a 300 mg/dl foram considerados diabéticos (DS, n = 10; DE, n = 13). A glicose sanguínea de jejum e o peso corporal foram monitorados semanalmente durante o período experimental.

Programa de treino em natação

Após 45 dias de hiperglicemia, os animais do grupo DE e CE foram submetidos a um programa de treinamento em natação (adaptado de Medeiros e cols.¹⁶), por 8 semanas. Na primeira semana, os animais exercitaram-se na água, sem sobrecarga, durante 10-50 min, sendo a duração aumentada em 10 min/dia. Na segunda semana, os animais exercitaram com uma carga de 1% de seu peso corporal e a duração do exercício foi aumentada em 10 min/dia até atingir 90 min de natação ininterruptos. A partir da terceira semana, a carga foi aumentada semanalmente (0,5% do peso corporal) até atingir 4% do peso corporal na 8ª semana. Durante as sessões de natação, 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.

Quatro animais do grupo CE morreram por afogamento.

Isolamento dos cardiomiócitos

Após eutanásia, o coração foi removido e os miócitos do ventrículo esquerdo foram isolados conforme descrito por Natali e cols.¹⁷. Resumidamente, o coração foi canulado via artéria aorta em um sistema Langendorff e perfundido com solução de isolamento [composição (mM): 130 Na^+ ; 5,4 K^+ ; 1,4 Mg^+ ; 140 Cl^- ; 0,75 Ca^{2+} ; 5,0 HEPES; 10 glicose; 20 taurina; e 10 creatina; pH = 7,3 em temperatura ambiente]. Em seguida, o coração foi perfundido com solução livre de cálcio contendo 0,1 mM de *ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)*, por um período de 4-6 min. Na sequência, o coração foi perfundido com solução contendo 1,0 mg.ml⁻¹ de colagenase tipo 2 (Worthington, EUA) e 100,0 mM de CaCl_2 por 20 a 25 min. As soluções utilizadas foram oxigenadas (O_2 100% - White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 35° C. Após perfusões, os ventrículos foram separados dos átrios e pesados. Em seguida, o ventrículo esquerdo foi colocado em frasco contendo 5,0 ml da solução enzimática (colagenase) e albumina sérica bovina (10%). O frasco foi agitado moderadamente durante 05 min, em banho-maria a 37° C, após o qual o tecido foi retirado do frasco e o restante foi centrifugado (3.000 rpm)

por 30 s. O sobrenadante foi removido e os cardiomiócitos foram suspensos na solução de isolamento e armazenados em refrigerador (5° C) até serem utilizados.

Função contrátil dos cardiomiócitos

As contrações celulares foram medidas através da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, Milton, MA-EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse - TS100, Japão), conforme descrito previamente¹⁸. Resumidamente, os miócitos foram acomodados em uma câmara experimental com a base de vidro e banhados por solução tampão com a seguinte composição (em mM): 136,9 NaCl; 5,4 KCl; 0,37 NaH₂PO₄; 0,57 MgCl₂; 5,0 HEPES = 5; 5,6 Glicose e 1,0 CaCl₂ (pH = 7,4 em temperatura ambiente). Os miócitos foram visualizados em um monitor através de uma câmara (Myocam, Ionoptix, frequência de 240 Hz) acoplada ao microscópio utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix). Os cardiomiócitos foram estimulados externamente na frequência de 3,0 Hz (10 Volts, duração de 5 min) utilizando-se um par de eletrodos de aço e um estimulador elétrico de campo (Myopacer, Ionoptix). Os movimentos das bordas longitudinais dos miócitos foram capturados pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix) e armazenados para análise posterior. Foram utilizados para as medidas de contração somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações voluntárias. As contrações foram analisadas conforme descrito previamente¹⁹.

Dimensões dos cardiomiócitos

O comprimento e a largura dos miócitos foram medidos usando-se um sistema de captura de imagens, a partir das imagens dos cardiomiócitos visualizados horizontalmente no monitor de um microcomputador, conforme descrito¹⁷. 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 cardiomiócitos. O volume

celular foi calculado usando-se a fórmula: [Volume (pL) = comprimento (mm) x largura (mm) x (7,59 x 10⁻³ pL/mm²)], conforme Satoh e cols.²⁰.

Análise estatística

Para a comparação das médias das variáveis analisadas entre os 04 grupos (fatores exercício e diabete, dois grupos cada), utilizou-se a análise de variância de duas entradas (ANOVA *two-way*) e *post hoc* de Tukey para as comparações múltiplas. Essa análise foi feita através do *software* Sigma Stat, versão 3,0. Adotou-se o nível de significância de até 5% (p ≤ 0,05).

Resultados

Antes da aplicação de STZ, não houve diferença estatística da glicose sanguínea entre os grupos experimentais (Tabela 1). Quarenta e cinco dias após a aplicação de STZ (início do exercício) e ao final do experimento, os animais diabéticos apresentaram glicose sanguínea superior a dos animais controle. Os níveis de glicose sanguínea não foram alterados pelo exercício, tanto nos animais diabéticos (DE vs DS) quanto nos controle (CE vs CS). Não houve interação entre os fatores exercício e diabete (ANOVA *two-way*, p > 0,05) para esta ou para as demais variáveis analisadas.

Os pesos corporais iniciais não foram diferentes entre os quatro grupos (Tabela 1). Quarenta e cinco dias após a aplicação de STZ, os animais dos grupos DS e DE apresentaram pesos corporais inferiores aos controles CS e CE. O mesmo ocorreu ao final do experimento. Da mesma forma, o programa de natação não alterou esses parâmetros nos animais tanto do grupo DE, quando comparados a DS, quanto nos CE comparados a CS.

Os animais DS apresentaram menores pesos ventriculares (p < 0,05) que os CS (Tabela 1). O programa de natação não alterou o peso ventricular dos animais diabéticos (DS vs DE). Entretanto, nos animais controles, o peso ventricular foi maior nos animais CE que nos CS. O peso dos ventrículos relativo ao peso corporal, índice de hipertrofia ventricular, foi maior no grupo DS que no CS. Entre os animais diabéticos, os DE apresentaram peso relativo dos ventrículos maior que os DS. Entre os controles, os animais CE exibiram maior peso relativo dos ventrículos que os CS.

Tabela 1 - Pesos corporais e dos ventrículos e níveis de glicose sanguínea dos ratos controles e diabéticos

	CS (n = 10)	CE (n = 06)	DS (n = 10)	DE (n = 13)
PC inicial (g)	83,51 ± 1,9	82,72 ± 1,8	87,80 ± 2,0	82,71 ± 1,8
PC após 45 dias (g)	353,93 ± 11,3 [§]	352,12 ± 11,3 [§]	193,72 ± 11,9	186,91 ± 10,7
PC final (g)	443,50 ± 18,1 [†]	410,81 ± 25,7 [†]	198,82 ± 18,1	204,25 ± 18,1
GS inicial (mg/dl)	82,4 ± 4,2	84,0 ± 4,2	89,0 ± 4,5	93,0 ± 4,0
GS após 45 dias (mg/dl)	87,8 ± 11,3	76,2 ± 11,3	525,1 ± 11,3 [†]	520,1 ± 11,9 [†]
GS final (mg/dl)	88,3 ± 32,1	86,8 ± 45,5	475,8 ± 32,1 [†]	483,7 ± 32 [†]
PV (mg)	1.590,00 ± 0,08 [†]	1.930,00 ± 0,11 [†]	1.120,00 ± 0,08	1.330,00 ± 0,08
PV/PC final (mg/g)	3,59 ± 0,4	4,72 ± 0,6 [‡]	5,98 ± 0,4 [†]	7,97 ± 0,4 [§]

Dados em média ± EPM. n - número de animais; CS - controles sedentários; CE - controles exercitados; DS - diabéticos sedentários; DE - diabéticos exercitados; GS - glicose sanguínea; PC - peso corporal; PV - peso dos ventrículos; [§] - diferente de DS e DE; [†] - diferente de CS e CE; [‡] - diferente de CS; [§] - diferente de DS (p < 0, 05).

De forma independente, o diabetes reduziu o comprimento dos cardiomiócitos nos animais sedentários (DS vs CS) e treinados (DE vs CE; Tabela 2). Todavia, o programa de natação não alterou o comprimento dos cardiomiócitos nos animais diabéticos (DE vs DS) e nos não diabéticos (CS vs CE). O diabetes reduziu a largura dos miócitos nos animais sedentários (DS vs CS) e treinados (DE vs CE). Todavia, o programa de natação aumentou a largura dos cardiomiócitos nos animais diabéticos (DE vs DS). Isso não ocorreu nos animais controles (CE vs CS). Houve redução do volume celular no grupo DS comparado ao grupo CS. O programa de natação aumentou o volume celular nos animais diabéticos (DE vs DS), mas não nos animais controles (CE vs CS). Observa-se que a razão comprimento/largura dos cardiomiócitos não foi afetada pelo diabetes ou pelo programa de natação.

A análise da função contrátil dos cardiomiócitos mostrou que a amplitude de contração celular foi reduzida pelo diabetes (CS, $11,0 \pm 0,2\%$ vs DS, $10,2 \pm 0,2\%$, $p < 0,001$) (Figura 1 A). O programa de natação aumentou a amplitude de contração dos cardiomiócitos em tais animais (DS, $10,2 \pm 0,2\%$ vs DE, $11,6 \pm 0,2\%$, $p < 0,001$). Entre os animais controles, o programa de natação aumentou a amplitude de contração (CS, $11,0 \pm 0,2\%$ vs CE, $12,4 \pm 0,2\%$, $p < 0,001$).

Os cardiomiócitos dos animais do grupo DS apresentaram tempo para o pico de contração mais longo do que os do grupo CS ($361 \pm 5,7$ ms vs $319,0 \pm 5,8$ ms, respectivamente, $p < 0,001$) (Figura 1 B). O programa de natação reduziu o tempo para o pico de contração nos animais diabéticos (DS, $361 \pm 5,7$ ms vs DE, $333,0 \pm 4,8$ ms, $p < 0,001$). O mesmo foi efeito observado nos cardiomiócitos dos animais controles (CE, $289,0 \pm 6,8$ ms vs CS, $319,0 \pm 5,8$ ms, $p < 0,001$).

Para 50% do relaxamento, o tempo foi maior nos cardiomiócitos dos animais diabéticos sedentários do que nos controles sedentários (DS, $756 \pm 22,1$ ms vs CS, $619,0 \pm 22,2$ ms, $p < 0,001$) (Figura 1 C). O programa de natação reduziu o tempo para 50% do relaxamento nos cardiomiócitos desses animais (DS, $756 \pm 22,1$ ms vs DE, $698 \pm 18,6$ ms, $p = 0,044$). O mesmo ocorreu nos cardiomiócitos dos animais controles (CE, $516,0 \pm 26,1$ ms vs CS, $619,0 \pm 22,2$ ms, $p = 0,003$).

Discussão

Nossos dados demonstram que a disfunção contrátil dos cardiomiócitos, provocada pelo diabetes, foi atenuada pelo programa de treino em natação com duração de 90 minutos. Além disso, houve aumento da largura e do volume

dos cardiomiócitos, sem alterar o comprimento celular, em resposta ao exercício crônico.

A redução na amplitude de contração observada aqui reflete alterações importantes no miocárdio de ratos diabéticos *in vivo*, tais como redução na fração de encurtamento, no diâmetro diastólico final, no diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo e no débito cardíaco^{7,11}. Apesar de não termos testado os mecanismos, sabe-se que a redução da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} e a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} estão envolvidos²¹. Entretanto, cardiomiócitos de ratos Goto-Kakizaki apresentaram aumento da amplitude de contração associada à redução 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 diabetes²². Há evidências de que a concentração intracelular de Ca^{2+} apresenta-se reduzida em cardiomiócitos de animais com diabetes experimental²³. Isto ocorre em função do aumento da atividade do trocador de sódio e cálcio (NCX) e da diminuição da recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS), via cálcio ATPase do RS (SERCA2)¹⁵ e da redução da liberação de Ca^{2+} do RS, via receptores de rianodina (RyR2)²⁴. Além disso, é possível que a redução da densidade de túbulos transversos dos cardiomiócitos de animais diabéticos possa alterar o espaço entre os canais de cálcio tipo L e os RyR2, o que reduz a eficiência do acoplamento excitação-contração¹⁵.

Em contrapartida, o exercício crônico empregado aumentou a amplitude de contração nos animais diabéticos e controles. Para os animais diabéticos, tal fato indica que o exercício promoveu adaptações positivas nos cardiomiócitos que contribuem para atenuar algumas anormalidades mecânicas do miocárdio diabético observadas *in vivo*^{7,11,12}. Alguns mecanismos têm sido propostos como responsáveis pelo aumento da amplitude de contração dos cardiomiócitos de ratos diabéticos em resposta ao exercício crônico: há evidências que o exercício físico crônico pode normalizar o funcionamento do NCX e do cálcio calmodulina quinase II (CaMKII), reduzir o vazamento de Ca^{2+} do RS e aumentar o conteúdo de Ca^{2+} do RS^{7,15}.

O diabetes experimental prolongou o tempo necessário para o pico de contração celular. Isso indica que cardiomiócitos de animais diabéticos contraíam mais lentamente do que os de seus controles. Essa alteração tem implicações negativas na função cardíaca desses animais. A velocidade de contração dos cardiomiócitos 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

Tabela 2 - Dimensões dos cardiomiócitos dos ratos controles e diabéticos

	CS (n = 190)	CE (n = 149)	DS (n = 256)	DE (n = 253)
Comprimento (μ m)	$157,32 \pm 1,60^*$	$159,77 \pm 1,80^*$	$150,49 \pm 1,50$	$151,29 \pm 1,50$
Largura (μ m)	$22,38 \pm 0,41^*$	$22,97 \pm 0,44^{*†}$	$19,48 \pm 0,4$	$20,74 \pm 0,4^*$
Volume (pL)	$26,73 \pm 0,55^*$	$27,65 \pm 0,65^{*†}$	$22,19 \pm 0,5$	$24,00 \pm 0,5^*$
Comprimento/largura	$7,48 \pm 0,19$	$7,25 \pm 0,19$	$7,51 \pm 0,15$	$7,91 \pm 0,15$

Valores em média \pm EPM. n - número de cardiomiócitos; CS - controles sedentários; CE - controles exercitados; DS - diabéticos sedentários; DE - diabéticos exercitados; * - diferente de DS; † - diferente de DS e DE ($p < 0,05$).

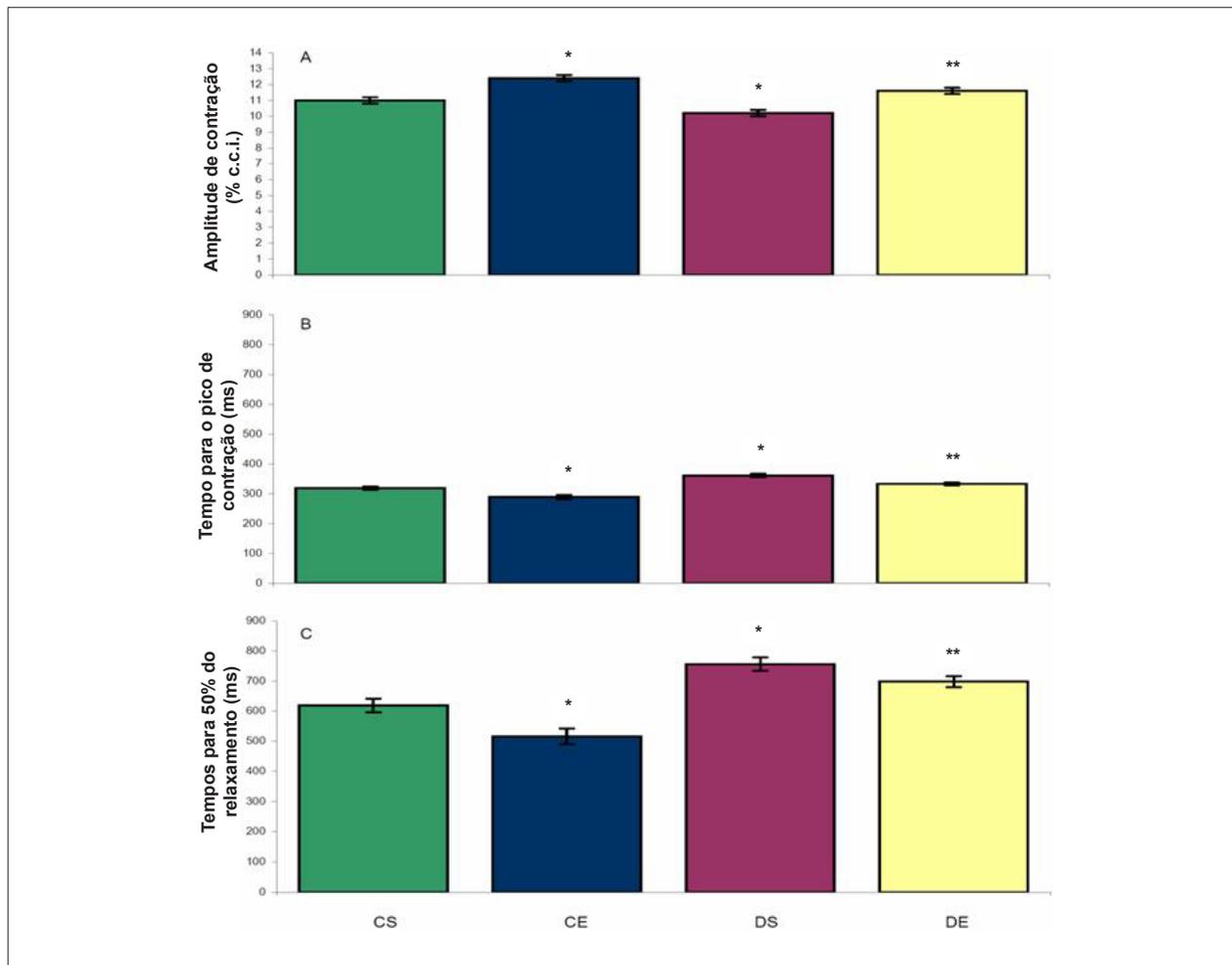


Fig. 1 - Função contrátil de cardiomiócitos de ratos controle e diabéticos. A - amplitude de contração; B - tempo para o pico de contração; C - tempo para 50% de relaxamento; CS - controles sedentários (106 células); CE - controles exercitados (78 células); DS - diabéticos sedentários (109 células); DE - diabéticos exercitados (153 células). Os dados são média \pm EPM*, diferente de CS**, diferente de DS ($p < 0,05$).

cruzadas²¹. Cardiomiócitos de animais diabéticos apresentam redução na expressão de proteínas regulatórias, tais como CaMKII, NCX, RyR2, SERCA2 e fosfolambana (PLB)^{5,7,15,24-26}, o que pode retardar a disponibilidade de Ca^{2+} para a contração celular.

Entretanto, o programa de natação reduziu o tempo para o pico de contração nos animais diabéticos. As adaptações ao exercício regular, que aceleram a disponibilidade de Ca^{2+} no citosol e aumentam a taxa de hidrólise de ATP, contribuem para tal redução. A velocidade de disponibilidade de Ca^{2+} no citosol é regulada principalmente pela velocidade de saída de Ca^{2+} do RS, via RyR2²¹. Há evidências de que o exercício físico regular aumenta a expressão e/ou a atividade dos RyR2 e a sensibilidade dos RyR2 e dos miofilamentos contráteis ao Ca^{2+} em animais diabéticos⁷. Além disso, o exercício físico é capaz de aumentar a densidade e a responsividade dos receptores betadrenérgicos em ratos diabéticos¹², o que pode afetar a velocidade de contração celular.

Demonstramos também que o diabetes experimental prolongou o tempo de relaxamento celular. O relaxamento dos cardiomiócitos depende da remoção do Ca^{2+} do citosol para o

RS (via SERCA2, PLB), para o meio extracelular (via NCX, Ca^{2+} ATPase do sarcolema) e para a mitocôndria (via transporte de Ca^{2+} mitocondrial)²¹. A expressão e a função dessas estruturas celulares estão diminuídas nos cardiomiócitos de animais diabéticos^{12,25-28}. Tal fato diminui a velocidade com que o Ca^{2+} é removido do citosol. Essas alterações estão associadas ainda à depressão da proteína quinase A (PKA) e CaMKII, proteínas estas responsáveis pela fosforilação da 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 celular²⁶. Tais achados em nível celular são compatíveis com as disfunções diastólicas observadas em corações diabéticos *in vivo*^{7,11}.

O programa de natação aplicado, por sua vez, reduziu o tempo de relaxamento dos cardiomiócitos dos animais diabéticos. Esse efeito tem sido atribuído à capacidade do exercício regular de aumentar a velocidade de remoção de Ca^{2+} do citosol via aumento da expressão de SERCA2 e PLB^{7,15}, normalização da expressão e função dos NCX, redução na fosforilação de CaMKII e restauração da densidade de túbulos transversos¹⁵.

O programa de natação aplicado não alterou a glicemia de jejum dos animais controles e diabéticos em repouso. Nos animais diabéticos, a STZ induz a apoptose das células β -pancreáticas²⁹, o que inibe a secreção de insulina. É possível também que tenha havido um aumento na secreção de glucagon em tais animais³⁰ e sua ação contrarregulatória tenha auxiliado na manutenção da hiperglicemia. Nossos resultados são coerentes com os de outros estudos^{7,11-14,31}, apesar destes terem utilizado protocolos de exercício diferentes (i.e., esteira rolante). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o exercício foi capaz de melhorar o metabolismo de glicose em ratos diabéticos^{32,33}. Provavelmente, a falta de consenso entre os resultados desses estudos é devida ao uso de diferentes procedimentos metodológicos.

Os animais diabéticos apresentaram poliúria e polidipsia características do diabetes, mas, apesar de alimentarem-se normalmente, sem restrição alimentar [ex., consumo semanal de ração (diabéticos: $199,47 \pm 3,55$ g vs controles: $194,36 \pm 4,4$ g)], movimentarem-se livremente dentro da caixa de alojamento (grupo DS) e exercitarem-se (grupo DE), não ganharam tanto peso quanto os controles não diabéticos. Os menores pesos corporais e ventriculares dos animais diabéticos indicam que eles tiveram o crescimento prejudicado. Em ratos com diabetes induzida por STZ, além da secreção de insulina, a secreção de hormônios, tais como o hormônio de crescimento, o glucagon, o polipeptídeo pancreático e, por consequência, o fator de crescimento similar à insulina, são alteradas e afetam o crescimento³⁴⁻³⁶. Sabe-se também que o diabetes induz o aumento da utilização de ácidos graxos e acelera o catabolismo proteico³⁷.

Ainda assim, o programa de natação aplicado não foi capaz de alterar significativamente o peso corporal dos animais diabéticos ou não diabéticos, mas aumentou o peso absoluto dos ventrículos nos animais não diabéticos. Entretanto, mais importante, tanto o diabetes quanto o programa de natação aumentaram o peso relativo dos ventrículos nos animais diabéticos e o programa de natação aumentou este parâmetro

nos animais controles não diabéticos, o que denota hipertrofia ventricular. Hipertrofia cardíaca induzida por diabetes experimental (patológica) e por exercício crônico (fisiológica) já foram documentadas em estudos prévios^{7,14,17,31}.

A redução nas dimensões dos cardiomiócitos nos animais diabéticos em relação aos controles, observada no presente estudo, é coerente com o menor peso ventricular apresentado pelos animais diabéticos. Todavia, o programa de natação utilizado aumentou o volume dos cardiomiócitos dos ratos diabéticos. Tal fato sugere que a inibição do crescimento celular provocada pelo diabetes foi afetada pelo exercício físico aplicado e denota hipertrofia celular. De fato, o aumento do peso relativo do ventrículo nos animais do grupo DE foi mais pronunciado que nos animais CE (33,3% vs 31,5%, respectivamente).

Conclusão

Concluímos que o programa de treinamento em natação aplicado atenuou a disfunção contrátil dos cardiomiócitos do VE de ratos com diabetes experimental. Esses achados são relevantes para o conhecimento, em nível celular, dos benefícios do exercício físico na função contrátil do músculo cardíaco de indivíduos com diabetes tipo I.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPEMIG.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Márcia Ferreira da Silva pela Universidade Federal de Viçosa.

Referências

- Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2004;25(4):543-67.
- Jweied EE, McKinney RD, Walker LA, Brodsky I, Geha AS, Massad MG, et al. Depressed cardiac myofilament function in human diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(6):H2478-83.
- Lacombe VA, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Sridhar A, Emani S, Bonagura JD, et al. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(5):R1787-97.
- Reuter H, Gronke S, Adam C, Ribati M, Brabender J, Zobel C, et al. Sarcoplasmic Ca²⁺ release is prolonged in nonfailing myocardium of diabetic patients. *Mol Cell Biochem.* 2008;308(1-2):141-9.
- Kim HW, Ch YS, Lee HR, Park SY, Kim YH. Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression. *Life Sci.* 2001;70(4):367-79.
- Bracken N, Howarth FC, Singh J. Effects of streptozotocin-induced diabetes on contraction and calcium transport in rat ventricular cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1084:208-22.
- Shao CH, Wehrens XH, Wyatt TA, Parbhu S, Rozanski GJ, Patel KP, et al. Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol.* 2009;106(4):1280-92.
- Lehmann R, Kaplan V, Bingisser R, Bloch KE, Spinas GA. Impact of physical activity on cardiovascular risk factors in IDDM. *Diabetes Care.* 1997;20(10):1603-11.
- Searls YM, Smirnova IV, Fegley BR, Stehno-Bittel L. Exercise attenuates diabetes-induced ultrastructural changes in rat cardiac tissue. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(11):1863-70.
- Monteiro P, Gonçalves L, Providencia LA. Diabetes and cardiovascular disease: the road to cardioprotection. *Heart.* 2005;91(12):1621-5.
- Loganathan R, Bilgen M, Al-Hafez B, Zhero SV, Alenezny MD, Smirnova IV. Exercise training improves cardiac performance in diabetes: in vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. *J Appl Physiol.* 2007;102(2):665-72.
- Bidasee KR, Zheng H, Shao CH, Parbhu SK, Rozanski GJ, Patel KP. Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of beta-adrenoceptors. *J Appl Physiol.* 2008;105(3):907-14.

13. Howarth FC, Almagaddum FA, Qureshi MA, Ljubisavijevic M. Effects of varying intensity exercise on shortening and intracellular calcium in ventricular myocytes from streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2008;317(1-2):161-7.
14. Howarth FC, Almagaddum FA, Qureshi MA, Ljubisavijevic M. The effects of heavy long-term exercise on ventricular myocyte shortening and intracellular Ca^{2+} in streptozotocin-induced diabetic rat. *J Diabetes Complications.* 2009;24(4):278-85.
15. Stolen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, et al. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca^{2+} control, and SR Ca^{2+} release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res.* 2009;105(6):527-36.
16. Medeiros A, Gianolla RM, Kalil LMP, Bacurau RFP, Rosa LFBC, Negrão CE, et al. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Rev paul Educ Fis.* 2000;14(1):7-15.
17. Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM, White E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 2002;541(Pt 3):863-75.
18. Prímola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, et al. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *J Appl Physiol.* 2009;107(2):593-8.
19. Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA, Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, et al. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(3):238-46.
20. Satoh H, Delbridge LM, Blatter LA, Bers DM. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys J.* 1996;70(3):1494-504.
21. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:23-49.
22. Howarth FC, Qureshi MA. Myofilament sensitivity to Ca^{2+} in ventricular myocytes from the Goto-Kakizaki diabetic rat. *Mol Cell Biochem.* 2008;315(1-2):69-74.
23. Ren J, Bode AM. Altered cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from spontaneously diabetic BB rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(1):H238-44.
24. Bidasee KR, Nallani K, Yu Y, Cocklin RR, Zhang Y, Wang M, et al. Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. *Diabetes.* 2003;52(7):1825-36.
25. Bidasee KR, Zhang Y, Shao CH, Wang M, Patel KP, Dincer UD, et al. Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Diabetes.* 2004;53(2):463-73.
26. Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, et al. Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(4):H1398-408.
27. Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, et al. Diminished function and expression of the cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in diabetic rats: implication in Ca^{2+} overload. *J Physiol.* 2000;527(Pt 1):85-94.
28. Vasanji Z, Cantor EJ, Juric D, Moyen M, Neticadan T. Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;291(4):C772-80.
29. Konrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, Kudlow JE. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem J.* 2001;356(1):31-41.
30. Ponery AS, Adeghate E. Distribution of NPY and SP and their effects on glucagon secretion from the in vitro normal and diabetic pancreatic tissues. *Peptides.* 2000;21(10):1503-9.
31. Howarth FC, Marzouqi FM, Al Saeedi AM, Hameed RS, Adeghate E. The effect of a heavy exercise program on the distribution of pancreatic hormones in the streptozotocin-induced diabetic rat. *JOP.* 2009;10(5):485-91.
32. Broderick TL, Poirier P, Gillis M. Exercise training restores abnormal myocardial glucose utilization and cardiac function in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005;21(1):44-50.
33. Hall JL, Sexton WL, Stanley WC. Exercise training attenuates the reduction in myocardial GLUT-4 in diabetic rats. *J Appl Physiol.* 1995;78(1):76-81.
34. Gomes RJ, Leme JA, de Moura LP, de Araújo MB, Rogatto GP, de Moura RF, et al. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(4):199-204.
35. de Almeida Leme JA, de Araújo MB, de Moura LP, Gomes RJ, de Moura RF, Rogatto GP, et al. Effects of physical training on serum and pituitary growth hormone contents in diabetic rats. *Pituitary.* 2009;12(4):304-8.
36. Menon RK, Stephan DA, Rao RH, Shen-Orr Z, Downs LS, Roberts CT, et al. Tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol.* 1994;142(3):453-62.
37. Howarth FC, Chandler NJ, Kharche S, Tellez JO, Greener ID, Yamanashi TT, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein expression in ventricular muscle. *Mol Cell Biochem.* 2008;319(1-2):105-14.