

MÁRCIA FERREIRA DA SILVA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO COM INSULINOTERAPIA
SOBRE O MIOCÁRDIO DE RATOS COM DIABETES INDUZIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586e
2014 Silva, Márcia Ferreira da, 1982-
Efeitos do treinamento físico combinado com
insulinoterapia sobre o miocárdio de ratos com diabetes induzida
/ Márcia Ferreira da Silva. – Viçosa, MG, 2014.
xix, 101f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes. 2. Insulina. 3. Exercícios físicos. 4. Miocárdio.
5. Ratos como animal de laboratório. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 616.462

MÁRCIA FERREIRA DA SILVA

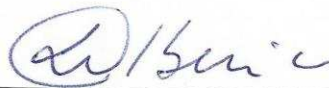
**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO COMBINADO COM
INSULINOTERAPIA SOBRE O MIOCÁRDIO DE RATOS COM
DIABETES INDUZIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

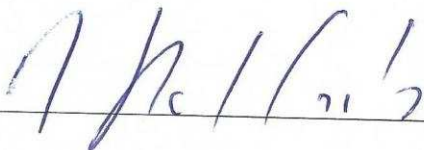
APROVADA: 10 de outubro de 2014



Prof.ª. Dr.ª Sirlene Souza Rodrigues Sartori



Prof.ª. Dr.ª Luciane Carla Alberici



Prof. Dr.º. Ricardo Junqueira Del Carlo



Prof. Dr.º. Washington Pires



Prof.ª. Dr.ª Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado

(Orientadora)

A Deus pela vida

A meus pais pelo amor

A meus irmãos pelo apoio constante

A meus sobrinhos pelo carinho e doçura

À meus avós Maria (in memoriam)

e Antônio (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela presença viva em minha vida “Tudo é do Pai”.

Ao meu pai Vicente e minha mãe Terezinha pelo amor e dedicação sempre.

Aos meus irmãos Marcos, Marylane, Guilherme e Patrícia, pela confiança, amor e incentivo constantes.

Aos meus sobrinhos Túlio, Miguel, Maria Tereza, Luíz Guilherme e Maria Luiza pelo amor e carinho “Tia Márcia! Você traz um ratinho pra mim?”

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

À minha orientadora Izabel Maldonado minha gratidão pelos ótimos momentos de aprendizado e pela alegria em me receber como orientada.

Ao Professor Natali pela co-orientação e dedicação ao trabalho.

À Professora Luciane Alberici pelos ensinamentos e atenção ao me receber em seu laboratório.

À Ieda Prado pela disponibilidade nos experimentos e pelo carinho.

Ao Professor José Eduardo Serrão pela receptividade e atenção.

Ao meu eterno amigo Rafael Andrade, obrigado pela confiança sempre.

Ao meu amigo Bruno pela amizade e companheirismo de sempre “calma desespero”!

Ao amigo Bozi pela companheirismo.

Ao amigo Gilton pela parceria

Ao companheiro de experimentos Edson pelas contribuições

Aos companheiros do Bioex: Lucas, Aurora, Regiane, Felipe Rios, Felipe Belfort, Anselmo, Peixe, Helder, Joel, Danilo e Poliana pelo apoio nos experimentos.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise pela receptividade.

A todos que contribuíram de alguma forma, obrigada!

BIOGRAFIA

MÁRCIA FERREIRA DA SILVA, filha de Vicente Luiz da Silva e Terezinha Ferreira da Silva, nasceu na cidade de Capelinha, Vale do Jequitinhonha, estado de Minas Gerais, em 05 de maio de 1982.

Em maio de 2002 ingressou no curso de Educação Física na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais, foi concluído em outubro de 2006. Após diplomar-se, em 2006, iniciou o exercício da docência no ensino fundamental e médio ministrando aulas de Ciências e Educação Física.

Em 2008 iniciou o curso de Mestrado em Educação Física no Programa de Pós-Graduação em Educação Física na Universidade Federal de Viçosa e concluiu em abril de 2010 na linha de pesquisa Aspectos Biodinâmicos do Movimento Humano.

Em 2010 ingressou no Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural no Departamento de Biologia Geral (DBG) da UFV.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. HIPÓTESE.....	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
4.1 O MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES.....	4
4.2 ALTERAÇÕES NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS DIABÉTICOS.....	5
4.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM INSULINA OU DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARDIOMIÓCITOS DE RATOS DIABÉTICOS.....	7
4.4 EFEITOS DO DIABETES NA FUNÇÃO CARDÍACA E NA HOMEOSTASIA DE Ca^{2+}	10
4.5 EFEITOS DO TRATAMENTO COM INSULINA OU DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA E HOMEOSTASIA DE Ca^{2+} NO DIABETES.....	15
4.6 EFEITOS DO DIABETES SOBRE A MORFOLOGIA E FUNÇÃO MITOCONDRIAL	19
4.7 EFEITOS DO TRATAMENTO COM INSULINA OU DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A MORFOLOGIA E FUNÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS CARDÍACAS DE DIABÉTICOS.....	22

5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1 ANIMAIS.....	24
5.1.1 TRATAMENTO DOS ANIMAIS	24
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
5.3PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	26
5.3.1 INDUÇÃO DO DIABETES	26
5.3.2IMPLANTE DE ELETRODOS E PARA AQUISIÇÃO DO ELETROCARDIOGRAMA.....	26
5.4TREINAMNETO FÍSICO	26
5.5 EXAMES	27
5.5.1 ELETROCARDIOGRAMA.....	27
5.5.2 ECOCARDIOGRAMA.....	28
5.6 MEDIDAS E CÁLCULOS.....	28
5.6.1 ÍNDICE DE HIPERTROFIA CARDÍACA.....	28
5.6.2 ISOLAMENTO DOS MIÓCITOS CARDÍACOS.....	29
5.6.3 MENSURAÇÃO DO TRANSIENTE DE CÁLCIO $[Ca^{2+}]_i$	29
5.6.4 ANÁLISE DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL	30
5.6.5 INCUBAÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS	30
5.6.6 MONITORAMENTO DO ENSAIO MITOCONDRIAL.....	31
5.6.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm.....	31
5.6.8 ESTADO REDOX DO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	32
5.6.9 ULTRAESTRUTURA DO MIOCÁRDIO.....	32
5.6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33

6. RESULTADOS.....	33
BIOMETRIA, GLICEMIA E PARÂMETROS ELETRO E ECOCARDIOGRÁFICOS.....	33
6.1 TRANSIENTE DE $[Ca^{2+}]_i$	37
6.2 FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	37
6.4 ULTRAESTRUTURA MITOCONDRIAL.....	45
7. DISCUSSÃO.....	46
8. CONSIDERAÇÕES.....	54
9. CONCLUSÕES.....	55
10. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	55
11. APLICABILIDADE DO ESTUDO PARA HUMANOS DIABÉTICOS.....	56
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
13. ANEXOS.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP- Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

AMPC – Adenosina monofosfato cíclica

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

ATPase – Enzima que catalisa a hidrólise do ATP

BBDR- Bio-Breeding Diabetes Resistant Rat

Ca^{2+} – Íon cálcio

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ – concentração intracelular de cálcio

CaCl_2 – Cloreto de cálcio

CaMKII – Cálcio calmodulina quinase II

CE – Controle exercitado

Cl-Íon cloreto

cm – Centímetro

CO_2 – Dióxido de carbono

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CS – Controle sedentário

CSA – Ciclosporina A

DE – diabético exercitado

DEI –diabético exercitado tratado com insulina

DM – Diabetes mellitus

DMSO– Dimetilsulfóxido

DMT1– Diabetes mellitus tipo 1

DP – Desvio padrão

DS– diabético sedentário

DSI – diabetic sedentário tratado com insulina

ECG– Eletrocardiograma

ECO– Ecocardiograma

EGTA – Ácido tetracético etilenoglicol

EPM – Erro padrão da media

FCR – Frequência cardíaca de repouso

GH- Hormônio do crescimento

g/L – Gramas por litro

GLUT 4 – Transportador de glicose 4

GSH– Glutathione reduzida

GSK-3 – Glicogênio Sintase quinase 3

GSSG– Glutathione oxidada

H₂O₂– Peróxido de Hidrogênio

HCO₃ – Íon bicarbonato

HEPES – Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2'Etanossulfônico

Hz – Hertz I_{Ca} – corrente de Ca^{2+}

I_{CaL} - Corrente de cálcio tipo L

IDF- International Diabetes Federation

K^{+} – Íon potássio

KCl – Cloreto de potássio

KOH- Hidróxido de potássio

L – Litro

LDH – Lactato desidrogenase

m – Metro

M – Molar

mg – Miligrama

Mg^{2+} – Íon magnésio

$MgCl_2$ – Cloreto de magnésio

min – Minuto

mL – Mililitro

ms – Milisegundo

mm – Milímetro

mM – Milimolar

μ L – Microlitro

$\square$ m – Micrômetro

□M– Micromolar

mmHg – Milímetro de mercúrio

NPH – Neutral Protamine Hagedorn

NAD- nicotinamida adenina dinonucleotídeo

Na⁺ – Íon sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NCX – trocador de sódio-cálcio

nm– Nanômetro

NOX4- NADPH oxidase 4

O₂ – Oxigênio

O₂^{•-} – radical superóxido

°C – Graus Celsius

PDH – Piruvato desidrogenase

pH – Potencial hidrogeniônico

pi- fosfato inorgânico

PKA – Proteína quinase dependente de AMPc

PKB – Proteína quinase B

PKC – Proteína quinase C

pL – Picolitro

PLB – Fosfolambam

PN – Programa de natação

PTPM - Poro de transição de permeabilidade mitocondrial

RNAm - RNA mensageiro

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rpm – Rotações por minuto

RT- PCR – Reação em cadeia de polymerase com transcrição reversa

RS - Retículo sarcoplasmático

RyR2 – Canais receptores de rianodina

seg – Segundo

SERCA2 – Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático

SO₄ – Íon sulfato

SOD – Superóxido dismutase

SOD mn- Superóxido dismutase de manganês

SOD zn- Superóxido dismutase de zinco

STZ – estreptozotocina

u/L – Unidades por litro

UCP – Proteína desacopladora

UI – Unidades internacionais

VO₂máx – Consumo máximo de oxigênio

vs – Versus

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Cronologia dos procedimentos experimentais realizados nos experimentos 1, 2 e 3.....	25
FIGURA 2. Peso corporal e glicose sanguínea dos grupos durante o período experimental.....	35
FIGURA 3. Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos.....	38
FIGURA 4. Transcrição de proteína desacopladora 2 (UCP2) no ventrículo esquerdo de corações de ratos.....	39
FIGURA 5. Produção de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo de corações de ratos.....	40
FIGURA 6. Dinâmica de Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo de corações de ratos.....	42
FIGURA 7. Parâmetros de estado redox em ventrículo esquerdo de corações de ratos.....	44
FIGURA 8. Ultraestrutura de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos de corações de ratos.....	45
FIGURA 9. Esquema representativo da função mitocondrial em cardiomiócitos de animais normais e diabéticos.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Protocolo de treinamento físico	27
TABELA 2. Sequência dos primers utilizados para os ensaios de RT-PCR para Proteína desacopladora 2 (UCP2), NADPH oxidase -4 (Nox4) e β -actina.....	31
TABELA 3. Biometria, glicemia e parâmetros eletro e ecocardiográficos	36
TABELA 4. Fosforilação (Estado III) e Repouso (Estado IV) e Razão de Controle Respiratório (Estado III/ Estado IV) nas mitocôndrias dos grupos experimentais.....	38

RESUMO

SILVA, Márcia Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Efeitos do treinamento físico combinado com insulinoterapia sobre o miocárdio de ratos com diabetes induzida.** Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

O Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) ocorre devido a diminuição na secreção de insulina pelo pâncreas, comprometendo vários órgãos. Está frequentemente associado a disfunções cardíacas que caracterizam a cardiomiopatia diabética. O tratamento farmacológico do DMT1 faz-se por meio da insulinoterapia e o exercício físico tem sido usado como estratégia não-farmacológica. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos de um programa de treinamento em natação associado ao tratamento com insulina sobre o miocárdio de ratos com DMT1 experimental. Sessenta ratos Wistar com 30 dias de idade foram separados em seis grupos experimentais (n=10), a saber: controle Sedentário (CS); diabético sedentário (DS); diabético sedentário tratado com insulina (DSI); controle exercitado (CE); diabético exercitado (DE); e diabético exercitado tratado com insulina (DEI). O diabetes foi induzido por uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de massa corporal) diluída em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4.5), enquanto os animais controles receberam a mesma dose do veículo. O tratamento com insulina foi iniciado sete dias após a indução do diabetes e consistiu de uma injeção subcutânea diária de 1-4 UI de insulina, durante oito semanas. O tratamento com exercício foi iniciado sete dias após a indução do diabetes ou uso do veículo e consistiu de 90 minutos diários de natação, 5 dias por semana, durante oito semanas. O projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Viçosa (nº 51/2011). Após os tratamentos os animais foram avaliados por eletrocardiograma e ecocardiograma para análise do ritmo cardíaco e da função ventricular esquerda, respectivamente. Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram os corações removidos para análise do transiente intracelular global de cálcio $[Ca^{2+}]_i$, da ultraestrutura e da função mitocondrial. O diabetes reduziu a fração de encurtamento e a fração de ejeção do VE e prolongou os intervalos QT e QTc, além de reduzir a frequência cardíaca de repouso dos animais. O treinamento físico associado ao tratamento com insulina aumentou a frequência cardíaca de repouso, as frações de encurtamento e de ejeção e reduziu os intervalos QT e QTc. O diabetes reduziu a amplitude e prolongou o tempo para o decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, aumentou a captação mitocondrial de cálcio, a expressão de NADPH oxidase 4 (Nox 4) e de proteína desacopladora 2 (UCP 2) e reduziu a expressão de superóxido

dismutase (SOD). Por outro lado, o programa de natação associado ao tratamento com insulina aumentou a amplitude e reduziu o tempo para o decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a expressão de Nox4 e de UCP2. Mitocôndrias isoladas dos ratos diabéticos produziram menores quantidades de H_2O_2 que as dos controles. A associação dos tratamentos normalizou a liberação de H_2O_2 mitocondrial desses animais. Houve aumento na razão GSH/GSSG nos corações dos animais diabéticos. Esse aumento não foi afetado pelos tratamentos, tanto isolados quanto combinados. Ocorreu maior oxidação de proteínas no miocárdio dos animais diabéticos, tendo sido esse efeito revertido pelo tratamento com insulina, isoladamente ou em combinação com o treinamento físico. O diabetes induziu desorganização das cristas mitocondriais e aumentou o volume mitocondrial. A combinação dos tratamentos atenuou essas anormalidades. Em conclusão, o treinamento em natação associado à terapia com insulina, durante oito semanas, atenua os efeitos deletérios do DMT1 sobre o miocárdio de ratos.

ABSTRACT

SILVA, Márcia Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, october, 2014. **Effects of physical training combined with insulin therapy on the myocardium of rats with induced diabetes.** Adviser: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

The Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) occurs due to decreased insulin secretion in the pancreas, which undertakes various organs. This disease is often associated with cardiac dysfunctions that characterize diabetic cardiomyopathy. The pharmacological treatment of T1DM is done by insulin and exercise has been used as a non-pharmacological strategy. The aim of this study was to investigate the effects of a swimming training program associated with insulin therapy on the myocardium of rats with experimental T1DM. Sixty male Wistar rats with 30 days of age at the onset of the experiment were divided into six experimental groups (n = 10), namely: sedentary control (CS); sedentary diabetic (DS); sedentary diabetic treated with insulin (DSI); exercised control (CE); exercised diabetic (DE); and insulin-treated diabetic exercised (DEI). Diabetes was induced by an injection of streptozotocin (i.p. 60 mg / kg body weight) diluted in sodium citrate buffer (0.1M, pH 4.5), whereas control animals receive the same dosage of the vehicle. The insulin therapy was initiated seven days after the induction of diabetes and consisted of a daily subcutaneous injection of 1-4 IU of insulin (i.p), for eight weeks. The exercise training was initiated seven days after the induction of diabetes or the use of placebo and consisted of swimming 90 minutes/day, five days/week, for eight weeks. The project was approved by the Ethics Committee on the use of animals of the Federal University of Viçosa (No. 51/2011). After treatments, the animals were evaluated by electrocardiography and echocardiography to analyze heart rate and left ventricular function, respectively. Then the animals were euthanized and the hearts were removed to analyze the intracellular global calcium transient ($[Ca^{2+}]_i$), oxidative stress, as well as mitochondrial ultrastructure and function. Diabetes reduced both fractional shortening and ejection fraction of the left ventricle, prolonged QT and QTc intervals and reduced resting heart rate. The exercise training program associated with insulin treatment increased the resting heart rate, fractional shortening and ejection fraction and reduced the QT and QTc intervals. Diabetes reduced the amplitude and prolonged the decay time of the $[Ca^{2+}]_i$, increased mitochondrial calcium uptake, the expression of NADPH oxidase 4 (Nox 4) and of uncoupling protein 2 (UCP 2), and decreased the expression of superoxide dismutase (SOD). Exercise training associated with insulin treatment increased the amplitude and decreased the decay time of the $[Ca^{2+}]_i$, the expression of UCP2 and of Nox4. Mitochondria isolated from

diabetic rats produced smaller quantities of H_2O_2 , as compared to controls. Neither exercise training nor insulin treatment alone affected mitochondrial H_2O_2 production. However, the combination of treatments normalized mitochondrial H_2O_2 release. It was observed an increased GSH / GSSG ratio in the hearts of diabetic animals. Such change was not affected by the treatments either isolated or in combination. There was higher protein oxidation in the hearts of diabetic rats; however, this effect was attenuated by either insulin treatment itself or in combination with exercise training. DMT1 disrupted mitochondrial cristae and augmented mitochondrial volume. Exercise training combined with insulin treatment attenuated such abnormalities. In conclusion, swimming training associated with insulin therapy during eight weeks attenuates the deleterious effects of DMT1 on the myocardium of rats.

1. INTRODUÇÃO

Dados recentes indicam que o Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica que afeta 382 milhões de pessoas. A perspectiva é que em 2035 esse número aumente para 592 milhões (IDF, 2014). O DM é um distúrbio do metabolismo de carboidratos que apresenta, entre outras manifestações, a hiperglicemia contínua ou intermitente. O DM Tipo 1 (DMT1) 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 2 (DMT2) é devido a resistência das células alvo à insulina (Fang et al., 2004; Aires, 2008; Howarth et al., 2008).

Na ausência de insulina, a hiperglicemia crônica advinda do DMT1, causa alterações funcionais, estruturais e metabólicas em nível celular e tecidual que comprometem diferentes órgãos. No miocárdio, o DM desenvolverá cardiomiopatia diabética que gerará distúrbios no ritmo e na contratilidade do miocárdio que, em associação a outras alterações, prejudicam o desempenho cardíaco. Ratos com diabetes induzido por estreptozotocina apresentam redução da frequência cardíaca, da fração de ejeção, do volume de ejeção, do débito cardíaco, e ainda exibem contrações espontâneas no átrio direito e aumento do conteúdo de colágeno no interstício cardíaco. Em nível celular, cardiomiócitos de animais com diabetes apresentam aumento do estresse oxidativo (produção de espécies reativas de oxigênio), aumento da biogênese mitocondrial, aumento da expressão de cálcio-calmodulina quinase II (CaMKII), aumento da captação mitocondrial de Ca^{2+} , entre outras alterações (Fang et al., 2004, Bidasee et al., 2008; Duncan, 2011, Nishio et al., 2012, Dhalla et al., 2012; Teshima et al., 2014).

Essas alterações resultam em disfunção sistólica e diastólica, principalmente pela diminuição da complacência e da contratilidade do miocárdio (Das, 1989; Loganathan et al., 2007; Saunders et al., 2008). Ocorre também o comprometimento da função dos receptores de rianodina (RYR) e ATPase sarcoplasmática (SERCA), consequentemente, há redução no conteúdo de Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático, aumento do Ca^{2+} citoplasmático, e comprometimento da contração e relaxamento dos cardiomiócitos (Shao et al., 2009; Silva et al., 2010).

Nessa situação, as mitocôndrias cardíacas têm um papel crucial, principalmente, na resposta adaptativa servindo como um local de depósito do excesso de Ca^{2+} intracelular (Dhalla et al., 1982). Entretanto, a utilização de ácidos graxos como fonte primária de energia, por um período prolongado, resulta em aumento do estresse oxidativo e comprometimento da morfologia e função dessas organelas no coração diabético (Searls et

al., 2004; Dhalla et al., 2014). A elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), induzida pelo aumento do metabolismo de lipídeos incorre em aumento do dano oxidativo nos cardiomiócitos. Esse dano celular está relacionado diretamente com a oxidação de proteínas, conversão de lipídeos em produtos reativos, nitração de tirosina, assim como geração de espécies reativas de nitrogênio e interação com DNA mitocondrial. Além disso, o aumento dos níveis de EROS no DMT1 está associado a diminuição da eficiência de superóxido dismutases (superóxido dismutase de zinco e superóxido dismutase de manganês), catalase e do sistema glutatona peroxidase no miocárdio (Bugger & Abel, 2010).

Por outro lado, estudos em animais e seres humanos com DMT1 tem mostrado que a terapia com insulina reduz alterações estruturais e bioquímicas no coração de diabéticos. Além de possibilitar o controle glicêmico, a insulina promove outros benefícios celulares que contribuem para a redução das complicações cardíacas decorrentes do diabetes. Moreira et al. (2006) verificaram que disfunções mitocondriais como aumento da captação mitocondrial de Ca^{2+} , aumento da produção de H_2O_2 e aumento de coenzima Q foram normalizadas após 4 semanas de terapia com insulina. Na mesma linha, Lahaye et al. (2012) mostraram que o tratamento com insulina aumenta a expressão de SERCA em cardiomiócitos de ratos diabéticos, o que pode atenuar a disfunção diastólica.

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; Loganathan et al. 2012). Além disso, o exercício físico atenua as disfunções contráteis em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo, o que contribui para o melhor funcionamento cardíaco na presença de diabetes mellitus como sugere Silva et al. (2010).

Estudos têm buscado esclarecer os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelos potenciais efeitos benéficos do exercício físico regular sobre a função cardíaca em modelos experimentais de DMT1 (Howarth et al., 2008; Bidasee et al., 2008; Shao et al., 2009; Howarth et al., 2009; Silva et al., 2010). Porém, poucos estudos (Lahaye et al., 2010; Lahaye et al., 2012) tem analisado os efeitos da combinação entre o treinamento físico e insulina sobre o miocárdio de animais ou seres humanos com DMT1.

Assim, o presente estudo foi desenvolvido para investigar os efeitos do exercício físico regular associado ao tratamento com insulina sobre o miocárdio de ratos com diabetes mellitus tipo 1 experimental, relacionando parâmetros moleculares, funcionais e estruturais dos cardiomiócitos com a disfunção cardíaca observada na cardiomiopatia diabética.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos de um programa de treinamento em natação associado ao tratamento com insulina sobre o miocárdio de ratos com diabetes mellitus tipo 1 experimental

2.2. Objetivos Específicos

- a) Verificar os efeitos do tratamento com insulina sobre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a função mitocondrial, o estresse oxidativo e a ultraestrutura de cardiomiócitos de ratos com DMT1 experimental;
- b) Verificar os efeitos do treinamento com natação sobre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a função mitocondrial, o estresse oxidativo e a ultraestrutura de cardiomiócitos de ratos com DMT1 experimental;
- c) Verificar se a combinação de insulino-terapia e treinamento físico induzem efeitos mais pronunciados sobre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a função mitocondrial, o estresse oxidativo e a ultraestrutura de cardiomiócitos de ratos com DMT1 experimental quando comparado aos efeitos induzidos separadamente por cada um dos dois tratamentos.

3. HIPÓTESE

O treinamento físico associado a insulina é mais eficiente em atenuar as disfunções cardíacas em animais diabéticos do que ambos os tratamentos isolados.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. O modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina

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.

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

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

4.2 Alterações no metabolismo energético de cardiomiócitos 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).

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), senão é inibida por frutose 1,6 bifosfato e 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 (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 captação 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, 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, contribuindo para elevação da 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, contribuindo 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).

Por serem as principais geradoras de energia no miocárdio, as mitocôndrias são organelas alvo em doenças ligadas diretamente ao metabolismo energético. Disfunções

mitocondriais, na presença de DM, podem causar efeitos deletérios nas células cardíacas. Animais knockout 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 diabética (An & Rodrigues, 2006). Além disso, 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 cardiomiócitos de ratos com DM tipo 2 apresentavam depressão na atividade enzimática de piruvato desidrogenase (PDH) e concomitante redução na oxidação de piruvato, podendo aumentar o desequilíbrio na utilização de substratos pelas células cardíacas.

Paralelamente, o excesso de glicose pode afetar o crescimento e o desenvolvimento das células cardíacas, assim como o seu processo contrátil. 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. Há também redução na formação de novas miofibrilas, em particular quanto aos filamentos de miosina de cadeia pesada (Dyntar et al., 2006).

Ademais, o aumento na concentração extracelular de glicose implica em prolongamento do potencial de ação dos miócitos cardíacos, afetando o acoplamento excitação-contração com aumento do tempo de relaxamento (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 as altas doses de glicose extracelular interferem no acoplamento excitação-contração do cardiomiócito comprometendo os eventos iniciais por induzir 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 ser responsável pelo prolongamento do potencial de ação das células cardíacas (Bers, 2002).

Além disso, Mazumder et al. (2004) mostraram que corações de animais diabéticos como os camundongos ob/ob consomem 30% mais oxigênio quando comparados a corações de não-diabéticos, enquanto geram a mesma ou menor quantidade de força contrátil. Para Bayeva, Sawicki & Ardehali (2013) as razões para essa ineficiência metabólica do coração de diabéticos são múltiplas e relacionadas às disfunções no balanço energético dos cardiomiócitos. Um dos fatores relacionados a essas disfunções é o aumento do metabolismo de ácidos graxos que aumenta o consumo de oxigênio pelo miocárdio. Ainda, esse aumento na oxidação lipídica está associado à desacoplamento mitocondrial e à redução do potencial de membrana das mitocôndrias por UCP2 e UCP3.

Logo, as alterações no metabolismo energético dos cardiomiócitos no DM precedem as demais anormalidades na estrutura e função cardíaca.

4.3. Efeitos do tratamento com insulina ou do treinamento físico aeróbico sobre o metabolismo energético de cardiomiócitos 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 (Lahaye et al 2012).

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células beta-pancreáticas que atua como regulador chave do metabolismo de substratos pelas células, especialmente no metabolismo de glicose. Esse hormônio regula também a expressão gênica, a proliferação celular, o fluxo de íons e a apoptose (Myers et al.,1996). Em cardiomiócitos, a insulina estimula diretamente a captação de glicose pelo aumento na translocação de transportador de glicose-4 (GLUT-4) até a superfície celular. Além disso, esse hormônio inibe a liberação de ácidos graxos não-esterificados (NEFAS) pelo tecido adiposo, estimulando a glicólise e dessa forma aumentando a oxidação dos carboidratos. Este efeito da insulina sobre o metabolismo cardíaco de glicose é determinado pela concentração local de insulina e pela intensidade do exercício/contração (Taegtmeyer, Mc Nuety & Young, 2002).. Além disso, a insulina atua na regulação do tamanho do coração, na expressão de isoformas de miosina, assim como na modulação do tipo de substrato que será utilizado pelas células cardíaca (glicose ou ácidos graxos). Com o objetivo de verificar os efeitos da insulina sobre o tamanho do coração, Belke et al. (2002) utilizaram ratos knockout para receptor de insulina e mostraram que esses animais apresentavam coração 20-30% menor que seus controles

devido a redução no tamanho dos cardiomiócitos. Além disso, essas células apresentaram expressão reduzida de GLUT1 e miosina de cadeia pesada.

As ações diretas da insulina sobre o metabolismo cardíaco estão ligadas especialmente ao rápido efeito da insulina sobre a atividade específica de enzimas chave e transportadores. Os efeitos da insulina sobre a expressão protéica também são notados, principalmente quando mudanças importantes acontecem durante a inanição e diabetes (Brownsey et al., 1997). No que se refere ao metabolismo de substratos para a produção de energia, a insulina atua estimulando a captação de glicose pelas células cardíacas por estimular a translocação de GLUT 4. Além disso, o papel da insulina na expressão de proteínas de GLUT tem sido identificado como forma de examinar os efeitos diretos desse hormônio in vitro e mudanças durante a inanição e no diabetes, situações onde o transporte de glicose no coração é bastante reduzido (Brownsey et al., 1997).

Além do exposto, a concentração de glicogênio em diabéticos tipo 1 (dependentes de insulina) é aumentada, enquanto situação contrária ocorre no fígado e nos músculos esqueléticos. Porém, o aumento nas taxas de glicogênio no coração, em situações de diabetes, ocorre sem aumento na oxidação de glicose. Isso está associado principalmente devido ao bloqueio na habilidade da insulina em induzir a ativação de glicogênio sintase (Laughlin et al 1994). Assim, é possível que o tratamento com insulina restabeleça as concentrações de glicogênio cardíaco e conseqüentemente a oxidação de glicose pelas células cardíacas. A insulina está ligada ainda a oxidação de piruvato, na oxidação de ácidos graxos e na regulação da glicólise nas células cardíacas. O complexo piruvato desidrogenase é o maior alvo para a ação da insulina. Assim, os efeitos da insulina surgem através do controle da entrega de substratos para o miocárdio e também pela ação direta da insulina sobre a atividade específica de piruvato desidrogenase. Dessa forma, a insulina aumenta a atividade de piruvato desidrogenase, estimulando a produção de ATP mitocondrial.

A regulação de GLUT e piruvato desidrogenase tem um papel importante no controle da glicólise que é geralmente coordenada com as taxas de oxidação de piruvato, aumentando em resposta a insulina e ao aumento da carga de trabalho cardíaco. Ainda, a insulina exerce uma rápida influência sobre fosfofrutoquinase I, regulando a sua atividade e conseqüentemente a velocidade da glicólise (Brownsey et al., 1997). A insulina também regula o metabolismo de ácidos graxos, sendo que essa regulação é dependente da regulação do transporte de glicose e piruvato desidrogenase nos cardiomiócitos. A ação da insulina na oxidação de ácidos graxos se dará principalmente através da regulação de lipases como

lipoproteína lipase e carnitina palmitoil transferase I, enzimas críticas no metabolismo de lipídeos no coração.

Isso indica que a administração de insulina em pacientes ou modelos experimentais com diabetes mellitus tipo 1 pode minimizar as alterações metabólicas em cardiomiócitos e dessa forma restaurar a função contrátil dessas células e assim a função cardíaca como um todo.

Estudos buscam esclarecer os efeitos do exercício físico na homeostasia da 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).

Loganathan et al. (2012) verificaram que os efeitos deletérios do diabetes sobre a performance cardíaca estão associados a elevação dos níveis de diacilglicerol (ativador de PKC). A ativação de PKC resulta em cardiomiopatia com fibrose intersticial e hipertrofia. Consequentemente, o aumento de diacilglicerol e a ativação de PKC, no coração diabético, é um passo crítico na patologia da cardiomiopatia diabética. Porém, esses autores submeteram ratos BBDR a oito semanas de exercício em esteira rolante e verificaram que os animais diabéticos exercitados apresentaram níveis menores de diacilglicerol quando comparados a seus controles sedentários.

Além disso, Pold et al., 2005 e 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), o que elevaria a oxidação de glicose e lipídeos nas células cardíacas e reduzindo as complicações metabólicas provocadas pela hiperglicemia.

Outros estudos mostraram que os níveis de fosfocreatina, reduzidos em animais com diabetes, foram aumentados em resposta ao exercício físico (Mokhtar et al., 1992; Mokhtar et al., 1993). Esses autores observaram 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.

De acordo com Davidoff et al. (2004), animais com alta ingestão de carboidratos exibiam disfunções nas células cardíacas, porém, quando foram 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 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 sistólicas e diastólicas causadas pela hiperglicemia. Porém, as adaptações do miocárdio ao exercício físico são capazes de atenuar essas disfunções, tornando mais eficiente o músculo cardíaco em situação de cardiomiopatia diabética.

4.4. 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 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 a 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 consequente 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 em 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 reguladoras 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 II - CaMKII, proteína quinase A -PKA e Proteína G), causando aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e favorecendo a ligação entre moléculas de actina e miosina, o que resulta em contração dos miócitos cardíacos (Bers, 2002). A liberação de Ca^{2+} induzida pelo influxo de 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., 2004; 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 sequestrada para 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 possam 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 de diabéticos envolvem a diminuição da amplitude de contração, da velocidade de encurtamento e relaxamento, além da diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 2 (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 fosfolambam, proteína reguladora da SERCA2. Estas alterações 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). Estes autores mostraram que cardiomiócitos de animais diabéticos, quando estimulados, exibiram valores inferiores da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se comparados aos animais controle não diabéticos. Isso indica que nos miócitos cardíacos de ratos diabéticos, os mecanismos de liberação e recaptação 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 reduzida 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.

Esses defeitos na sinalização intracelular de Ca^{2+} no DMT1 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 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 transiente 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 do tipo de 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 recaptção 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 recaptção 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-Gossman et al., 1996).

Esses desequilíbrios na homeostasia do Ca^{2+} associados às alterações na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} sugerem que anormalidades na recaptção 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).

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 frequentemente associadas às cardiomiopatias nas formas de disfunções sistólicas, reduções na frequência 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 parede 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 aumentada (ex. durante o exercício físico) reduzindo a capacidade cardíaca de se ajustar a novas demandas impostas aos sistemas orgânicos corporais.

4.5. Efeitos do tratamento com insulina ou do treinamento físico sobre a função cardíaca e homeostasia de Ca^{2+} no diabetes

No coração, além de estar associada ao metabolismo de substratos como glicose, ácidos graxos e aminoácidos, a insulina está envolvida na homeostasia de íons como Ca^{2+} e na geração de força pelo miocárdio. Durante o processo de excitação/contração por exemplo, a insulina exerce efeito inotrópico positivo. Estes efeitos incluem aumento da geração de força máxima, do débito cardíaco e tempo de relaxamento mais rápido (Aulbach et al., 1999). Os efeitos inotrópicos positivos da insulina são independentes da taxa glicolítica miocárdial e metabolismo de substratos e ainda independentes dos mecanismos adrenérgicos.

Ren et al. (1999) examinaram as respostas contráteis a insulina em músculos papilares e miócitos ventriculares de corações de ratos com diabetes e mostraram que a administração de insulina aumenta o encurtamento celular. Além disso, a insulina induziu um aumento dose dependente no transiente intracelular de Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos com diabetes quando comparados a seus controles normais. Isso sugere que a contratilidade de células cardíacas pode ser alterada pelo diabetes, mas o tratamento com insulina pode atenuar essas alterações negativas, principalmente no que se refere ao encurtamento celular.

Na mesma linha, Lahaye et al. (2012) mostraram que o tratamento com insulina durante oito semanas induziu ao aumento da expressão de proteínas associadas ao ciclo de cálcio (RyR, SERCA 2, PLB e NCX1). Isso indica que a insulina pode restaurar o transiente

intracelular de Ca^{2+} via restauração da expressão dessas proteínas e dessa forma normalizar o a contração e o relaxamento celular em cardiomiócitos na presença de DMT1.

Para Aulbach et al. (1999) os efeitos da insulina sobre a função cardíaca e homeostase de Ca^{2+} em cardiomiócitos está associada principalmente a estimulação dos canais de Ca^{2+} tipo L mediado por receptores de insulina IRS e por proteína quinase dependente de AMP cíclico. Além disso, a insulina também interage com SERCA2 via substrato receptor de insulina (IRS) indicando que a ligação das proteínas IRS a SERCA 2 é modulada pela insulina (Tsujino et al., 2006). Essa ligação contribui para recaptação de íons Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e consequentemente para a redução do Ca^{2+} diastólico e relaxamento das células cardíacas para que novo ciclo contração/relaxamento ocorra.

A maior atividade metabólica durante o exercício físico requer aumento do débito cardíaco (Blomqvist, & Saltin, 1983). Nesse sentido, ocorrem ajustes cardiovasculares para atender a maior demanda de suprimento sanguíneo 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 resultam em aumento do volume de ejeção e do débito cardíaco (Diffie, 2001, Diffie, 2004; Kemi, 2007).

Em condições patológicas (ex. Diabetes), o miocárdio também se adapta ao exercício físico regular. 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 suínos, um programa de exercício aeróbico (caminhada) preveniu a disfunção cardíaca e as 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 à estimulação α_1 adrenérgica e consequente aumento do Ca^{2+} citosólico, uma vez que esses receptores estão localizados na membrana celular. Eles são acoplados à 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.

Outro mecanismo que poderia justificar os benefícios do treinamento físico são seus efeitos no pâncreas. O exercício físico pode também agir sobre as células beta-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 demonstraram 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).

Com relação às alterações morfológicas, 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 diminuiu o conteúdo de colágeno no miocárdio 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 treinamento físico reduz a rigidez do miocárdio presente no diabético, o que possibilita melhora da distensibilidade e

hemodinâmica cardíaca. Tal efeito aumenta o volume diastólico final e, consequentemente, 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 alteração de outras como RyR2 e NCX (Diffie, 2004; 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, Wang et al. (2008) investigaram os efeitos do exercício regular nos canais e corrente de Ca^{2+} tipo L, mas não encontraram alterações e mostraram que o exercício físico promoveu aumento na amplitude de contração celular, redução no tempo de contração e de relaxamento, melhorando assim, a função cardíaca.

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, da fosforilação dos RyR2 e da fosforilação de CaMKII.

Na mesma perspectiva, Silva et al. (2010) verificaram que um programa de natação por oito semanas, 90 minutos por dia, aumentou a amplitude de contração, diminuiu o tempo

para o pico de contração e o tempo para o relaxamento de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos com diabetes tipo 1 experimental.

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 estudos para a compreensão dos efeitos do exercício físico regular sobre a estrutura e função do miocárdio na presença de cardiomiopatia diabética.

4.6. Efeitos do diabetes sobre a morfologia e função mitocondrial

As mitocôndrias são cruciais em diferentes vias intracelulares de transdução de sinais e são capazes de codificar uma variedade de estímulos extracelulares em diferentes ações que vão desde a produção de energia até a morte celular (Armstrong, 2007). A modulação do Ca^{2+} mitocondrial tem papel fundamental em diferentes condições patológicas (Giorgi et al., 2012).

Em cardiomiócitos, dependendo da localização, as mitocôndrias são classificadas como subsarcolemais ou interfibrilares. Essas organelas são delimitadas por duas membranas, uma interna e uma externa, separadas pelo espaço intermembrana. A membrana interna cria um espaço interno, a matriz e apresenta invaginações denominadas de cristas mitocondriais (Hoppel et al 2009).

No processo de conversão de energia, as mitocôndrias podem utilizar piruvato, ácidos graxos e aminoácidos para a produção de ATP. Esses substratos são transportados através da membrana mitocondrial interna e convertidos a Acetil CoA por enzimas localizadas na matriz. O Ciclo de Krebs, converte os átomos de Acetil CoA em CO_2 que é liberado como produto residual. O ciclo gera elétrons de alta energia que são transportados por NADH e FADH_2 . Estes elétrons são transferidos para complexos protéicos da membrana interna e entram na cadeia respiratória onde ocorre a fosforilação oxidativa, formação de ATP, utilização de O_2 e formação de H_2O (Lehninger, 2002).

A cadeia respiratória mitocondrial consiste de uma série de transportadores de elétrons que atuam sequencialmente e a maioria deles são proteínas integrais de membrana. Assim, na fosforilação oxidativa ocorrem três tipos de transferência de elétrons: (1) transferência direta de elétrons, tal como na redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} ; (2) transferência como um átomo de hidrogênio ($\text{H}^+ + \text{e}^-$); (3) transferência como um íon hidreto ($:\text{H}^-$), que possui dois elétrons (Lehninger, 2002). No modelo queimiosmótico proposto por Peter Mitchel em 1961, a passagem de elétrons através de uma sequência de intermediários redox na cadeia respiratória permite o fluxo de H^+ da matriz mitocondrial para o espaço

intermembranas contra um gradiente de concentração. Assim, o fluxo de H^+ através de ATP sintetase de volta ao interior da mitocôndria, desta vez através a favor do um gradiente, estaria diretamente acoplado a fosforilação do ADP e consequente síntese de ATP nas mitocôndrias.

Nas células cardíacas, o acoplamento excitação-contração consome grande quantidade de energia produzida pelas mitocôndrias através da fosforilação oxidativa (Maack & O'Rourke, 2007). Dessa forma, para se adaptar a constante sobrecarga do miocárdio, os mecanismos de acoplamento são extremamente necessários para a manutenção do pool de ATP, fosfocreatina e NADH. Para o autores acima, os reguladores mais importantes da fosforilação oxidativa são ADP, P_i e Ca^{2+} . Além disso, Sack (2009) relatou que, em nível mitocondrial, há uma significativa interação entre dois sistemas reguladores do fluxo de energia nos cardiomiócitos; a saber: I) creatina quinase, adenilato ciclase e a via glicolítica que comunicam modificações geradas por ATPases celulares estruturalmente organizadas; II) sistema baseado na participação mitocondrial no transiente de Ca^{2+} , que ajusta a oxidação de substrato e transdução de energia para atender a demanda celular. Assim, no processo contrátil, as mitocôndrias acumulam Ca^{2+} citosólico durante o aumento do transiente de Ca^{2+} . Dessa forma, as elevações da $[Ca^{2+}]_i$ ativam várias enzimas mitocondriais para aumentar a produção de ATP.

Assim sendo, as mitocôndrias estão constantemente disponibilizando energia (ATP) necessária para o processo de acoplamento excitação-contração dos cardiomiócitos. Nessa perspectiva, o papel central das mitocôndrias, na performance cardíaca, envolve adaptações na estrutura e função da rede mitocondrial para atender a sobrecarga. Sendo assim, disfunções em nível mitocondrial podem comprometer a disponibilidade de energia e, consequentemente, a função cardíaca em situações patológicas como DM.

Boudina et al. (2009) analisaram os efeitos do diabetes sobre a função mitocondrial e verificaram, em animais com deleção de receptores para insulina, que a piora da sinalização insulínica promove aumento do estresse oxidativo e redução da capacidade de geração de energia por ativação do desacoplamento mitocondrial, demonstrando papel da insulina na homeostase da função mitocondrial no músculo cardíaco. Assim, o miocárdio de diabéticos caracteriza-se principalmente por apresentar aumento da oxidação de ácidos graxos e do consumo miocárdio de oxigênio e redução da eficiência cardíaca atribuídos, principalmente, a disfunções mitocondriais como aumento da atividade de proteínas desacopladoras (UCPs) presentes na membrana interna das mitocôndrias (Boudina & Abel, 2005; Boudina et al., 2007).

MacDonald et al. (2011) mostraram que quatro meses de diabetes induzido por STZ foram suficientes para promover disfunção mitocondrial detectada, primariamente, em cardiomiócitos do subepicárdico do ventrículo esquerdo de corações de ratos, o que reduz a eficiência ventricular esquerda durante o ciclo contração-relaxamento do miocárdio. Por outro lado, Baseler et al. (2011) reportaram que alterações na proteômica mitocondrial contribuem para a disfunção no processo de importação de proteínas mitocondriais codificadas no núcleo celular. Esses autores mostraram que o diabetes causa alterações funcionais e estruturais na rede mitocondrial cardíaca principalmente por promover a redução de translocases na membrana mitocondrial interna, diminuição de carreadores de fosfato mitocondriais, além de redução de proteínas envolvidas na morfologia das cristas mitocondriais como a mitofilina. Além disso, o mesmo estudo mostrou que mitocôndrias de cardiomiócitos diabéticos apresentam redução de proteínas HSP 70 as quais estão envolvidas na translocação de proteínas para a matriz mitocondrial.

Concomitante a esses achados, os autores supracitados verificaram ainda que disfunções mitocondriais ocorrem de forma diferente quando se compara mitocôndrias intermiofibrilares com aquelas localizadas abaixo do sarcolema, sendo que as alterações em proteínas de mitocôndrias intermiofibrilares são mais pronunciadas que aquelas que ocorrem em mitocôndrias subsarcolemas. Já Oliveira (2005) e Oliveira et al. (2003) acreditam que a disfunção mitocondrial durante a hiperglicemia intermitente ocorre devido a um aumento da transição de permeabilidade mitocondrial, com formação de poros poliproteicos nas mitocôndrias, decorrente da sobrecarga de Ca^{2+} e aumento do estresse oxidativo, o que compromete a bioenergética do miocárdio diabético, causando morte das células cardíacas com concomitante redução da função cardíaca.

No que se refere aos aspectos morfológicos, Shen et al. (2004) mostraram que as mitocôndrias cardíacas de animais com DMT1 apresentam aumento da área e são mais numerosas quando comparadas àquelas de corações normais, sugerindo aumento da biogênese mitocondrial, porém sem melhoria da função dessas organelas. Esses achados sugerem que o aumento da biogênese mitocondrial durante o diabetes pode estar relacionado a uma resposta adaptativa dessas organelas para compensar a piora da função.

Além disso, esses autores verificaram que nessas mitocôndrias ocorre diminuição dos níveis de glutatona redutase, indicando piora da função mitocondrial e aumento do estresse oxidativo. Na mesma linha, Searls et al. (2004) mostraram que animais com DMT1 apresentam alterações na ultraestrutura mitocondrial, principalmente intumescimento de mitocôndrias e desorganização de suas cristas. Esses autores sugeriram que essas

anormalidades estão relacionadas principalmente às disfunções metabólicas em cardiomiócitos na presença da hiperglicemia.

Ainda, por apresentarem capacidade de acumular grande quantidade de Ca^{2+} , as mitocôndrias são conhecidas por prevenir ou retardar a ocorrência de sobrecarga de Ca^{2+} , em cardiomiócitos, em diferentes condições patológicas (Dhalla et al., 1996). Assim, durante o desenvolvimento de anormalidades no transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as mitocôndrias se adaptam para continuar a acumular esse íon e isso seria um mecanismo protetor. Contudo, durante o DM, o aumento do Ca^{2+} citosólico, em cardiomiócitos, faz com que essas organelas se tornem sobrecarregadas de Ca^{2+} com o tempo o que prejudica a atividade respiratória e a fosforilação oxidativa (Dhalla et al., 1996; Dhalla et al., 1998).

Em vista disso, é possível que na presença de diabetes mellitus, as disfunções mitocondriais em cardiomiócitos sejam primariamente devido ao aumento do metabolismo de ácidos graxos, seguido de aumento no Ca^{2+} citoplasmático.

4.7. Efeitos do tratamento com insulina ou do treinamento físico sobre a morfologia e função das mitocôndrias cardíacas em diabéticos

O tratamento antihiperglicêmico no diabetes mellitus reduz a incidência de complicações micro e macrovasculares, nefropatias, retinopatias, desacelera a arterosclerose, reduz a incidência de infarto do miocárdio, amputação de membros entre outros.

A terapia com insulina tem uma função importante na regulação de vários aspectos do metabolismo cardiovascular e isso inclui a oxidação de glicose, ácidos graxos e aminoácidos pelas mitocôndrias (Bertrand et al., 2008). Alterações na oxidação de substratos devido a ausência ou ineficiência da insulina podem gerar disfunção das mitocôndrias e consequentemente redução da energia produzida por essas organelas.

Remor et al. (2011) investigaram os efeitos da insulina sobre a função de mitocôndrias em diferentes tecidos de animais com diabetes induzido por estreptozotocina. No músculo cardíaco, esses autores encontraram que a exposição a insulina reduziu os efeitos da hiperglicemia sobre a atividade de complexos enzimáticos da cadeia respiratória, aumentando a capacidade oxidativa das mitocôndrias. Nesse sentido, a terapia com insulina parece ter papel essencial na manutenção da homeostase mitocondrial no músculo cardíaco durante o desenvolvimento do diabetes.

Nesse sentido, o tratamento com insulina durante o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 1 pode minimizar as alterações negativas advindas da hiperglicemia principalmente por aumentar a oxidação de substratos energéticos pelas mitocôndrias,

aumentando a atividade de complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial, reduzindo assim as disfunções decorrentes das alterações metabólicas. Nesse sentido,

Segundo Ascensão et al. (2011), um dos benefícios do exercício físico sobre a função cardíaca e a redução da morbimortalidade estão relacionados ao efeito protetor exercido pelo exercício físico nos cardiomiócitos. Para esses autores, é possível que, sob determinadas condições, o exercício atenua a maior suscetibilidade da mitocôndria cardíaca a sofrer aumento da transição de permeabilidade. Além disso, outro mecanismo proposto para explicar os efeitos cardioprotetores do exercício, pelo menos parcialmente, são as transformações redox, assim como, o aumento da regulação das chaperonas mitocondriais, melhora da capacidade antioxidante e/ou elevação de outras moléculas protetoras contra a morte celular.

Além disso, Mokhtar et al. (1993) mostraram que 10 semanas de treinamento em esteira rolante revertem a depressão na taxa de fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo de ratos diabéticos, o que sugere melhora da função mitocondrial. Na mesma linha, Emter & Baines (2010) verificaram que o exercício físico atenua ou reverte o remodelamento cardíaco patológico criando um fenótipo fisiológico. Nessa perspectiva, esses autores verificaram proteção contra disfunção mitocondrial no tecido ventricular após o treinamento físico, melhorando a função ventricular esquerda e, consequentemente, a função cardíaca em suínos.

Ainda, os efeitos do treinamento físico na função mitocondrial estão associados ao aumento da respiração mitocondrial, redução da susceptibilidade a transição de permeabilidade, além de prevenir a elevação de ciclofilina D, Bax, caspase 3 e 9 e aumentar os níveis de Bcl2 em cardiomiócitos de animais com diabetes induzido por STZ (Lumini-Oliveira et al., 2011).

Para Searls et al. (2004) os efeitos positivos do treinamento físico estão atrelados principalmente à redução das anormalidades morfológicas nas mitocôndrias principalmente na redução da área mitocondrial. Assim, a melhora da função ventricular esquerda após um programa de exercícios está relacionada, entre outros fatores, à melhora da função mitocondrial e redução das anormalidades morfológicas em mitocôndrias de cardiomiócitos desse ventrículo. De maneira semelhante, Loganathan et al. (2012) submeteram ratos diabéticos a seis semanas de treinamento em esteira e verificaram que além de diminuir os níveis de diacilglicerol no miocárdio, o treinamento físico exerceu função protetora sobre a morfologia das mitocôndrias cardíacas, uma vez que animais diabéticos treinados

apresentaram mitocôndrias com membranas mais íntegras (membranas interna e externa intactas) quando comparadas aos seus controles sedentários.

Assim, parece que os efeitos do exercício sobre a função cardíaca de animais ou seres humanos com DMT1 vão além do aumento no metabolismo energético das células cardíacas, visto que outras adaptações são importantes para atenuar ou reverter as disfunções moleculares e estruturais induzidas pelo DMT1.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com 30 dias de idade e massa corporal média de $80,2 \pm 1,8$ g provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. O projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 51/2011). Após a adaptação de sete dias, os animais foram distribuídos, aleatoriamente em seis grupos experimentais, a saber:

- Controle sedentário (CS, n= 10), animais que receberam injeção de tampão citrato de sódio e não foram submetidos ao treinamento físico;
- Controle exercitado (CE, n= 10), animais que receberam injeção de tampão citrato de sódio e foram submetidos ao treinamento físico;
- Diabético Sedentário (DS, n= 10), animais que receberam injeção de estreptozotocina e não foram submetidos ao treinamento físico;
- Diabético sedentário tratado com insulina (DSI, n= 10); animais que receberam injeção de estreptozotocina, não foram submetidos ao treinamento físico e eram tratados com insulina;
- Diabético Exercitado (DE, n= 10), animais que receberam injeção de estreptozotocina e foram submetidos ao treinamento físico;
- Diabético exercitado tratado com insulina (DEI, n= 10); animais que receberam injeção de estreptozotocina, foram submetidos ao treinamento físico e tratados com insulina;

5.1.1 Tratamento dos animais

Os animais, dos grupos experimentais, foram alojados em gaiolas coletivas (5 animais por gaiola) em ambiente com temperatura mantida em $22^{\circ}\text{C} \pm 3$ 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, às 8:00 horas no primeiro dia de cada semana ao longo do período experimental em uma balança eletrônica digital (Marte – Brasil, modelo AS5500C) com precisão de 0,01g. Uma semana após a indução do diabetes, os animais dos grupos DSI e DEI receberam, diariamente, uma dose de 1-4 UI de insulina humana NPH.

5.2. Delineamento experimental

Os animais dos grupos experimentais foram alocados em gaiolas, cinco animais por gaiola. Esses animais passaram por sete dias de adaptação (semana 1) antes que os procedimentos experimentais se iniciassem. Após esses dias de adaptação, os animais foram pesados para determinação da dose de estreptozotocina a ser utilizada. Ainda, após 12 horas de jejum, a glicemia foi aferida. Então, o diabetes foi induzido como descrito no item 5.3.1 (semana 2). Sete dias após a indução (semana 3) os animais iniciaram um programa de treinamento físico em natação com sobrecarga progressiva (item 5.3.3, Tabela 1) com duração de oito semanas. Completadas oito semanas de treinamento físico, os animais foram eutanaziados e as análises do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, função mitocondrial e ultraestrutura dos cardiomiócitos foram realizadas em três experimentos como descrito na Figura 1.

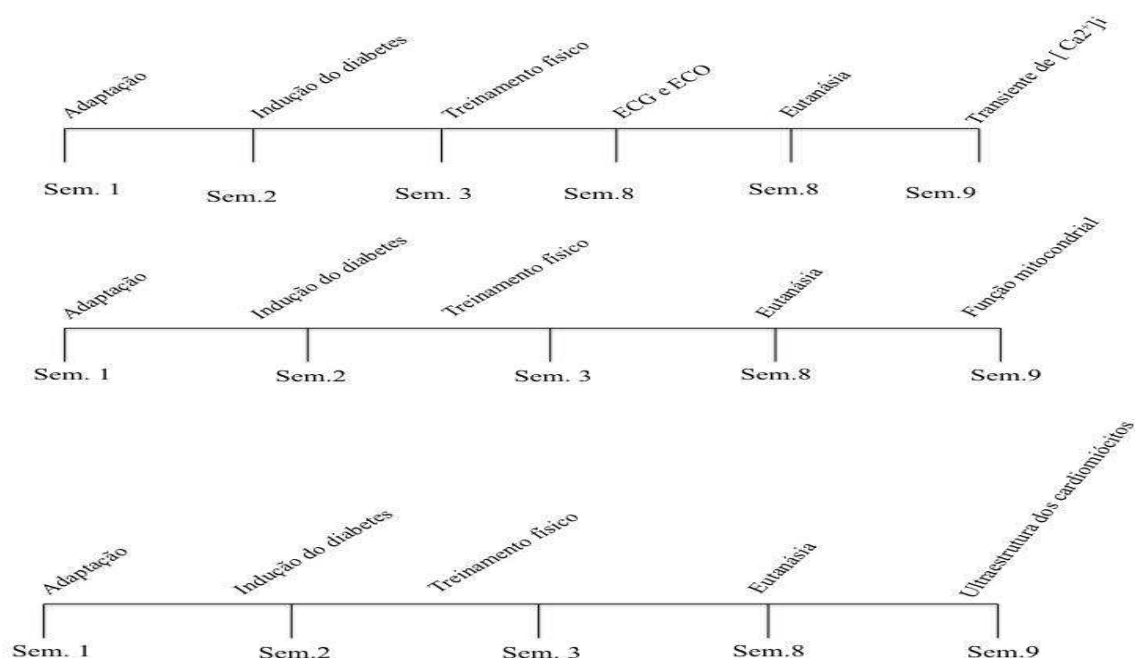


Figura 1 . Cronologia dos procedimentos experimentais realizados nos experimentos 1, 2 e 3.

5.3 Procedimentos cirúrgicos

5.3.1 Indução do Diabetes

Após jejum de 12 horas, os animais dos grupos DS, DSI, DE e DEI 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 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, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e na sequência foram coletados aproximadamente 10 µL de sangue foram coletados por meio de um corte transversal na ponta da cauda 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. Esse valor de referência foi utilizado com base nos estudos de Sharp & La Regina (1998) e Howarth et al. (2008). A glicemia de jejum foi determinada no primeiro dia de cada semana em glicosímetro.

5.3.2 Implante de eletrodos para a aquisição do eletrocardiograma

Os animais foram colocados dentro de uma câmara de indução anestésica e receberam isoflurano 2% e oxigênio 100% num fluxo constante de 1L /minuto. Uma vez inconscientes, foram retirados da câmara de indução, e colocados em decúbito dorsal em uma plataforma com os membros fixados por fita adesiva. A concentração de isoflurano foi mantida entre 0,5 -1%, suficiente para imobilização durante o exame eletrocardiográfico e sob respiração espontânea. Uma tricotomia de aproximadamente 1cm² foi realizada nos membros torácicos e no membro pélvico esquerdo para inserção dos eletrodos.

5.4 Treinamento físico

Após uma semana de hiperglicemia (diabetes), os animais do grupo DE, DEI e CE foram submetidos a um programa de treinamento físico aeróbico em natação (adaptado de Gomes et al, 2006), por 8 semanas. Como descrito na tabela 2 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 até que atingissem carga total de 5% 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 de água com temperatura entre 28 e 30 °C.

Tabela 1. Protocolo de treinamento físico

Semana	Sobrecarga	Duração
1 ^a	0%	10 min
2 ^a	0%	60-90 min
3 ^a	0%	90 min
4 ^a	1%	90 min
5 ^a	2%	90 min
6 ^a	3%	90 min
7 ^a	4%	90 min
8 ^a	5%	90 min

5.5 Exames

5.5.1. Eletrocardiograma

Os eletrocardiogramas (ECG) foram obtidos após a oitava semana de treinamento físico. Para tanto, os ratos foram mantidos em repouso no biotério por 48 horas antes que as medições fossem realizadas. O ECG, livre de ruídos e interferências, foi adquirido por no mínimo 60 segundos consecutivos.. O ECG - derivação DII - foi adquirido utilizando o sistema de aquisição de dados PowerLab® (AD Instruments, São Paulo, Brasil), e os dados foram analisados através do programa LabChart® Pro (ADInstruments LabChart 7, São Paulo, Brasil). Análise das variáveis do ECG consistiu do cálculo da média de cinco ciclos cardíacos consecutivos usando traçados livres de ruídos. Os intervalos RR foram mensurados e usados para determinar a frequência cardíaca de repouso (FCR) e os intervalos QT e Qtc

foram determinados.

5.5.2 Ecocardiograma

Para exames de ecocardiograma animais foram anestesiados com isoflurano usando uma concentração mínima eficaz via máscara. A anestesia foi então realizada utilizando-se de uma câmara de indução com isoflurano a 3% e de fluxo constante (1 L / min) de oxigênio a 100% durante cerca de 3 minutos. O tempo total de exame variou de 10 - 15 minutos. A temperatura corporal foi monitorada e controlada durante todo o exame por aplicação de água (37 ° C), colocada em sacos sobre o corpo do animal. Esse procedimento foi realizado para prevenir a bradicardia. Contração e relaxamento cardíaco foram avaliados de forma não invasiva por ecocardiografia transtorácica usando imagens do eixo paraesternal curto e longo após oito semanas de indução do diabetes. Imagens ecocardiográficas bidimensionais de modo M e imagens de Doppler pulsátil guiada por cores foram obtidas por técnicas ecocardiográficas convencionais usando um MyLabTM30 (Esaote, Génova, Itália), com um transdutor faseado de 11,0 MHz (Dent et al., 2001). A função sistólica foi avaliada pela medição fração de ejeção e de encurtamento e disfunção diastólica por registros com Doppler colorido pulsátil e da velocidade de fluxo transmitral diastólico máximo inicial (E) e final (A). Todos os exames ecocardiográficos foram realizados pelo mesmo investigador e as medições foram feitas posteriormente utilizando o mesmo equipamento supracitado. Cinco medições foram feitas e em média por um observador cego.

5.6. Métricas e cálculos

5.6.1 Índice de hipertrofia cardíaca

Quarenta e oito horas após a última sessão de treinamento físico foi realizada a eutanásia (inalação de gás carbônico) alternando os animais dos grupos, CS, CE, DE, DS, DSI e DEI sendo dois animais por dia. Os animais restantes permaneceram em seus tratamentos até a eutanásia. Esse procedimento foi adotado com o objetivo de manter os tratamentos dos grupos experimentais uma vez que não era possível fazer a eutanásia de todos os animais no mesmo dia. 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). O índice de hipertrofia cardíaca foi calculado pela razão da massa do coração pela massa corporal.

5.6.2 Isolamento dos miócitos cardíacos

Após remoção, o coração foi canulado via artéria aorta e perfundido com solução de isolamento contendo 750 μM de CaCl_2 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 etilenoglicol-bis (β -aminoetil)-N, N, N', N'-tetra-acético ácido (EGTA) 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 CaCl_2 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 (O_2 100% – 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 do ventrículo esquerdo e colocados em frascos contendo 5 mL da solução enzimática (colagenase) e albumina sérica bovina. Os frascos foram agitados moderadamente durante 5 minutos, em “banho-maria” à temperatura de 37 °C, sendo o tecido cardíaco oxigenado (O_2 100% – 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 CaCl_2 . Esse processo foi repetido. Os miócitos cardíacos foram armazenados em placas de Petri em refrigerador (5°C) até serem utilizados.

5.6.3 Mensuração do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

O transiente intracelular de cálcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi medido como previamente descrito por Primola-Gomes et al. (2009). Os cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram incubados com indicador fluorescente de Ca^{2+} (5 μM de fluo-4 AM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) permeável a membrana plasmática. O Fluo-4 AM (5 μM) foi preparado em uma solução a base de DMSO, (30 μL de DMSO em 50 μg de Fluo-4 AM). As células foram incubadas com 5 μL de Fluo-4 AM em 500 μL de célula durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após, as células foram lavadas e suspendidas em solução tampão HEPES, para remover o excesso da sonda fluorescente. O transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi obtido por estimulação dos cardiomiócitos através de um par de eletrodos de platina acoplado nos dois lados internos da câmara, com um pulso supra-limiar de 0,2 ms e 20 V (voltage square pulse). As células foram estimuladas a 1 Hz para produzir as condições de estado

estacionário. As imagens de microscopia confocal foram feitas usando um microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Para a aquisição das imagens foi utilizada uma lente objetiva de imersão a óleo (63x). Fluo-4 foi excitado a 488 nm (laser de argônio) e intensidade de emissão foi medida em 510 nm. As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms, sendo utilizadas para a criação de imagens (tempo no eixo x e fluorescência no eixo y). O processamento digital das imagens foi realizado por meio da plataforma Matlab. Os níveis de Ca^{2+} foram expressos como F/F_0 sendo F representa a fluorescência máxima obtida no pico do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e F_0 a fluorescência basal mensurada na fase diastólica do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o tempo para o pico do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e o tempo para decaimento do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foram determinados.

5.6.4 Análise da função mitocondrial

Após 48 horas da última sessão de exercício, os ratos foram eutanaziados por deslocamento cervical e seus corações foram rapidamente removidos. As mitocôndrias foram isoladas pelo método de centrifugação diferencial padrão (Pedersen et al., 1978). O tecido foi fragmentado em 40 mL de meio contendo 210 mM de manitol, sacarose 75 mM, 1 mM etilenoglicol-bis (β -aminoetil)-N, N, N', N'-tetra-acético ácido (EGTA), 0,1% de BSA e 10 mM de 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazina tampão ácido etano (HEPES-KOH), pH 7,2. A suspensão foi homogeneizada com um Polytron (T-25 digital de Ultra-Turrax, IKA Werke GmbH & Co.KG, Alemanha), três vezes para 3-4 segundos, com uma velocidade do motor fixado em $7800 \times \text{min}^{-1}$. Fragmentos finos em suspensão foram então homogeneizados três vezes por 15 segundos em intervalos de 1 minutos, utilizando um homogeneizador Potter-Elvehjem. Os homogenatos foram centrifugados a $800 \times g$ durante 10 minutos e o sobrenadante resultante ainda centrifugado a $6000 \times g$ durante 10 minutos. Os sedimentos foram então suspensos em meio (10 mL) contendo 210 mM de manitol, 75 mM de sacarose, e 10 mM de HEPES-KOH, pH 7,2, e centrifugados a $6000 \times g$ durante 10 min. As mitocôndrias foram suspensas em 0,1 mL do mesmo meio, e usadas dentro de 3 h. O conteúdo de proteína mitocondrial foi determinado por meio da reação de Biureto (Gornall et al., 1949).

5.6.5 Incubação padrão das mitocôndrias

As mitocôndrias foram energizadas com 5 mM de glutamato e malato (mistura de substrato complexo I) em um meio de incubação padrão composto de 125 mM de sacarose, KCl 65 mM, 2 mM de fosfato inorgânico (K₂HPO₄), 10 mM HEPES-KOH, pH 7,4, a 30 °C .

5.6.6 Monitoramento do ensaio mitocondrial

A respiração mitocondrial foi monitorizada usando um eletrodo do tipo Clark (Hansatech instruments, oxytherm electrode unit, UK). A produção de H₂O₂ foi monitorizada espectrofluorimetricamente usando 1 μ M Amplex red (Molecular Probes, OR, EUA) e 1 IU / mL de peroxidase (Zhou et al., 1997). Esses ensaios foram realizados na presença de 0,1 mM de EGTA. O influxo e o efluxo de Ca²⁺ foram monitorizados espectrofluorimetricamente usando 150 nM de Calcium Green 5N (Molecular Probes, OR, EUA) como uma sonda (Rajdev et al., 1993). O fluxo de Ca²⁺ e a produção de H₂O₂ foram monitorados em um espectrofotômetro de fluorescência (F-4500 Hitachi) com comprimento de onda (ex/em) 506/531 e 563/587, respectivamente.

5.6.7 Análise da expressão de RNAm

O RNA total foi isolado utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen ®). Para análise de RT-PCR, o RNA foi transcrito de forma reversa utilizando a transcriptase reversa IMPROM II (Promega ®) e utilizados em reações de PCR quantitativas contendo corante fluorescente EVA-green (BioRad ®). A expressão relativa de RNAm foi determinada após normalização com β -actina utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (Barbosa et al., 2013). PCR quantitativo foi analisado utilizando Eppendorf Mastercycler Realplex4 Instrumento (Eppendorf ®). Primers para Nox4, β -actina e UCP2 foram concebidas como descrito na Tabela 1.

Table 2. Sequência dos primers utilizados para os ensaios de RT-PCR para Proteína desacopladora 2 (UCP2), NADPH oxidase -4 (Nox4) e β -actina

Gene	Forward	Reverse
Nox-4	5'TTCTGGACCTTTGTGCCTATAC3'	5'CCATGACATCTGAGGGATGATT3'
UCP	5'ATGTGGTAAAGGTCCGCTTC3'	5'CATTTCGGGCAACATTGGG3'
β -actin	5'CACTTTCTACAATGAGCTGCG3'	5'CTGGATGGCTACGTACATGG3'

5.6.8 Estado redox do ventrículo esquerdo

Os níveis de proteína carbonilada e glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram avaliados no tecido ventricular esquerdo (50 mg / mL em tampão Tris-HCl 0,1 M gelado, pH 7,4). Os níveis de GSH e GSSG foram avaliados pelo método ortoftalaldeído fluorimétrico (Hissin e Hilf, 1976). A proteína carbonilada foi detectada espectrofotometricamente pela derivatização do grupo carbonila com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (Reznick e Packer, 1994; Schild et al.,1997) e a absorvância foi normalizada pela quantificação da proteína por reagente Bradford ®. O conteúdo de superóxido dismutase (SOD) no ventrículo esquerdo foi determinado espectrofotometricamente por formação do sal de tetrazólio usando um Kit de ensaio para superóxido dismutase (Cayman ®), de acordo com as instruções do fabricante.

5.6.9 Ultraestrutura do miocárdio

Para análise da ultraestrutura do miocárdio, foram utilizados dois animais por grupo experimental. Esse número de animais foi utilizado devido a necessidade de se realizar outras análises com o ventrículo esquerdo e a análise de ultraestrutura apresentar características peculiares que permitem a análise com número amostral pequeno. Após a eutanásia, amostras do ventrículo esquerdo foram colocadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) contendo 0,2 M de sacarose e transferidos para 2,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e sacarose 0,2 M. Após a fixação com glutaraldeído, estes fragmentos foram lavados em tampão de cacodilato de sódio e refixados em 1% de tetróxido de ósmio durante duas horas. Depois de lavar duas vezes em tampão cacodilato, as amostras foram desidratadas em série ascendente de etanol até álcool absoluto (70, 100 °) e impregnados na solução de resina LR White-Leica e etanol (2:1) durante uma hora. Posteriormente, as amostras foram impregnadas em resina pura durante uma hora e, novamente, adicionadas em resina pura durante 16 horas à temperatura ambiente, seguida da inclusão em cápsulas de gelatina a 60 °C durante 24 horas. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo (modelo: Leica RM 2255, Leica Microsystems, Alemanha) e colocados em grades de cobre. Os cortes foram contrastados durante 15 minutos com 1% de acetato de uranila e com citrato de chumbo durante 8 minutos. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão com câmara digital acoplada (Zeiss EM 109, Alemanha), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de

Viçosa.

5.6.10 Análise estatística

Para a comparação das médias das variáveis entre os grupos foi utilizado ANOVA 2x3 (diabético/não-diabético vs sedentário/exercitado/insulina) seguida pelo teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. Esta análise foi realizada através do software Statistical Analysis System - SAS versão 9.3. O nível de significância adotado foi de 5% e os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

6. RESULTADOS

6.1. Biometria, glicemia e parâmetros eletro e ecocardiográficos

O peso inicial e a massa corporal não foram estatisticamente diferentes entre os animais grupos experimentais. Após oito semanas, a massa corporal foi significativamente menor nos animais diabéticos (DS vs. CS). O treinamento físico (DS vs. DE), bem como a terapia com insulina isolada (DS vs. DSI) ou os tratamentos combinados (DSI vs. DEI) não alteraram o ganho de massa corporal nos animais diabéticos. Semanalmente, a glicemia de jejum foi maior em animais diabéticos comparados aos controles como pode-se observar na Figura 1. Por outro lado, a mesma figura mostra que a massa corporal foi menor em animais diabéticos quando comparados aos controles. O tratamento com insulina (DS vs. DSI) ou a combinação com treinamento físico (DE vs. DEI) reduziram a glicemia de jejum em animais diabéticos. O treinamento físico isolado não alterou a glicemia de jejum dos animais diabéticos. O diabetes reduziu o ganho de massa cardíaca (DS vs. DSI) e o tratamento com insulina aumentou esse ganho. Quando comparados DSI vs. CS a massa cardíaca continua menor nos animais diabéticos apesar do tratamento. O treinamento físico isolado não alterou a massa cardíaca, mas quando combinado ao tratamento com insulina (DE vs. DEI) aumentou essa massa (Tabela 3). Nos animais controle, o treinamento físico não modificou a massa cardíaca (CS=CE). O índice de hipertrofia cardíaca (Massa do coração/Massa corporal) não foi modificado em animais diabéticos quando comparado aos controles (CS vs. DS), mas animais diabéticos tratados com insulina (DSI vs. DEI) mostraram índices de hipertrofia maiores do que aqueles não-tratados (DS vs. DE). Esse parâmetro foi similar entre animais diabéticos tratados com insulina e os controle. O índice de hipertrofia cardíaca não foi significativamente diferente entre os animais controle sedentários e treinados (CS=CE). A

frequência cardíaca de repouso foi menor em animais diabéticos sedentários (DS vs. CS) e o tratamento com insulina (DS vs. DSI) normalizou a frequência cardíaca.

O treinamento físico isolado não modificou a redução na frequência cardíaca apresentada por animais diabéticos (DS vs. DE). Por outro lado, o treinamento físico combinado com o tratamento com insulina aumentou a frequência cardíaca (DE vs. DEI). Os animais diabéticos tratados com insulina apresentaram frequência cardíaca semelhante aos controles (CS vs. DSI, CE vs. DEI).

No que se refere aos aspectos eletrocardiográficos (Tabela 3) o estudo verificou que o diabetes prolongou o intervalo QT (DS vs. CS) e o tratamento com insulina reduziu esse intervalo (DS vs. DSI), normalizando-o (CS vs. DSI).

O treinamento físico isolado não alterou o intervalo QT, mas quando combinado ao tratamento com insulina, normalizou esse intervalo. Os animais dos grupos diabéticos tratados com insulina apresentaram intervalo QT similares aos controles (CS vs. DSI; CE vs. DEI)

O intervalo QTc não foi alterado pelo diabetes (DS vs. CS). Porém quando comparados os grupos DS e DE vs. DSI e DEI, os animais tratados com insulina apresentaram intervalo QTc menores que os animais não tratados pelo hormônio.

Os parâmetros ecocardiográficos para avaliação da função sistólica ventricular esquerda estão representados pela fração de ejeção e pela fração de encurtamento mostrados na tabela 2. Nossos resultados mostraram que o diabetes reduziu a fração de encurtamento (CS vs. DS) e o tratamento com insulina isolado ou o treinamento físico isolado não foram capazes de reverter essa redução. Por outro lado, o treinamento físico associado ao tratamento com insulina aumentou em 19,18% a fração de encurtamento (DEI vs. DSI, DEI vs. DE). Nos animais controle o treinamento físico aumentou a fração de encurtamento em 15,6% (CS vs. CE). Os animais do grupo DS apresentaram redução 16,20% da fração de ejeção quando comparados ao CS. O tratamento com insulina (DS vs. DSI) ou treinamento físico (DS vs. DE) isolados não modificaram essa redução. Por outro lado, o treinamento físico associado ao tratamento com insulina aumentou a fração de ejeção nos animais diabéticos (DEI vs. CS; DE vs. DEI). Nos animais controle, o treinamento físico não alterou a fração de ejeção (CS vs. CE).

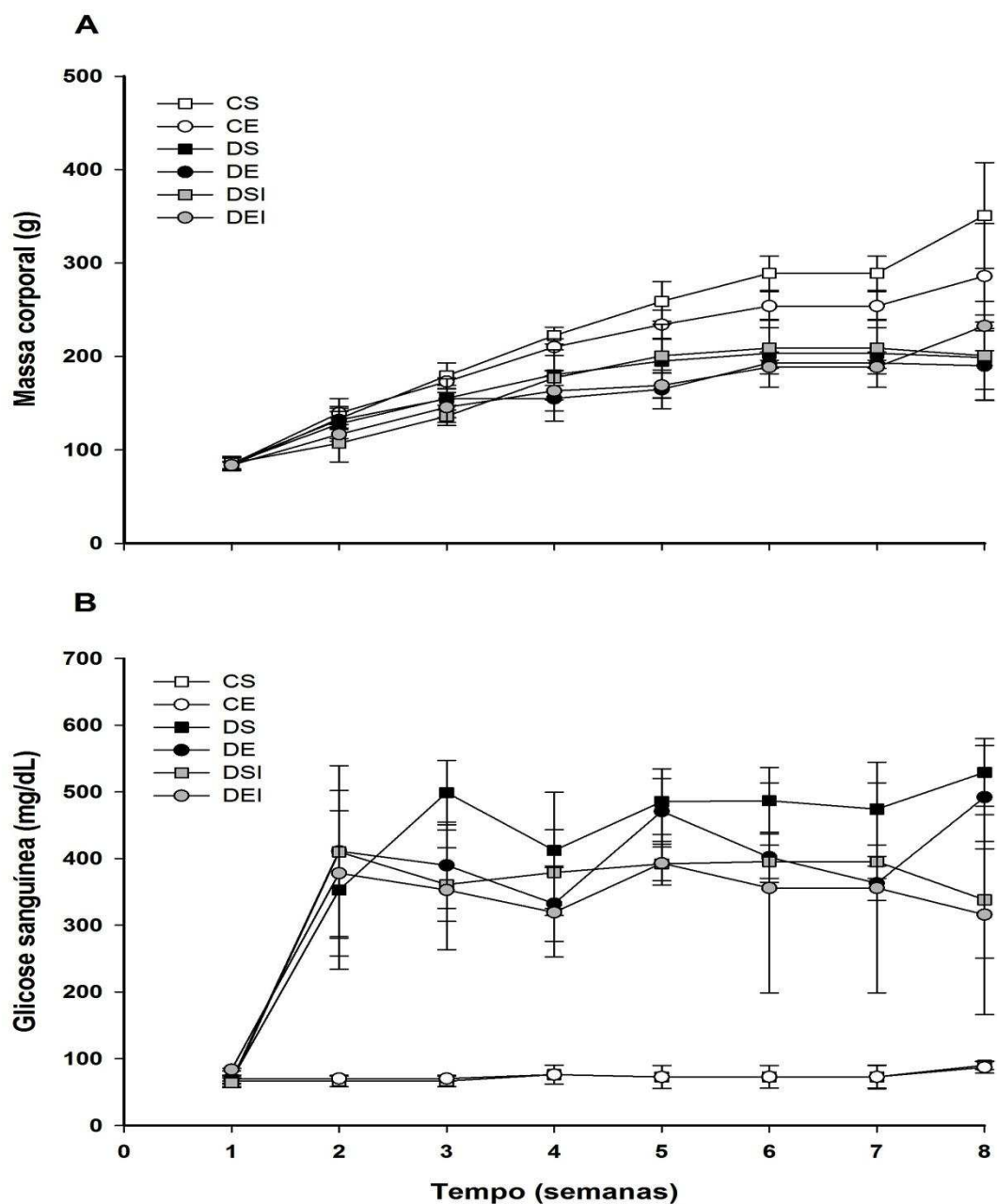


Figura 2. Peso corporal e glicose sanguínea dos grupos durante o período experimental. Controle Sedentário (CS), Diabético sedentário (DS), Diabético sedentário tratado com insulina (DSI), Controle exercitado (CE), Diabético exercitado (DE) e Diabético exercitado tratado com insulina (DEI).

Tabela 3. Biometria, glicemia e parâmetros eletro e ecocardiográfico dos grupos experimentais

	CS	DS	DSI	CE	DE	DEI
Massa corporal inicial (g)	83,4±1,6	85,2±3,4	85,8±2,7	84,8±2,9	85,8±2,7	83,6±1,8
Massa corporal final (g)	351,2±23,3	198,8±20,4 ^{*§}	200,8±16,1 ^{*§}	286,6±25,1	190,8±16,6 ^{*§}	232,6±11,8 [*]
Glicemia inicial (mg/dL)	66,6±3,8	68,6±3,0	64,2±3,2	70,2±1,6	67,2±1,7	62,6±2,6
Glicemia final (mg/dL)	90,2±2,8	529,2±22,7 ^{*#}	338,2±39,0 [*]	87,2±3,8	492,2±34,5 [§]	316,8±67,0 [§]
Massa do coração (g)	1,86±0,08	1,00±0,10 ^{*#}	1,43±0,15 [*]	1,95±0,12	1,01±0,07 [§]	1,62±0,07 [§]
Massa do coração/ Massa corporal	5,43±0,47	5,07±0,20 [#]	7,46±1,28	7,07±0,83	5,48±0,68	7,02±0,39
Frequência cardíaca (bpm)	345,9±9,0	267,0±11,3 ^{*#}	345,3±17,8	337,3±7,6	277,2±15,8 [§]	349,2±9,8
Intervalo Q T (s)	59,2±3,8	71,4±1,8 ^{*#}	56,3±3,5	58,5±3,8	78,6±3,2 [§]	53,9±3,7
Intervalo QTc (s)	141,8±8,4	150,6±5,0 [#]	135,3±10,1	138,9±9,7	168,3±6,8	130,4±10,3
Fração de encurtamento- VE	41,00±1,54	30,80±1,69 [*]	30,16±1,54 [*]	47,43±1,33 [*]	29,41±1,54 [§]	35,91±1,54 ^{§#}
Fração de ejeção - VE (%)	77,33±2,86	64,80±3,14 [*]	63,33±2,86 [*]	83,75±2,48	58,66±2,86 [§]	71,41±2,86

Controle Sedentário (CS), Diabético sedentário (DS), Diabético sedentário tratado com insulina (DSI), Controle exercitado (CE), Diabético exercitado (DE) e Diabético exercitado tratado com insulina (DEI).^{*}Diferente de CS; [†]Diferente de DS; [#]Diferente de DSI; [¥] Diferente de CE; [§] Diferente de DE. Os dados são expressos como media ± errp padrão da média de 10 animais por grupo.

6.2 Transiente de $[Ca^{2+}]_i$

A Figura 3 mostra os dados do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. O diabetes mellitus tipo 1 (DS vs. DE) e o tratamento com insulina (DS vs. DSI) não alteraram a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. Contudo, o treinamento físico associado ao tratamento com insulina (DS vs. DEI) aumentou significativamente a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. O exercício físico não alterou a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em animais controle (CS vs. CE).

No que se refere ao tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ observou-se que o diabetes mellitus tipo 1 não modificou esse tempo (Figura 3 B). Por outro lado, o treinamento físico reduziu o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em animais tratados (DSI vs. DEI) e não- tratados com insulina (DS vs. DE) em 8,67% e 6,49 % respectivamente. Nos animais controle, os efeitos do treinamento físico foram similares a esses animais diabéticos (CS vs. CE).

O diabetes induzido por estreptozotocina prolongou o tempo para metade do decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (CS vs. DS) por 17,10% (Figura 3 C). Em contrapartida, o tratamento com insulina isolado (DS vs. DSI), assim como o treinamento físico isolado (DS vs. DE) reduziu esse tempo nos animais diabéticos em 10,12% e 5,73 %, respectivamente. Além disso, o treinamento físico combinado com o tratamento com insulina (DS vs. DEI) reduziu o tempo para metade do decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em 5,17%. Contudo, o treinamento físico não modificou esse tempo em animais controle (CS vs. CE).

6.3 Função Mitocondrial

Apesar de não apresentar significância estatística, os resultados mostraram que o diabetes tendeu a reduzir as taxas respiratórias no estado III (Tabela 4), aumentou as taxas respiratórias no estado IV e aumentou a razão de controle respiratório (RCR) (DS vs. CS). Ambos os tratamentos isolados, insulina (DS vs. DSI) e treinamento físico (DS vs. DE) não modificaram nenhum dos parâmetros respiratórios supracitados. Apenas a combinação dos tratamentos, insulina e treinamento físico reverteram o aumento das taxas respiratórias no estado IV das mitocôndrias de animais diabéticos (DS vs. DEI). Nos animais controle, o treinamento físico elevou o consumo de oxigênio no estado IV pelas mitocôndrias isoladas (CS vs. CE).

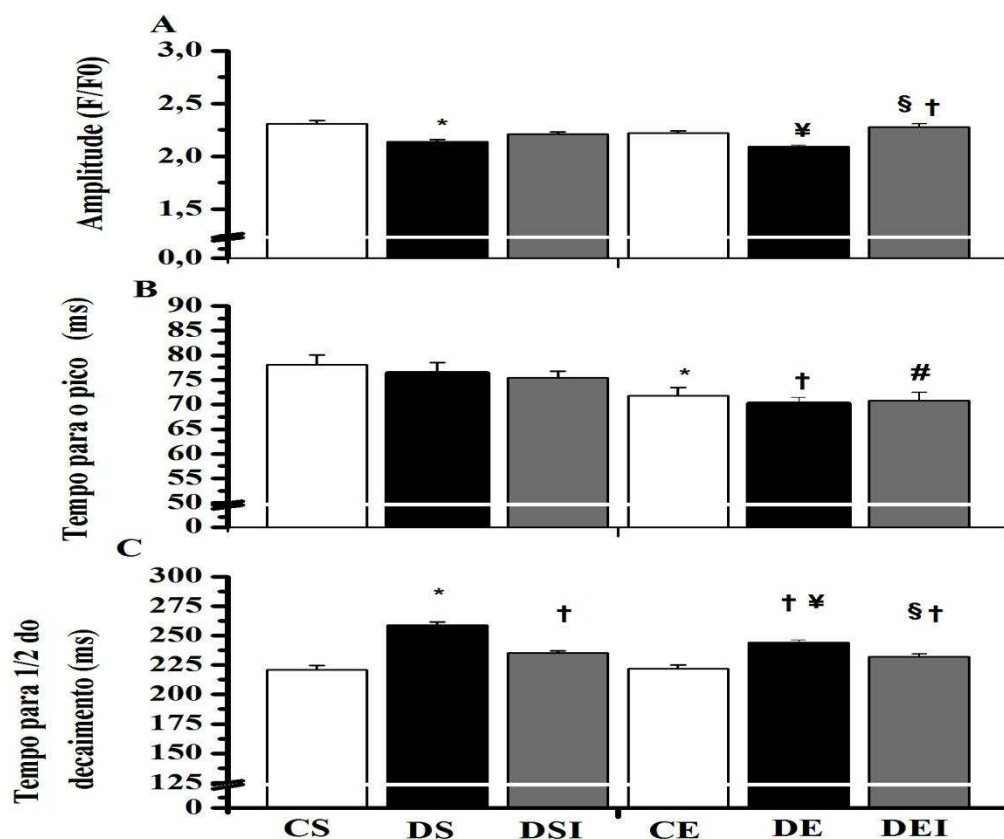


Figura 3. Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos. Controle sedentário (CS); Diabético sedentário (DS); Diabético sedentário tratado com insulina (DSI); Controle exercitado (CE); Diabético exercitado (DE); Diabético exercitado tratado com insulina (DEI). *Diferente de CS; †Diferente de DS; #Diferente de DSI; ‡Diferente de CE; §Diferente de DE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 10 animais por grupo.

Tabela 4. Fosforilação (Estado III) e repouso (Estado IV) e Razão de Controle Respiratório (Estado III/ Estado IV) nas mitocôndrias dos grupos experimentais.

	CS	DS	DSI	CE	DE	DEI
Estado III	26,5 $\pm$ 2,2	23,5 $\pm$ 3,0	23,8 $\pm$ 2,4	27,9 $\pm$ 1,8	20,1 $\pm$ 0,13	21,0 $\pm$ 1,5
Estado IV	2,32 $\pm$ 0,13	3,03 $\pm$ 0,21*	3,13 $\pm$ 0,22*	3,34 $\pm$ 0,48*	3,09 $\pm$ 0,09*	2,59 $\pm$ 0,17
RCR	10,66 $\pm$ 0,65	7,71 $\pm$ 0,81*	7,61 $\pm$ 0,55*	8,82 $\pm$ 1,01	6,51 $\pm$ 0,16*	8,13 $\pm$ 0,50

Controle sedentário (CS); Diabético sedentário (DS); Diabético sedentário tratado com insulina (DSI); Controle exercitado (CE); Diabético exercitado (DE); Diabético exercitado tratado com insulina (DEI). *Diferente de CS; Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 5 animais em cada grupo.

Além disso verificou-se no tecido ventricular esquerdo um aumento de 73% na expressão de proteína desacopladora 2 (UCP2) nos animais diabéticos (CS vs. DS) como mostrado na Figura 4. Esse aumento foi totalmente revertido apenas pela combinação de treinamento físico e insulina (DS vs. DEI).

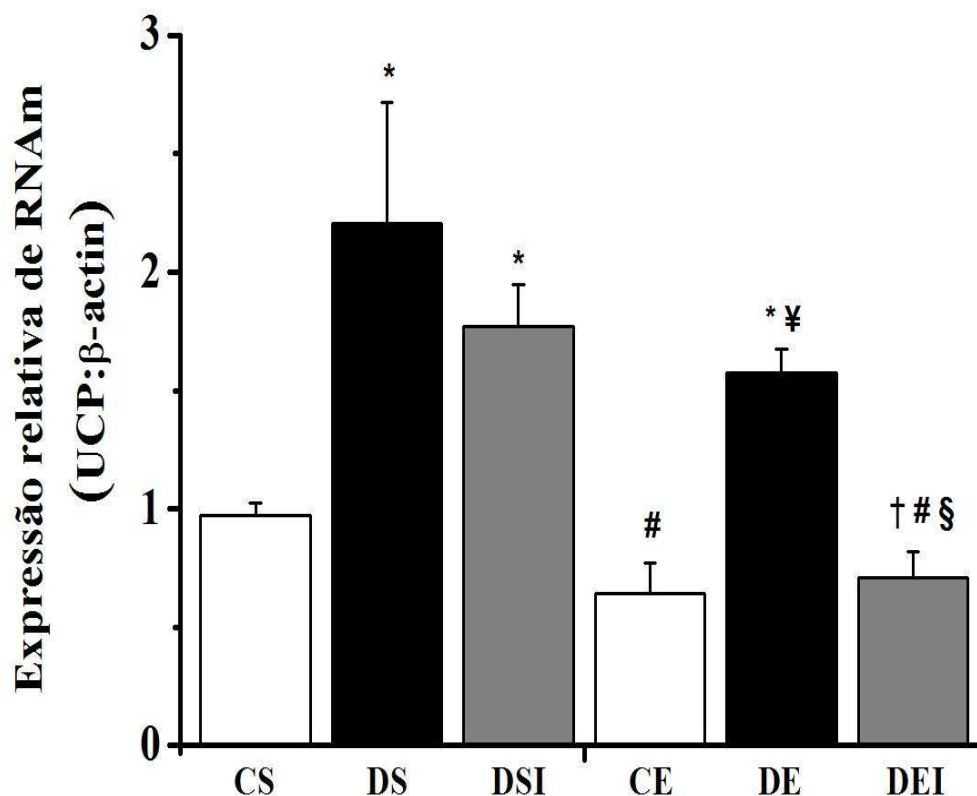


Figura 4. Transcrição de proteína desacopladora 2 (UCP2) no ventrículo esquerdo de corações de ratos.

Controle sedentário (CS); Diabético sedentário (DS); Diabético sedentário tratado com insulina (DSI); Controle exercitado (CE); Diabético exercitado (DE); Diabético exercitado tratado com insulina (DEI). *Diferente de CS; †Diferente de DS; #Diferente de DSI; ¥ Diferente de CE; § Diferente de DE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 10 animais por grupo.

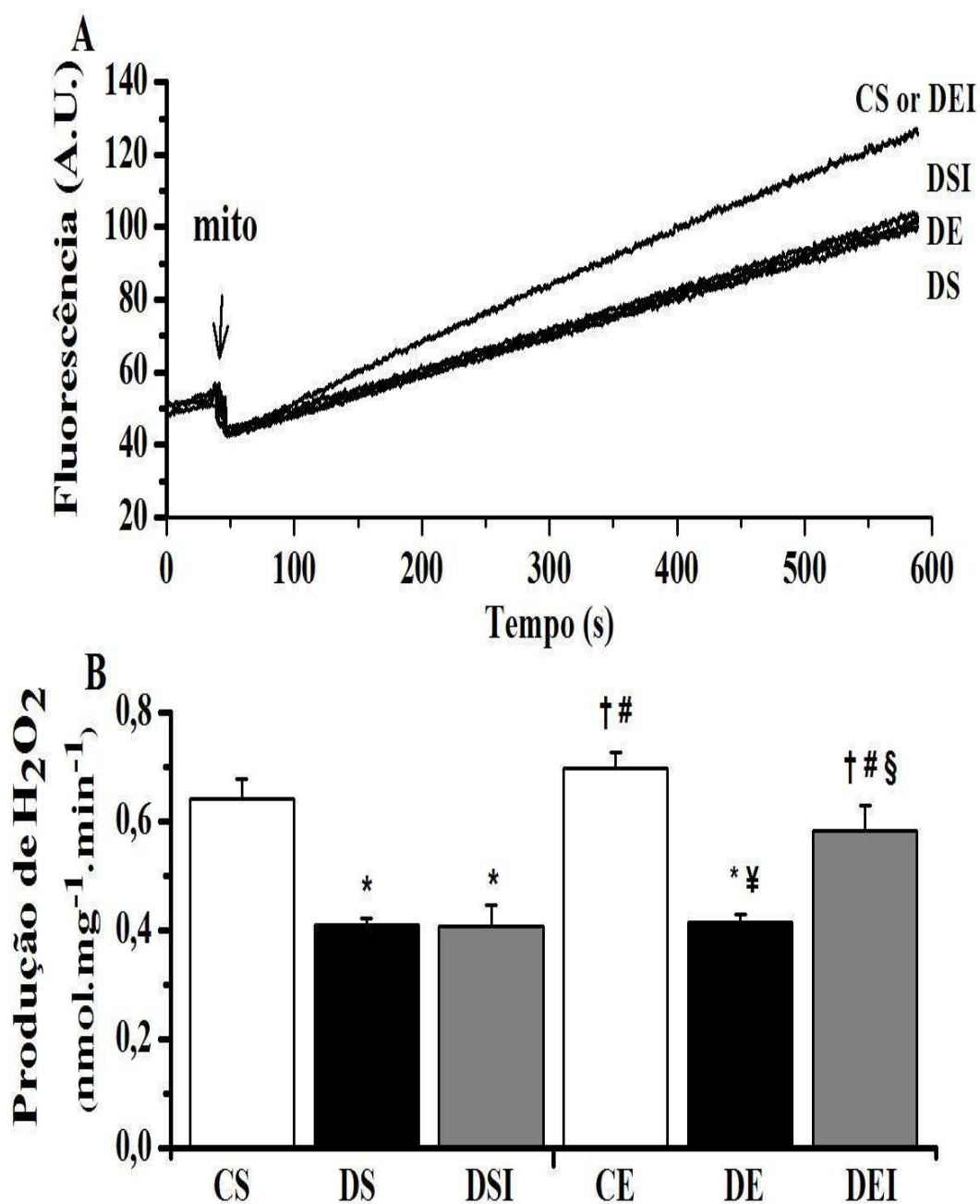


Figura 5. Produção de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo de corações de ratos.

Controle sedentário (CS); Diabético sedentário (DS); Diabético sedentário tratado com insulina (DSI); Controle exercitado (CE); Diabético exercitado (DE); Diabético exercitado tratado com insulina (DEI). (A) Traços representativos e (B) Média $\pm$ EPM de liberação de H_2O_2 . * Diferente de CS; † Diferente de DS; # Diferente de DSI; ‡ Diferente de CE; § Diferente de DE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 10 animais por grupo.

A produção de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas de coração, energizadas com glutamato e malato, foi monitorada espectrofluorimetricamente e está mostrada na Figura 5. O experimento representativo (Figura 5 A) e as médias (Figura 5 B) mostram que mitocôndrias isoladas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 produzem menores quantidades de H_2O_2 quando comparados ao controles (DS vs. CS). Nem o treinamento físico (DS vs. DE), nem o tratamento com insulina (DS vs. DSI) isolados reverteram a reduzida produção mitocondrial de H_2O_2 . Entretanto, quando associados os tratamentos, insulina e treinamento físico (DS vs. DEI) reverteram a reduzida liberação de H_2O_2 pelas mitocôndrias. Nos controles, o treinamento físico não alterou a produção de H_2O_2 (CS vs. CE).

A capacidade de captação de Ca^{2+} por mitocôndrias cardíacas de animais diabéticos foi monitorada espectrofluorimetricamente usando Calcium Green 5N como um indicador de $[Ca^{2+}]$ extramitocondrial (Figura 6). As mitocôndrias de animais diabéticos apresentaram maior capacidade de captação de Ca^{2+} (32% a mais) quando comparadas aos controle (CS vs. DS). O treinamento físico isolado (DS vs. DE) e o tratamento com insulina isolado (DS vs. DSI) normalizaram a habilidade mitocondrial em captar Ca^{2+} , com um efeito mais pronunciado da insulina (DS vs. DSI). Nos controles, o treinamento físico não alterou a captação de Ca^{2+} mitocondrial.

Os traços da dinâmica da concentração externa de Ca^{2+} , em resposta a adições sequenciais de Ca^{2+} , representados na Figura 6 B mostraram que mitocôndrias isoladas de corações de ratos diabéticos não sustentam a pre-carga de Ca^{2+} (após 6 adições de 20 nmol de Ca^{2+}) em contraste com mitocôndrias isoladas do coração de animais controle (CS vs. DS). Isso indica um aumento da susceptibilidade de permeabilização da membrana mitocondrial interna induzida pela sobrecarga de Ca^{2+} . Em contrapartida, ambos os tratamentos (insulina e exercício físico) isolados reduziram ainda mais a capacidade das mitocôndrias cardíacas em reter Ca^{2+} (DS vs. DSI, DS vs. DE). Por outro lado, o programa de natação associado ao tratamento com insulina restaurou a permeabilidade membrana induzida por Ca^{2+} para níveis semelhantes aos dos controles. Nos animais controle, o treinamento físico com natação, não alterou a susceptibilidade a abertura de PTPM em mitocôndrias isoladas do músculo cardíaco. A Figura 6 C mostra que CSA, um inibidor clássico de abertura de PTPM preveniu totalmente a liberação de Ca^{2+} acumulado nas mitocôndrias de ratos diabéticos tratados com insulina isolada (DSI) ou treinamento físico isolado (DE) após adição de 6 nmol de Ca^{2+} .

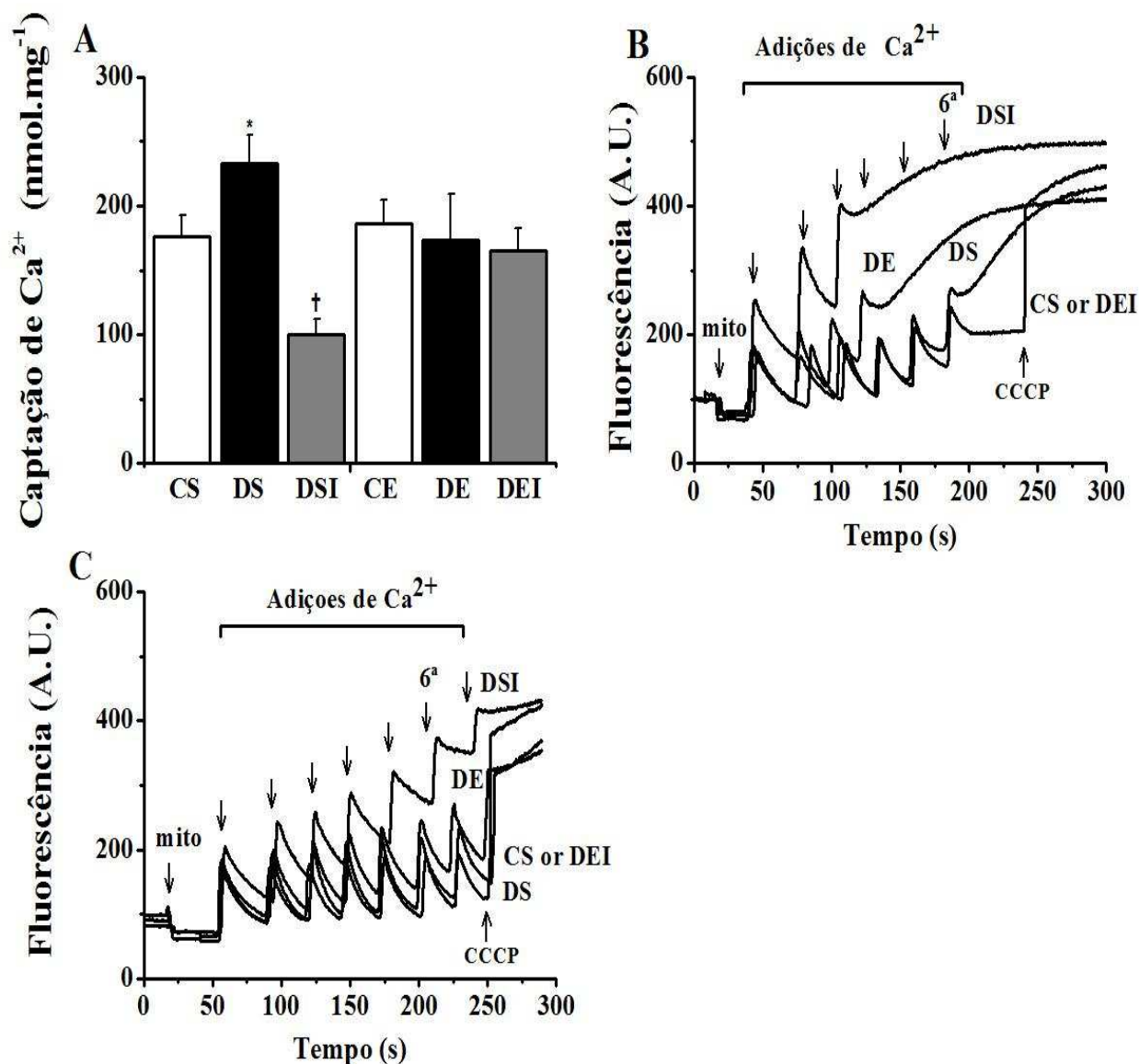


Figura 6. Dinâmica de Ca^{2+} em mitocôndrias isoladas do ventrículo esquerdo de corações de ratos.

Controle sedentário (CS); Diabético sedentário (DS); Diabético sedentário tratado com insulina (DSI); Controle exercitado (CE); Diabético exercitado (DE); Diabético exercitado tratado com insulina (DEI). (A) Captação de Ca^{2+} mensurada na presença de $1 \mu\text{M}$ CSA. (B) Capacidade de Retenção de Ca^{2+} na ausência de $1 \mu\text{M}$ CSA. (C) Capacidade de retenção de Ca^{2+} na presença de $1 \mu\text{M}$ CSA. As mitocôndrias (mito, $0,5 \text{ mg de proteína / mL}$) foram adicionados no meio padrão, sob as condições descritas anteriormente. Foram adicionados 20 nmol de Ca^{2+} ou 1 mM CCCP. CCCP foi usado para reduzir o potencial de membrana e liberar o Ca^{2+} . Traços são representativos de cinco experimentos com diferentes preparações mitocondriais de cada grupo. *Diferente de CS; †Diferente de DS; #Diferente de DSI; ¥ Diferente de CE; § Diferente de DE. Os dados são expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$ da média de 10 animais por grupo.

Em corações de ratos diabéticos sedentários por 8 semanas observou-se significativo aumento na expressão de Nox4 (CS vs. DS) (Figura 7 A) e isso foi reduzido pelo tratamento com insulina isolado (DS vs. DSI), enquanto o treinamento físico isolado não produziu nenhum efeito (DS vs. DE). A expressão de Nox4 no coração de ratos diabéticos ao nível dos controles foi obtida apenas quando os tratamentos insulina e treinamento físico foram combinados (CS vs. DEI).

Além de apresentar aumento da expressão de NOx4, os corações de ratos diabéticos mostraram diminuição no conteúdo de SOD (CS vs. DS), que não foi revertido por ambos os tratamentos (insulina e treinamento físico) ou pela combinação desses (Figura 7B).

A proteína cardíaca de animais com diabetes induzindo por STZ foi mais oxidada. (CS vs. DS), um efeito que foi revertido pelo tratamento com insulina isolado (Ds vs. DSI) ou combinado com o treinamento físico (DS vs. DEI).

Nos animais controle, o treinamento físico não afetou nenhum parâmetro do estresse oxidativo no ventrículo esquerdo desses gupos (CS vs. CE).

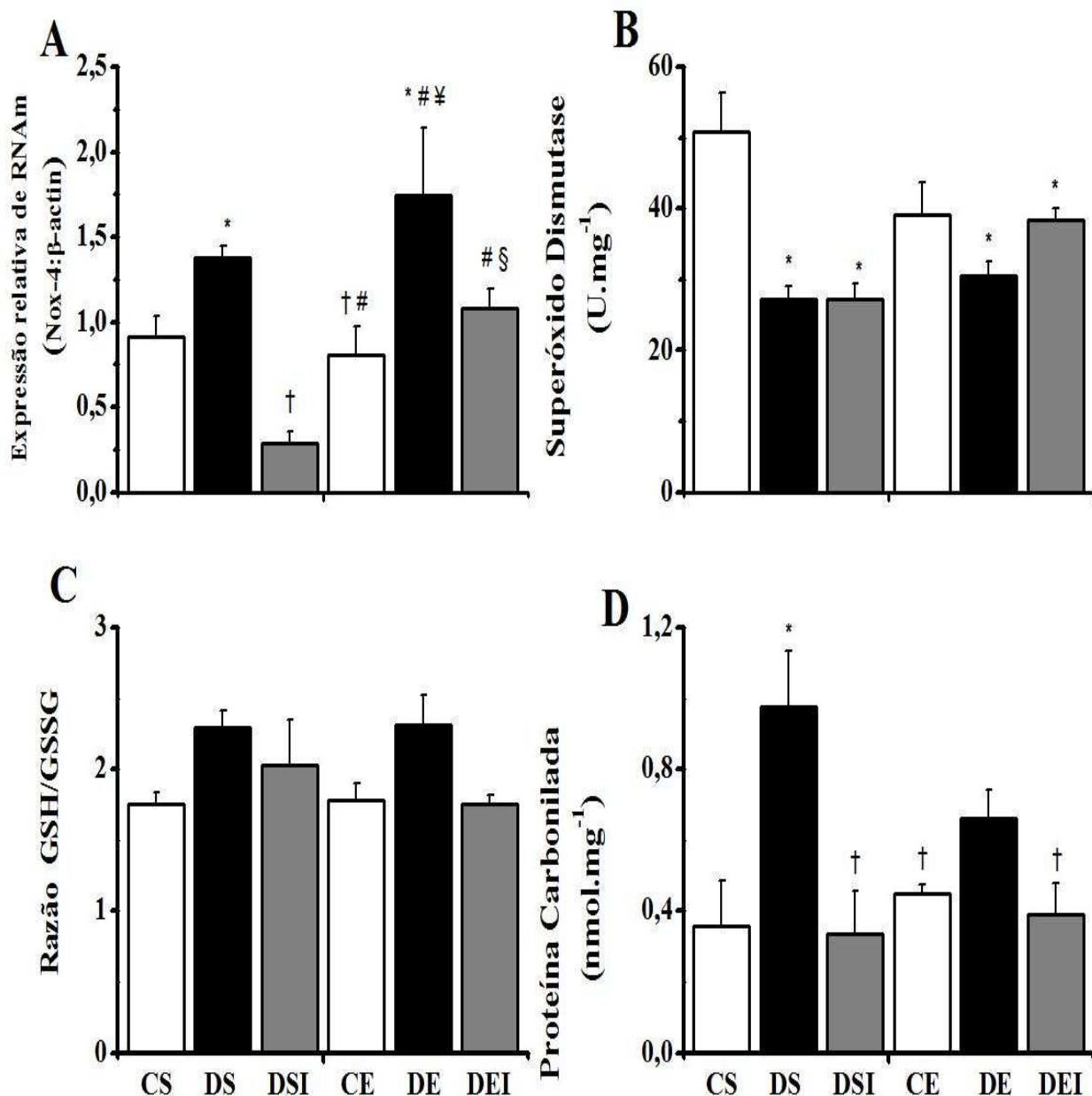


Figura 7. Parâmetros de estado redox em ventrículo esquerdo de corações de ratos.

Controle sedentário (CS); Diabético sedentário (DS); Diabético sedentário tratado com insulina (DSI); Controle exercitado (CE); Diabético exercitado (DE); Diabético exercitado tratado com insulina (DEI). (A) Expressão relativa de RNAm de NADPH oxidase 4 (Nox4); (B) Superóxido Dimutase (SOD); (C) Razão relativa de Glutathiona oxidada/ glutathiona reduzida e (D) Dosagem de proteína carbonilada. *Diferente de CS; †Diferente de DS; #Diferente de DSI; ¥ Diferente de CE; § Diferente de DE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 10 animais por grupo.

6.4 Ultraestrutura Mitocondrial

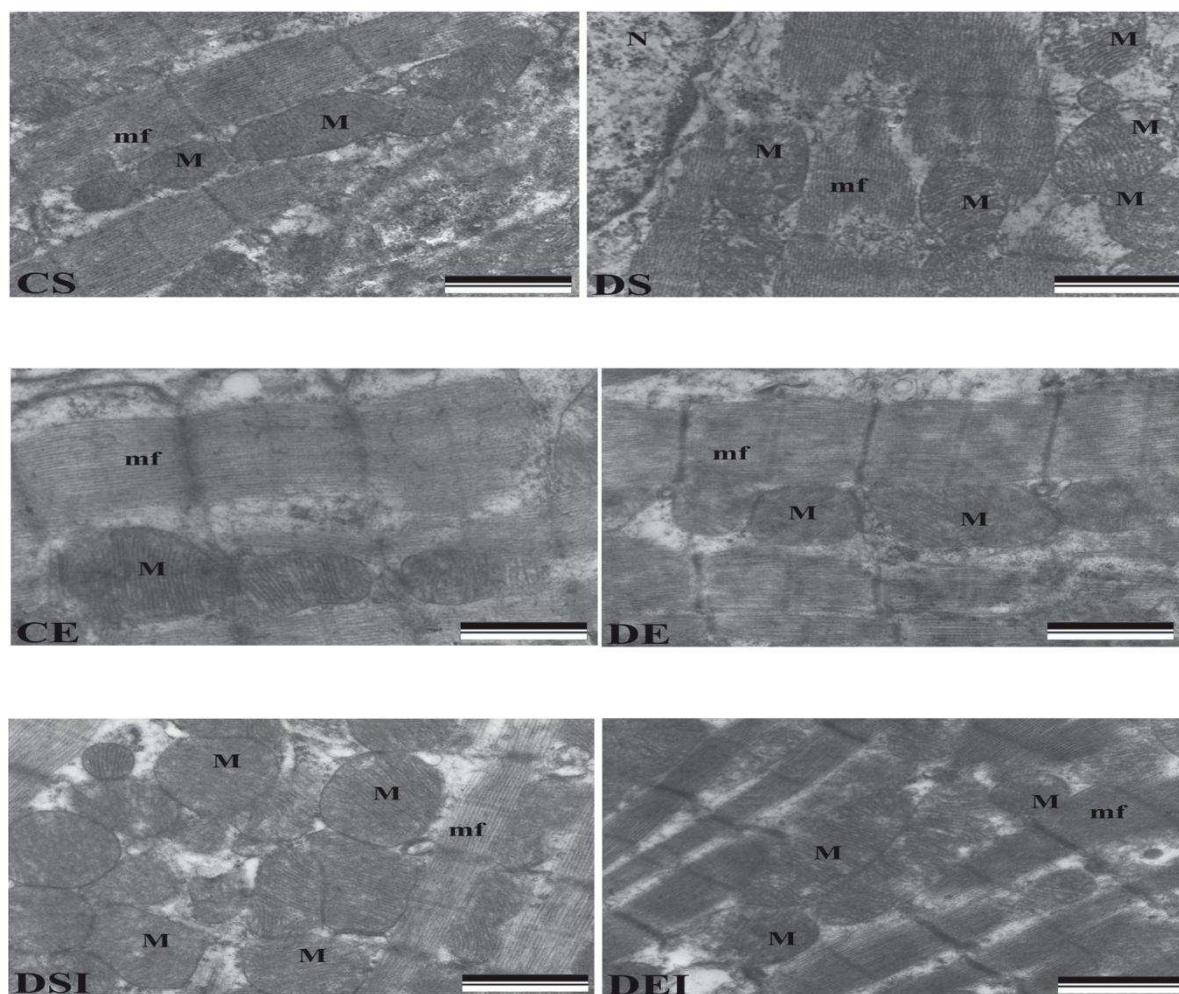


Figura 8. Ultraestrutura de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos de corações de ratos.

Controle sedentário (CS); Diabético sedentário (DS); Diabético sedentário tratado com insulina (DSI), Controle exercitado (CE); Diabético exercitado (DE); Diabético exercitado tratado com insulina (DEI). Mitocôndrias (M); Miofibrilas (mf); Núcleo (N). Barras = 1 μm. Em cardiomiócitos de animais com diabetes ocorre desorganização das miofibrilas (estrela) e interrupção das cristas mitocondriais (cabeça de seta). O tratamento com insulina e treinamento físico aeróbico reduz essa desorganização e atenua as alterações nas cristas mitocondriais.

A Figura 7 apresenta detalhes ultraestruturais de cardiomiócitos dos animais dos grupos experimentais. O DMT1 induziu a desorganização das cristas mitocondriais e o aumento do tamanho mitocondrial indicando intumescimento mitocondrial e interrupção de cristas (CS vs. DS). Além disso, foi observado ainda um aumento do número de

mitocôndrias no VE de ratos diabéticos quando comparados aos controles, o que pode ser indicativo de aumento da biogênese mitocondrial em resposta a hiperglicemia desenvolvida por esses animais.

No que tange aos efeitos dos tratamentos insulina e treinamento físico combinados (DS vs.DEI), é relevante notar que um volume e um número de reduzido quando comparamos aos outros grupos indicando uma redução das anormalidades mitocondriais quando insulina e treinamento físico são combinados. Nos animais controle as micrografias apresentadas na Figura 8 (CS vs. CE) indicam que o treinamento físico aumentou o número e o volume mitocondrial e não alterou a morfologia das cristas mitocondriais.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós examinamos os efeitos de um programa de natação isolado ou combinado ao tratamento com insulina sobre a homeostase de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos do VE, no estresse oxidativo cardíaco, na função de mitocôndrias do miocárdio, na ultraestrutura de mitocôndrias de cardiomiócitos do VE e na função sistólica de corações de ratos com DMT1 experimental. Vale ressaltar que os efeitos do tratamento com insulina isolado parece promover respostas mais significativas quando comparado ao tratamento com treinamento físico isolado. No que se refere a esses efeitos combinados, das variáveis estudadas, a frequência cardíaca, a fração de encurtamento, a fração de ejeção, a amplitude e o tempo para o decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a captação mitocondrial de Ca^{2+} , a expressão de UCP2, a produção de H_2O_2 , a expressão de Nox4, o conteúdo de proteína carbonilada e as alterações nas cristas mitocondriais foram normalizadas com a combinação dos tratamentos. Isso sugere que o tratamento com insulina e treinamento físico associados podem produzir efeitos mais pronunciados quando combinados do que ambos os tratamentos isolados.

Como esperado, o tratamento com insulina isolada ou combinado com o treinamento físico reduziu os níveis glicêmicos em animais diabéticos sedentários. Resultados semelhantes foram encontrados por Lahaye et al. (2011). Esses achados estão associados aos efeitos hipoglicêmicos da insulina, além do aumento da sensibilidade das células alvo a esse hormônio em resposta ao treinamento físico. Por outro lado, o treinamento físico isolado ou a terapia com insulina isolada não normalizou a glicose plasmática dos animais diabéticos. 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; Silva et al.2010). Isso pode ser explicado, em parte,

pelas diferentes respostas quando diabéticos tipo 1 e tipo 2 são submetidos ao exercício físico. 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) 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. Ainda, 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.

Além disso, a etiologia do diabetes e a diferença nos protocolos de exercício podem explicar as diferenças nas 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, quando o exercício não alterou a glicemia plasmática.

No que tange a insulino-terapia, é possível que a ausência de normalização da glicemia em animais diabéticos se deva principalmente a diferenças nos procedimentos experimentais no que se refere ao espaço de tempo entre o momento de aplicação da insulina, o tempo de ação da mesma e o horário de aferição da glicemia. É possível que no momento de aferição da glicemia, a insulina ministrada já havia cessado sua ação, sendo essa não detectada na glicemia de jejum. Além disso, vale lembrar que essa glicemia era determinada no primeiro dia de cada semana e dessa forma os valores glicêmicos apresentados pelos animais nos outros dias da semana permaneceram sem aferição podendo esconder possíveis efeitos da insulino-terapia em outros momentos experimentais.

Nos observamos que DMT1 reduziu a frequência cardíaca de repouso dos animais, como mostrado por estudos anteriores (Howarth et al., 2006; Borges et al., 2006). Isso pode ser explicado pela reduzida expressão de receptores beta-adrenérgicos (β_1 e β_2) em cardiomiócitos de animais com diabetes (Matsuda et al., 1999; Bidasee et al., 2008). Como esperado, a redução na frequência cardíaca de repouso foi normalizada em animais sedentários e treinados tratados com insulina como descrito previamente por Ramanadhan et al., 1983; Lahaye et al., 2010; Howarth et al., 2006; Jorge et al. 2012, uma vez que esse hormônio exerce efeito inotrópico e cronotrópico positivo sobre o miocárdio (Lucchesi et al. 1972; Aulbach et al., 1999). Apesar da literatura mostrar bradicardia de repouso induzida pelo treinamento físico em indivíduos e modelos experimentais, no presente estudo, o treinamento físico não alterou a frequência cardíaca dos animais controle treinados. Assim,

é possível que a intensidade do treinamentos em natação (5 % do peso corporal), não foi suficiente para promover tal adaptação.

O aumento do intervalo QT observado pode ser explicado, em parte, pelo prolongamento do potencial de ação em cardiomiócitos de ratos diabéticos (Jourdon & Feuvray, 1993; Lacombe et al., 2007). Além disso, Casis & Echevarria (2004) mostraram diferentes alterações nas correntes iônicas nas células cardíacas de animais diabéticos, principalmente, na redução na corrente de potássio durante a repolarização, o que estende o referido intervalo. Um intervalo QTc prolongado aumenta o risco de arritmia ventricular e morte súbita, principalmente, em atividades onde há aumento da sobrecarga ventricular. Vale ressaltar que a combinação entre insulina e treinamento físico melhora a condutibilidade elétrica do coração e reduz o risco de arritmias e morte súbita.

Nesse estudo, foi utilizada a razão massa do coração/massa corporal como índice de hipertrofia cardíaca e nenhuma diferença entre os grupos foi notada para que pudesse caracteriza-la em animais controle ou diabéticos. Paralelamente, foi verificado no intervalo QT aumento de 20,6% em animais diabéticos (CS vs. DS). Apesar de não apresentar significância estatística nosso estudo mostrou tendência a um aumento de 6,2% no intervalo QTc em resposta à hiperglicemia. Esses achados são semelhantes aos de Howarth et al. (2011) que mostraram prolongamento dos intervalos QT e QTc em ratos com diabetes mellitus tipo 1 induzido por aloxana.

Esses resultados podem indicar potencial risco de hipertrofia cardíaca uma vez que o prolongamento desses intervalos se correlaciona positivamente com o aumento da massa ventricular esquerda, como sugerido por Oikarinen et al. (2001). Vale lembrar que essas alterações foram encontradas em animais no repouso. Assim, é necessário enfatizar que essas alterações eletrocardiográficas podem se acentuar durante o treinamento físico e comprometer a performance cardíaca, além de aumentar o risco de morte súbita durante o exercício físico. Em contrapartida, o tratamento com insulina isolado e combinado com treinamento físico normalizou as alterações em ambos os intervalos. Os efeitos positivos do tratamento com insulina e do treinamento físico estão associados ao restabelecimento das correntes iônicas em cardiomiócitos. A análise dos parâmetros ecocardiográficos mostrados nos indica que o diabetes reduziu a fração de encurtamento e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo dos animais. Isso sugere disfunção sistólica ventricular esquerda comumente relatada (Loganathan et al., 2007; Stolen et al., 2009; Loganathan et al., 2012). A redução na fração de ejeção, assim como na fração de encurtamento, revela disfunção contrátil do ventrículo esquerdo, reduzindo a performance cardíaca e consequentemente o débito cardíaco

em animais diabéticos. Em contrapartida, o treinamento físico, associado ao tratamento com insulina, reduz essas disfunções. O aumento na fração de ejeção e de encurtamento está envolvido no aumento da amplitude de contração de cardiomiócitos de animais diabéticos em resposta ao exercício físico (Silva et al., 2010), assim como na ação inotrópica e cronotrópica da insulina sobre o miocárdio, como mostrou Lucchesi et al. (1972).

Juntamente com o crescimento dos animais no final do período experimental, os ratos diabéticos, exibem menor massa do coração. Nos animais diabéticos além da redução na secreção de insulina, há a redução na secreção de outros hormônios como hormônio do crescimento, glucagon, polipéptido pancreático e fator de crescimento semelhante à insulina, o que afeta o crescimento (Menon et al., 1994 ; Gomes et al., 2009). Por outro lado, este estudo verificou que o tratamento com insulina aumentou o ganho de massa cardíaca e a relação massa do coração/massa corporal em animais diabéticos tanto sedentários quanto treinados.

Os dados mostraram ainda que, o treinamento físico com natação associado ao tratamento com insulina atenuou as disfunções no transiente de $[Ca^{2+}]_i$, na expressão de Nox4, no estresse oxidativo, nos parâmetros respiratórios mitocondriais, na produção de H_2O_2 , na expressão de UCP2, na mobilização de cálcio e na susceptibilidade à abertura de PTPM causados pelo diabetes mellitus induzido por STZ.

Aqui, o diabetes reduziu a amplitude e prolongou o tempo para o decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. Essas disfunções tem sido mostradas por outros estudos (Lacombe et al., 2007; Shao et al., 2009) e levam à disfunção contrátil assim como redução na capacidade de bomba do miocárdio (Shao et al., 2007; Howarth et al., 2008; Howarth et al., 2009; Silva et al., 2010). A redução na amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ observada aqui pode ser associada a disfunções em proteínas regulatórias da homeostase de cálcio intracelular em cardiomiócitos. Por exemplo, a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático não é uniforme em cardiomiócitos de ratos com diabetes o que pode ser explicado em parte pela redução no número de RYR 2 funcionais, além de reduzida atividade dos canais de cálcio como verificado por Shao et al. (2007). Além disso, as disfunções observadas no tempo para o decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ podem estar relacionadas a redução na expressão e /ou atividade de SERCA2, importante regulador da homeostase intracelular de Ca^{2+} .

Além do exposto, nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que as disfunções no transiente de $[Ca^{2+}]_i$ podem estar associadas ao aumento da capacidade de captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias observado em ratos diabéticos. As mitocôndrias são sensíveis a concentração de Ca^{2+} , que é um importante modulador do metabolismo mitocondrial (ciclo

do ácido tricarboxílico). Além disto, estas organelas podem agir como um sistema de tamponamento de Ca^{2+} , removendo-o e modulando a concentração de cálcio local. O Ca^{2+} é transportado através da membrana interna da mitocôndria por dois mecanismos: um uniporter (MCU) e um modo de absorção rápida (RaM). Eles dependem do gradiente eletroquímico do Ca^{2+} definido pelo potencial elétrico da membrana e pela $[\text{Ca}^{2+}]_i$. As taxas de fluxo de cálcio via MCU são rápidas. A captação de Ca^{2+} através de RaM ocorre muito mais rápido do que via MCU, sendo que no início do pulso de Ca^{2+} a localização das mitocôndrias próximas aos sítios de liberação de Ca^{2+} (retículo sarcoplasmático) ou próximas aos canais de Ca^{2+} da membrana facilita a manipulação do Ca^{2+} por essas organelas, como sugerem Gunter et al. (2000); Szabadkai e Duchen (2008). Ainda, em diferentes tipos de células um aumento do pico da concentração de Ca^{2+} mitocondrial em resposta a estímulos que induzem a mobilização de Ca^{2+} tem sido descrito como um fator que induz o aumento da expressão de UCP2 e UCP3 (Trenker et al., 2007).

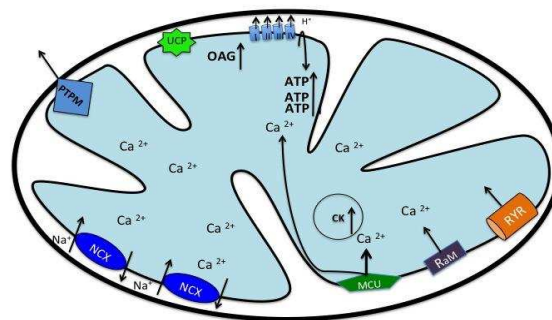
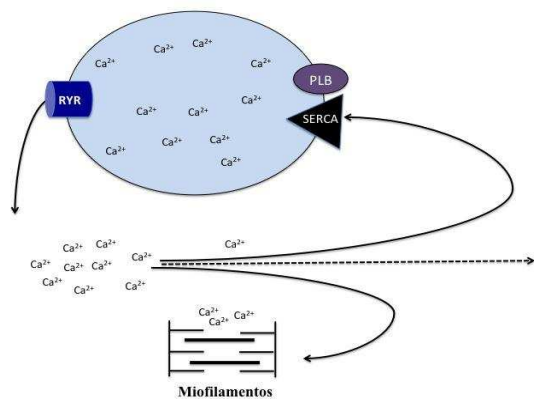
Foram encontrados indícios da atividade de UCP, como aumento da taxa de respiração em repouso, aumento da expressão de UCP2 e redução de produção de H_2O_2 mitocondrial. Assim, nossos achados são semelhantes aos de outros estudos (Bugger et al., 2008; Heirlen et al., 2009), mostrando que as mitocôndrias não são as organelas responsáveis pelo dano oxidativo demonstrado em alguns estudos (Sun et al., 1999; Aragano et al., 2008) que tratam desse dano em animais diabéticos. Em nosso experimento, o dano oxidativo foi relacionado principalmente com a expressão elevada de Nox4, como demonstrado por Maalouf et al. (2011).

Nossos resultados sugerem ainda, que o aumento da atividade de Nox4 poderia sensibilizar a abertura de PTMP na mitocôndria cardíaca de ratos com diabetes induzido por STZ, visto que a atividade de Nox4 leva a oxidação de cisteína das proteínas mitocondriais, incluindo componentes do complexo PTMP, e induz dano mitocondrial, como mostrado por Ago et al. (2010). Este aumento da sensibilidade associada à carga excessiva de Ca^{2+} nas mitocôndrias poderia disparar a abertura de PTMP, seguido da dissipação do potencial de membrana mitocondrial e inchamento das mitocôndrias, como sugerido pelo esquema na Figura 9. Estes eventos podem levar à liberação de mediadores de apoptose, como citocromo c, causando morte celular, piora da energética miocárdica e falha cardíaca, como documentado por Luo et al. (2013).

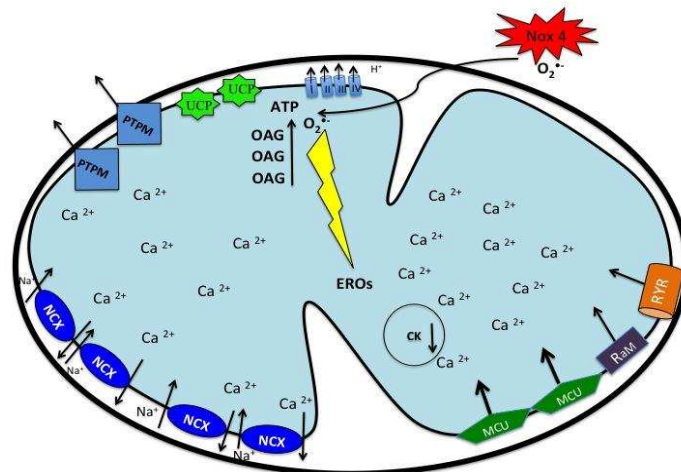
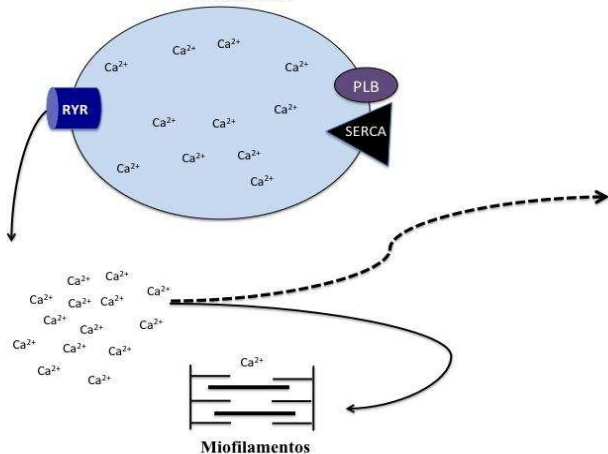
Retículo Sarcoplasmático

Mitocôndria

Normal



Diabético



Legenda



Poro de transição de permeabilidade mitocondrial



Trocador sódio/cálcio



Canal uniporta



Fosfolamban



Ciclo de Krebs



Espécies reativas de oxigênio



Oxidação de ácidos graxos



NADPH Oxidase 4



ATPase do retículo sarcoplasmático



Receptor de rianodina mitocondrial



Proteína desacopladora

Figura 9. Esquema representativo da função mitocondrial em cardiomiócitos de animais normais e diabéticos. No diabetes há um aumento da oxidação de ácidos graxos induz a um elevado consumo de oxigênio e aumento da produção de EROs. Ainda, há um aumento na ativação de Nox 4 o que eleva os níveis de EROs, com comprometimento do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons o que reduz a produção de ATP e a reserva de energia miocárdial. A diminuição da produção de ATP leva a redução na recaptção de Ca^{2+} via SERCA e consequentemente um aumento do Ca^{2+} citosólico. Assim, mitocôndrias se adaptam aumentando a captação de Ca^{2+} via MCU o que eleva os níveis de Ca^{2+} mitocondrial, contribuindo para a abertura de PTPM, intumescimento, aumento de NCX

e alterações na morfologia mitocondrial. Essas alterações levam a disfunção contrátil, redução da função de bomba e da performance cardíaca.

O aumento da expressão de Nox4 demonstrado aqui pode estar associado ainda ao prolongamento do tempo para o decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e às disfunções nas proteínas regulatórias da homeostase de Ca^{2+} . Teshima et al. (2000) mostraram que três semanas de diabetes induzido por STZ foram suficientes para deprimir a expressão de SERCA2 e induzir o aumento do $[Ca^{2+}]_i$. Esse aumento no tempo para o decaimento do Ca^{2+} indica que a concentração de Ca^{2+} no citosol permanece elevada após a contração celular comprometendo tanto o relaxamento quanto um novo ciclo contração-relaxamento.

Alguns estudos vem buscando explicar quais alterações celulares podem ser desencadeadas pelo aumento do Ca^{2+} intracelular. Nishio et al. (2012) por exemplo, mostraram que o aumento do $[Ca^{2+}]_i$ mediado por trocador Na^+/H^+ e trocador Na^+/Ca^+ aumenta a fosforilação de CaMKII e a expressão de NADPH oxidase em cardiomiócitos isolados expostos a altas concentrações de glicose. Esses autores mostraram ainda aumento da produção de EROS e de componentes de NADPH Oxidase (p46phox e p67phox) nesses cardiomiócitos. Porém, essas alterações foram atenuadas com a inibição de CaMKII por KN93. Assim, a ativação de CaMKII devido a disfunções no transiente de Ca^{2+} pode estar associada ao aumento de produção de EROS induzida por Nox4 em corações de ratos com DMT1 experimental.

Um dos resultados mais importantes desse estudo é que oito semanas de tratamento com insulina e treinamento físico foram eficientes em restaurar a homeostase intracelular de Ca^{2+} e normalizar a captação mitocondrial desse íon e o tempo para o decaimento do transiente de Ca^{2+} em miócitos cardíacos isolados do ventrículo esquerdo de ratos com DMT1. Contudo, a terapia com insulina isolada restaurou a expressão de Nox4 e o dano oxidativo, o que demonstra que essas alterações estão estritamente relacionadas à hiperglicemia em diabéticos. Isolados, ambos tratamentos falharam em atenuar outras disfunções tais como expressão de UCP2, taxas de respiração, produção de H_2O_2 e a susceptibilidade à PTMP, assim como a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, que foram restaurados apenas quando combinados treinamento físico e a terapia com insulina.

Separadamente, os efeitos do treinamento físico com esteira rolante por 14 semanas mostrou prevenir a elevação de proteínas associadas à formação de poro PTMP (canais anion voltagem dependente, adenina translocase e ciclofilina D) e os sinais apoptóticos (Bax, Bcl2, capase 3, caspase 9 e aumento de Bcl2) em corações de ratos diabéticos (Lumini-

Oliveira et al., 2011). O tratamento com insulina melhora a atividade dos complexos I, II e IV depois de quatro semanas de diabetes, como sugere Remor et al (2011). É provável que isso esteja relacionado ao aumento da expressão de RNAm para PGC-1 α , responsável pela regulação de genes envolvidos na biogênese mitocondrial (Mootha et al., 2003). No entanto, em nosso estudo, oito semanas de tratamento com insulina e treinamento físico separados foram capazes de restaurar a captação mitocondrial de Ca²⁺. Todos os outros parâmetros mitocondriais foram parcialmente restaurados.

Embora não tenham sido medidas as proteínas reguladoras da homeostase de Ca²⁺, o efeito celular poderia estar associado ao aumento na expressão e/ou atividade dessas proteínas naqueles animais treinados e tratados com insulina. O aumento de RYR2, por exemplo, aumenta a liberação de Ca²⁺ desencadeada pela corrente de Ca²⁺ tipo L (Ica_L), que normaliza a amplitude do transiente de [Ca²⁺]_i. A quantidade de Ca²⁺ liberado pelo RS é dependente da carga de Ca²⁺ desse retículo que é aumentada através da elevação na expressão e/ou atividade de SERCA 2, como previamente descrito por Bers (2002).

De fato, nossos resultados mostraram redução no tempo para o pico e para o decaimento do transiente de [Ca²⁺]_i em resposta ao treinamento físico ou treinamento combinado com insulina. Isso indica aumento na expressão e/ou atividade de RYR2 e SERCA2. Vale ressaltar que a liberação de Ca²⁺ induzida por Ca²⁺ é insulino dependente, uma vez que a insulina regula a função cardíaca por estimulação de Ica_L (Aulbach et al., 1999). A insulina também interage com SERCA2 via substrato receptor de insulina (IRS) indicando que a ligação das proteínas IRS a SERCA 2 é modulada pela insulina (Tsujino et al., 2006). Além disso, a recaptação de Ca²⁺ pelo RS e a taxa de saída de Ca²⁺ pelo trocador sódio- cálcio (NCX) são deprimidas em cardiomiócitos de ratos diabéticos, como previamente demonstrado por Takeda et al. (1996); Choi et al. (2002) e Lahaye et al. (2010). Além dessas alterações, o diabetes promove a inibição da fosforilação de SERCA2 por fosfolambam e isso parece ser o maior responsável pela disfunção de SERCA2 em corações de animais diabéticos (Vasanji et al., 2004). Juntas, essas alterações contribuem para a ocorrência de sobrecarga intracelular de Ca²⁺ na cardiomiopatia diabética resultando em disfunção contrátil (Lacombe et al., 2004).

No que se refere às alterações na ultraestrutura dos cardiomiócitos, nosso estudo verificou que oito semanas de DMT1 experimental foram suficientes para induzir anormalidades na morfologia mitocondrial. Os dados indicam que, além de mais numerosas, as mitocôndrias de animais diabéticos apresentam interrupções nas cristas e intumescimento. Resultados semelhantes foram encontrados por Searls et al. (2004); Mohamed (2006);

Lanlua et al. (2012). As interrupções das cristas mitocondriais em resposta a hiperglicemia está associada a alterações na proteômica mitocondrial, particularmente proteínas envolvidas com a morfologia dessas organelas como a mitofilina (Baseler et al., 2011). Os tratamentos treinamento físico e insulina combinados, aparentemente, atenuam o intumescimento mitocondrial, mas não restauram a morfologia das cristas mitocondriais. As alterações na morfologia mitocondrial de animais diabéticos podem ainda estar relacionadas à disfunção observada no transiente de $[Ca^{2+}]_i$, que induz a perda da permeabilidade da membrana mitocondrial e contribui para o intumescimento dessas organelas e a desorganização de suas cristas. Além do mais, o aumento da produção de EROS durante o diabetes induz a ligação dessas espécies a cardiolipina (um fosfolípido da membrana mitocondrial interna) e incorre na interrupção das cristas mitocondriais (Dabkowski et al., 2009). Essas mudanças na morfologia mitocondrial são seguidas de alterações na função mitocondrial que contribuem para a redução na produção de ATP, comprometendo o funcionamento cardíaco de maneira global.

Vale ressaltar ainda que um interessante resultado de nosso estudo foi que ambos os tratamentos insulina e treinamento físico, isolados ou combinados, restauraram o tempo para o decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos isolados do ventrículo esquerdo dos ratos com DMT1, sendo a restauração mais pronunciada em animais exercitados e tratados com insulina. Esses resultados apresentam relevância clínica na medida em que o exercício físico associado a insulina pode reduzir as disfunções contráteis em corações de pacientes com diabetes.

8. CONSIDERAÇÕES

Em síntese, o programa de treinamento em natação associado ao tratamento com insulina:

- ✓ Aumentou a amplitude do transiente intracelular de $[Ca^{2+}]_i$;
- ✓ Reduziu o tempo para o pico e o tempo para o decaimento do transiente intracelular de $[Ca^{2+}]_i$;
- ✓ Reduziu a captação mitocondrial de Ca^{2+} ;
- ✓ Diminuiu a expressão de UCP2 e Nox4;
- ✓ Atenuou o dano oxidativo;
- ✓ Reduziu os intervalos QT e QTc;
- ✓ Aumentou a frequência cardíaca;
- ✓ Aumentou a fração de ejeção ;

- ✓ Restaurou a susceptibilidade a abertura de PTPM;
- ✓ Restaurou a produção de H_2O_2 ;
- ✓ Restaurou o consumo de O_2 ;
- ✓ Atenuou as alterações na ultraestrutura mitocondrial;

9. CONCLUSÕES

Assim, podemos concluir:

- 1) Quanto a biometria, glicemia e parâmetros eletro e ecocardiográficos: a insulina comparada ao treinamento físico foi mais eficiente em atenuar as disfunções decorrentes do diabetes e houve pouca interação quando os tratamentos foram combinados;
- 2) Quanto ao transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a combinação entre os tratamentos foi mais eficiente em aumentar a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e os tratamentos isolados ou combinados foram eficientes em reduzir o tempo para o decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$,
- 3) No que se refere a função mitocondrial, os efeitos foram similares quando comparados treinamento físico e insulina e a combinação entre os tratamentos promove maiores atenuações na disfunção mitocondrial induzida pelo diabetes quando comparada com os tratamentos realizados isoladamente.

10. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O diabetes descompensado pode ter limitado a capacidade dos animais em realizar o protocolo de treinamento físico assim como o tipo de insulina utilizada pode ter reduzido a resposta desses animais à insulinoterapia, alterando respostas importantes no que se refere aos efeitos da insulina sobre a glicemia de jejum por exemplo.

Sobre a efetividade do protocolo de treinamento físico, vale lembrar que adaptações importantes como redução da frequência cardíaca de repouso induzida pelo treinamento físico não foram verificadas pelo presente estudo, o que pode indicar que a intensidade do treinamento não foi suficiente para promover tal adaptação. Para protocolo de natação utilizado não se dispunha de nenhum método para determinação exata da intensidade de exercício e isso pode ter influenciado bastante as respostas encontradas tanto em animais diabéticos quanto nos controles.

11. APLICABILIDADE DO ESTUDO PARA HUMANOS DIABÉTICOS

O tratamento medicamentoso com insulina no diabetes mellitus tipo 1 e em algumas casos no diabetes tipo 2 tem sido amplamente utilizado para minimizar os efeitos da hiperglicemia nos diferentes sistemas orgânicos em seres humanos diabéticos. Da mesma forma, o tratamento não-medicamentoso com exercícios físicos tem sido um tratamento importante na redução das complicações decorrentes do diabetes. Porém, deve existir cautela quando se trata de relacionar a dose de insulina utilizada e o início do treinamento físico para que a combinação dos dois tratamentos não induza a hipoglicemia severa, causando convulsões ou até mesmo a morte do paciente. Além disso, é preciso verificar qual a intensidade do treinamento físico é mais eficiente em promover adaptações relevantes, principalmente no que se refere ao músculo cardíaco e que sejam compatíveis com o controle metabólico e o estado de saúde do paciente. Sendo assim, esse estudo torna-se extremamente relevante pois possibilita uma reflexão acerca da importância da combinação entre os dois tratamentos (treinamento físico e insulina) no tratamento do diabetes mellitus e consequente redução das complicações decorrentes da hiperglicemia. Além disso, o presente estudo pode ser aplicado diretamente em humanos para que seja possível criar um protocolo de treinamento físico tendo a natação como atividade principal com o objetivo não só de reduzir a glicemia dos pacientes, mas também analisar as adaptações do coração de pacientes diabéticos ao treinamento físico combinado com insulina que poderão reduzir as disfunções cardíacas desses pacientes.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. Circ Res. v.106, n.16, Apr, p.1253-64. 2010.
2. Aires MM. Fisiologia. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
3. Akbarzadeh A, Norouzzian D, Mehrabi M.R Jamshidi, Farhangi A , 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.

4. Albright A, Franz M., Hornsby, G., Kriska, A., Marrero D., Ullrich I, Verity LS. 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.

5. An, D, 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.

6. Aragno M, Mastrocola R, Alloatti,G, I. Vercellinato P, Bardini, S. Geuna, Catalano M.G, O. Danni, G. Boccuzzi, Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. Endocrinol, v. 149, n.1, Jan, p. 380-388. 2008.

7. Armstrong J.S, Mitochondrial Medicine: Pharmacological targeting of mitochondria in disease. Br J Pharmacol. v.151, n.8, Aug, p.1154-1165. 2007.

8. Ascensão A, Ferreira R, Magalhães J, Exercise-induced cardioprotection - biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. Intern J of Cardiol v. 117,n. 2, Jul, p.16–30. 2007.

9. Ascensão A Ferreira R, MagalhãesJ, Exercise-induce cardioprotection — biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. Int J of Cardiol, v. 117, n.1, Jul, p. 16–30.2007.

10. Ascensão A, Lumini-Oliveira J, Oliveira P.J, Magalhães J. Mitochondria as a target for exercise-induced cardioprotection. Curr Drug Targets, v. 12, n.6, Jun, p. 860-871. 2011.

11. Aulbach F, Simm A, Maier S, Langenfeld H, Walter U, Kersting U, Kirstein M, Insulin stimulates the L-type Ca²⁺ current in rat cardiac myocytes. Cardiovasc Res, v. 42 n., Sep, p.113-120. 1999.

12. Barbosa M.R, Sampaio I.H, Teodoro B.G, Sousa T.A, Zoppi C.C, Queiroz A.L, Passos M.A, Alberici L.C, Teixeira F.R, Manfiolli A.O, Batista T.M, Cappelli A.P, Reis R.I, Frasson D, Kettelhut I.C, Parreiras-e-Silva L.T, Costa-Neto C.M, Carneiro E.M, Curi R, Silveira L.R.Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin

resistant muscle cells: effect of catalase overexpression. Biochim Biophys Acta, v.10, n.1832, Oct, p. 591-604. 2013.

13. Baseler W.A, Dabkowski, E. R, Williamson, C.L, Croston, T.L, Thapa D, Powell M. J., Razunguzwa T. T, Hollander, J.M. Proteomic alterations of distinct mitochondrial subpopulations in the type 1 diabetic heart: contribution of protein import dysfunction. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol v. 300, n.4, Oct p. 186–200. 2011.

14. 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.

15. Bayeva M, Sawicki K.T, Ardehali H. Taking Diabetes to Heart–Deregulation of Myocardial Lipid Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy, J Am Heart Assoc, v.25, n.6, Nov, p.000-433. 2013.

16. Bedard K, Krause, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev, v. 87 n., Jan , p. 245–313. 2007.

17. 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.

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

19. Bers, D.M. Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. Front Biosci, v.7, n.1, jul, 1, p.23-49.2002.

20. 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.

21. 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.
22. Blomqvist, C. G. and Saltin, B. Cardiovascular adaptations to physical training. Annu Rev Physiol, v.45, May, p.169-89. 1983.
23. Borges G.R, Oliveira M, Salgado H.C, Fazan R. Myocardial performance in conscious streptozotocin diabetic rats. Cardiovasc Diabetol, v.5, n. ,Dec, p.26, 2006
24. Boudina, S., Abel, E. D. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. Physiol (Bethesda), v.21, Aug, p.250-8. 2006.
25. Boudina, S., Bugger, H., Sena, S., O'Neill, B. T., Zaha, V. G., Ilkun, O., Wright, J. J., Mazumder, P. K., Palfreyman, E., Tidwell, T. J., Theobald, H., Khalimonchuk, O., Wayment, B., Sheng, X., Rodnick, K. J., Centini, R., Chen, D., Litwin, S. E., Weimer, B. E. and Abel, E. D. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. Circulation, v.119, n.9, Mar 10, p.1272-83. 2009.
26. 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.
27. Broderick T. L., Poirier P, 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.
28. Brownsey RW¹, Boone AN, Allard MF. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. Cardiovasc Res, v. 34, n.1, p. 3-24, Apr.1997.
29. 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. Endocrinol, v.146, n.12, Dec, p.5341-9. 2005.

30. Bugger H., Boudina S., Hu X. X., Tuinei, J., Zaha V. G., Theobald H. A., Yun U. J., Mcqueen A. P., Wayment, B., Litwin, S. E., Abel, E. D. Type 1 diabetic akita mouse hearts are insulin sensitive but manifest structurally abnormal mitochondria that remain coupled despite increased uncoupling protein 3. Diabetes, v.57, n.11, Nov, p.2924-32. 2008.

31. Bugger, H., Abel, E. D. Mitochondria in the diabetic heart. Cardiovasc Res, v.88, n.2, Jul, p.229-40. 2010.

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

33. 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 Ca(2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.283, n.4, Oct, p.1398-408.2002.

34. Dabkowski E.R, Williamson C.L, Bukowski V.C, Chapman R.S, Leonard S.S, Peer C.J, et al. Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v. 296,n.2, Feb, p. 359–369, 2009.

35. Das, A. K. Diabetic heart disease--current problems and their management. J Assoc Physicians India, v.37, n.2, Feb, p.163-165. 1989.

36. 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.718-724. 2004.

37. 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.

38. 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.

39. 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.

40. Dent C.L, Bowman A.W, Scott MJ, Allen J.S, Lissauskas J.B, Janif M, Wickline S.A, Kovács S.J, Echocardiographic characterization of fundamental mechanisms of abnormal diastolic filling in diabetic rats with a parameterized diastolic filling formalism. J Am Soc Echocardiogr, v. 14, n.12,Dec, p.1166-117, 2001.

41. Dhalla N.S; Pierce G.N, Panagia V., Singal, PK; . Beamish RE, Calcium movements in relation to heart function. Bas Res in Cardiol, v.77, n.2, Apr, p. 117-139.1982.

42. Dhalla N.S, Rangi S, Zieroth S, Xu Y.J. Alterations in sarcoplasmic reticulum and mitochondrial functions in diabetic cardiomyopathy. Exp Clin Cardiol,v.17,n.3,Sep, p.115-120. 2012.

43. Dhalla N.S, Takeda N, Rodriguez-Leyva D, Elimban V.Mechanisms of subcellular remodeling in heart failure due to diabetes. Heart Fail Rev ,v.19, n.1, Jan, p. 87-99. 2014.

44. 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.

45. 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.

46. 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.

47. Duncan J.G, Mitochondrial dysfunction in diabetic cardiomyopathy. Bioch and Biophy Act, v. 1813, n. , Jan, p. 1351–1359, 2011

48. Dyntar, D., Eppenberger-Eberhardt, M., Maedler, K., Pruschy, M., Eppenberger, H. M., Spinas, 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.

49. Emter C.A, Baines CP, Low-intensity aerobic interval training attenuates pathological left ventricular remodeling and mitochondrial dysfunction in aortic-banded miniature swine. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v. 299, n.5, Nov, p. 1348-1356.2010.

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

51. 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.

52. 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.

53. 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. 867-77. 2006.

54. Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondrial

calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. Mitochondrion, v.12 , n. 1, Jan, p. 77-85. 2012.

55. Gomes R.J, Mello M.A, Caetano F.H, Sibuya C.Y, Anaruma C.A, Rogatto G.P., Pauli J.R, Luciano E. Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats, Growth Horm IGF Res , v.16, n.1, Oct-Dec,p 326-331. 2006.

56. 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.

57. Gornall A. G , Bardawill C.J, David M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem, v. 2, n.177, Feb, p.1751-66. 1949.

58. 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.

59. Gunter, T.E, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K. Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions, Cell Calcium, v. 28, n.5-6, Nov-Dec, p. 285-296. 2000.

60. 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.353-360.1997.

61. 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.

62. Hayat ,S.A, Patel B, Khattar R.S, Malik, R.A. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment, Clin Sci (Lond), v.107,n.6, Dec, p. 539-557.2004.

63. Herlein, J.A., Fink BD., O'Malley Y., Sivitz, W I., Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. Endocrinol, v. 150,n.1,Jan,p.46-55.2009.
64. Hidaka S, Kakuma T,Yoshimatsu H, SakinoH, Fukuchi S, Sakata T. Streptozotocin treatment upregulates uncoupling protein 3 expression in the rat heart, Diabetes v.48, n.2, Fev, p. 430-435.1999.
65. Hoppel, C. L., Tandler, B., Fujioka, H. and Riva, A. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. Int J Biochem Cell Biol, v.41, n.10, Oct, p.1949-56. 2009.
66. 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 Ca^{2+} in ventricular myocytes from the streptozotocin-induced diabetic rat. Ann N Y Acad Sci, v.1084, Nov, p.155-65.2006.
67. 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.105-114. 2008.
68. Howarth, F. C. and Qureshi, M. A. Myofilament sensitivity to Ca^{2+} in ventricular myocytes from the Goto-Kakizaki diabetic rat. Mol Cell Biochem, v.315, n.1-2, Aug, p.69-74. 2008.
69. 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, Sep, p.485-491. 2009.
70. Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M, Ljubisavljevic M, Adeghate E. Heart Rate, Body Temperature and Physical Activity Are Variously Affected During Insulin Treatment in Alloxan-Induced Type 1 Diabetic Rat. Physiol. Res, v. 60, n.1, Oct, p.65-73. 2011.

71. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Sixth edition, 2014.
72. Jorge L, Pureza D.Y, Dias S, Conti F.F, Irigoyen M.C, De Angelis K. Dynamic aerobic exercise induces baroreflex improvement in diabetic rats. Exp Diabetes Res v.108, n.1 ,Oct, p. 680. 2012.
73. Jourdon P, Feuvray D. Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. J Physiol Lond, v. 470, n. 1,Oct, p. 411-429.1993.
74. Katz, A. M. Molecular basis of calcium channel blockade. Am J Cardiol, v.69, n.13, Apr 30, p.17-22.1992.
75. Kemi, O. J., Ellingsen, O., Ceci, M., Grimaldi, S., Smith, G. L., Condorelli, G. and Wisloff, U. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca^{2+} cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. J Mol Cell Cardiol, v.43, n.3, Sep, p.354-361.2007.
76. Kim, H. W., Ch, Y. S., Lee, H. R., Park, S. Y. and Kim, Y. H. Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and phospholamban protein expression. Life Sci, v.70, n.4, Dec 14, p.367-379. 2001.
77. 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.271-283. 2008.
78. 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.

79. Korte, F. S., Mokelke, 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.
80. 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.1787-1797.2007.
81. 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, May, p.1529-1537.1996.
82. Lahaye D, Gratas-Delamarche A, Malarde L, Vincent S, Zguira M.S., Morel S.L., Delamarche P, Zouhal H, Carre F, Bekono F.R, Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac beta-adrenoceptors in diabetic rats. Cardiovasc Diabetol, v. 72 n.5 , Nov, p. 1-9. 2010.
83. Lahaye D, Rebillard A, Zguira M.S, Malardé L, Saïag B, Gratas-Delamarche A, Carré F, Bekono F.R.Effects of exercise training combined with insulin treatment on cardiac NOS1 signaling pathways in type 1 diabetic rats. Mol Cell Biochem, v. 347, n.1-2, Jan, p. 53-62.2011.
84. Lahaye D, Delamarche A G, Malardé L, Zguira S, Vincent S, Lemoine M S, Carré F, Rannou Bekono F. Combined insulin treatment and intense exercise training improved basal cardiac function and Ca(2+)-cycling proteins expression in type 1 diabetic rats. Appl Physiol Nutr Metab, v. 37, n.1, Feb, p. 53-62. 2012.
85. Lanlua, P. Chotimol, S. Sricharoenvej, S. Baimai, S. Piyawinijwong, Cardiac Ultrastructure in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Siriraj Med J, v. 64 , n.1, Jan, p. 49-53.2012.
86. Lehninger, A. L. Princípios de bioquímica. São Paulo: Savier, 2002.

87. 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.665-672. 2007.
88. Loganathan R, Novikova L, Boulatnikov IG, Smirnova IV, Exercise-induced cardiac performance in autoimmune (Type 1) diabetes is associated with a decrease in myocardial diacylglycerol. J Appl Physiol, v.113, n.1, Jul, p 817–826. 2012.
89. Lucchesi, B.R, Medina M, Kniffen FJ. The positive inotropic action of insulin in the canine heart, Eur J Pharmacol, v. 18, n. 4, Apr, p. 107-115.1972.
90. Lumini-Oliveira J, Magalhaes J, Pereira C.V, Moreira A.C, Oliveira P.J, A. Ascensao, Endurance training reverts heart mitochondrial dysfunction, permeability transition and apoptotic signaling in long-term severe hyperglycemia. Mitochondrion, v.11, n.1 Jan, p. 54-63.2011.
91. Luo M, Anderson ME. Mechanisms of altered Ca^{2+} handling in heart failure. Circ Res, v. 113, n. 1, Out, p. 690-708. 2013.
92. Maack C, O'Rourke B. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. Basic Res Cardiol, v. 102, n.5, Sep, p. 369-92. 2007.
93. Maalouf, R. M, Eid A.A, Gorin, Y.C, Block K, Escobar GP, Bailey S, Abboud HE. Nox4-derived reactive oxygen species mediate cardiomyocyte injury in early type 1 diabetes. Am J Physiol Cell Physiol, v. 302, n.3, Feb, p. 597-604. 2012.
94. MacDonald, J.R, Oellermann M, Rynbeck S, Chang G, Ruggiero K, Cooper G.J, Hickey A.J. Transmural differences in respiratory capacity across the rat left ventricle in health, aging, and streptozotocin-induced diabetes mellitus: evidence that mitochondrial dysfunction begins in the subepicardium. J Physiol Cell Physiol, v. 300, n.2, Feb, p. 246-55. 2011.

95. Maiorana A, O'Driscoll G, Goodman C, Taylor R, Green D. Combined aerobic and resistance exercise improves glycemic control and fitness in type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract, v.56, n.2, May, p.115-123. 2002.
96. Maritim, A.C, Sanders, R.A, Watkins, J.B. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. J Nutr Biochem,v.14,n.5,p.288-294, May.2003.
97. Matsuda N, Hattori Y, Gando S, Akaishi Y, Kemmotsu O, Kanno M. Diabetes-induced down-regulation of beta1-adrenoceptor mRNA expression in rat heart. Biochem Pharmacol, v.58, n.5, Sep, p. 881-885.1999.
98. Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, Boudina S, Abel ED. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. Diabetes, v. 53, n.9, Sep, p. 2366–2374.2004.
99. 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.
100. Mohamed, G.F. Role of exercise in treatment of diabetic cardiomyopathy in rats with type ii induced diabetes light and electron microscopic study, The Egypt J of Histol, v.29,n.2, Nov-Dec, p.213- 224. 2006.
101. Mohazzab, K.M. H, Kaminski, P.M, Wolin, M.S. Lactate and PO₂ modulate superoxide anion production in bovine cardiac myocytes: potential role of NADH oxidase. Circulation. v.96, n.2, Jul, p.614-220. 1997.
102. Mokhtar, N., Lavoie, J. P., Rousseau-Mignerou, 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.

103. 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.1004-1008.1992.
104. Mootha, V.K, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski, J.R, Stahl E, Bolouri, M.S., Ray, H.N, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander, E.S., Mann M, Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. Cell, v.115, n.5, Nov, p. 115, 629-640. 2003.
105. Moreira, P.I, Rolo, A.P, Sena C, Seica R, Oliveira, C.R, Santos MS. Insulin attenuates diabetes-related mitochondrial alterations: a comparative study. Med Chem, v.2,n.3,May, p.299-308. 2006.
106. Murray, A.J., Panagia M. Hauton, D, Gibbons, G.F, Clarke K. Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor in the control of myocardial uncoupling protein levels. Diabetes v.54, n.12, Dec, p. 3496-3502. 2005.
107. Myers, M.G, White, M.F. Insulin signal transduction and the IRS proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.36, n. 1, Apr, p.615-568. 1996.
108. 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.435-446.1992.
109. Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc, L.C, Saito S, Fukui A, Kume O, Fukunaga N, Hara M, Nakagawa N, Saikawa T. Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. J Mol Cell Cardiol, v. 52, n.5, May, p. 1103-1111.2012.
110. O Casis., Echevarria. Diabetic cardiomyopathy: electromechanical cellular alterations. Curr Vasc Pharmacol ,v. 2, n. Jul , p. 237-248, 2004.
111. Oikarinen, L., Nieminen, M.S, Viitasalo M, Toivonen L, Wachtell K, Papademetriou V, Jern S, Dahlof B, Devereux, R.B, Okin, P. M. Relation of QT interval and QT dispersion

to echocardiographic left ventricular hypertrophy and geometric pattern in hypertensive patients. The Life study. The Losartan Intervention For Endpoint Reduction. J Hypertens, v.19, n.10 ,Oct,p. 1883-1991.2001.

112. Oliveira, P.J, Seiya R, Coxito, P.M, Rolo, A.P, Palmeira, C.M, Santos, M.S, Moreno A.J, Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats. FEBS Lett, v. 554, n.5, Nov, p.511-514. 2003.

113. Parra, V., Verdejo, H.E, Iglewski M, Campo A, Troncoso R, Jones D, Zhu Y,Kuzmicic J, Pennanen C, Lopez, C.C, Jaña F, Ferreira J, Noguera E, Chiong M, Bernlohr DA, Klip A,. Hill, J.A, Rothermel, B.A, Abel, E.D, Zorzano A, Lavandero S. Insulin Stimulates Mitochondrial Fusion and Function in Cardiomyocytes via the Akt- mTOR- NFkB-Opa-1 Signaling Pathway. Diabetes, v.63, n.1, Jan, p. 75-88. 2014.

114. 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.265-271.1992.

115. Pedersen, P.L, Greenawalt, J.W, Reynafarje B. Hullihen J, Decker, G.L, Soper, J.W, Bustamante E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver derived tissues. Methods Cell. Biol.v.20, n.1, p. 411–481. 1978.

116. 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.

117. Prímola-Gomes, T.N, Campos, L.A, Lauton-Santos S, Balthazar, C.H, Guatimosim S, Capettini, L.S, Lemos, V.S, Coimbra, C.C, Soares, D.D, Carneiro-Junior, M.A, Quintao-Junior, J.F, Souza, M.O, Cruz, J.S, Natali, A.J, Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes, J Appl Physiol , v. 107, n.2 , Aug, p. 593-598. 2009.

118. Privratsky, J.R, Wold, L.E, Sowers, J.R, Quinn, M.T, Ren J. AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. Hypertension, v. 42, n.2, Aug, p.206-212. 2003.
119. 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.91-98.1963.
120. Ramanadham, S., Decker P, Tenner, T.E. Effect of insulin replacement on streptozotocin-induced effects in the rat heart. Life Sci, v.33,n.3, Jul,p. 289-296. 1983.
121. Rana, B.S, Lim, P .O, Naas, A. A O, Ogston, S.A, Newton, R.W, Jung, R .T, Morris, A. D, Struthers, A.D. QT interval abnormalities are often present at diagnosis in diabetes and are better predictors of cardiac death than ankle brachial pressure index and autonomic function tests. Heart v. 91, n.1, Feb, p. 44–50. 2005.
122. Remor, A.P, Matos, F.J, Ghisoni K, Silva, T.L, Eidt G, Burigo M, Bem, A.F, Silveira PC, Leon A, Sanchez MC, Hohl A, Glaser V, Goncalves CA, Quincozes-Santos A, Rosa BR, Latini A. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products, Biochim Biophys Acta, v. 1812, n.11, Nov, p. 1460-1471. 2011.
123. 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. 238-244. 2000.
124. Ren, J. and Davidoff, A. J. Diabetes rapidly induces contractile dysfunctions in isolated ventricular myocytes. Am J Physiol, v.272, n.1, Jan, p.48-58. 1997.
125. Sack, M.N. Type 2 Diabetes, Mitochondrial Biology and the Heart. J Mol Cell Cardiol, v. 46, n.6, Jun, p.842–849. 2009.
126. 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.

127. 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.
128. 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.1863-1870. 2004.
129. 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.
130. 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.234-246. 2007.
131. 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.1280-1292. 2009.
132. Sharp, P; La Regina, C.M. The laboratory rat. III serie. St Louis, Missouri. CRC Press, 1998.
133. Shen, X., Zheng, S., Thongboonkerd, V., Xu, M., Pierce, W. M., Jr., Klein, J. B. and Epstein, P. N. Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.287, n.5, Nov, p.E896-905. 2004.
134. Silva, M.F, Peluzio, M.C.G, Amorim, P.R, Lavorato, V.N, Santos, N.P, Bozi, L.H, Penitente, A.R, Falkoski, D.L, Berfort, F.G., Natali A.J. Swimming training attenuates contractile dysfunction in diabetic rat cardiomyocytes. Arq Bras Cardiol, v. 97, n.1 , Dec, p. 33-39.2010.

135. 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.
136. Skulachev, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics, Biochim Biophys Acta , v. 1363,n.2, Feb,p.100-124. 1998.
137. 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.1093-1129. 2005.
138. 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.527-536. 2009.
139. Sun F, IwaguchiK, Shudo R, Nagaki Y, Tanaka K, Ikeda K, Tokumaru S, Kojo S. Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. Clin Sci, v. 96, n.2, Feb,p. 185-190.1999.
140. Szabadkai G, Duchen, M.R, Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling, Physiology, v. 23, n.1, Apr, p. 84-94. 2008.
141. Taegtmeyer H, Phil D; McNulty P, Young, M.E, Phil D. Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part I: General Concepts. Circulation. v.105, n.1, Apr, p.1727-1733. 2002.
142. Takeda N, Dixon, I.M, Hata T, Elimban V, Shah, K.R, Dhalla, N.S, Sequence of alterations in subcellular organelles during the development of heart dysfunction in diabetes. Diabetes Res Clin Pract , v. 30, n.1, Feb,p.113-122.1996.
143. Laughlin MR, Taylor JF, Chesnick AS, Balaban RS. Non-glucose substrates increase glycogen synthesis in vivo in dog heart. Am J Physiol, v. 267, n.1, Jul, p. 217-223.1994.

144. Teshima Y, Takahashi N, Saikawa S, Hara M, Yasunaga S, Hidaka S, Sakata T. Diminished Expression of Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase and Ryanodine Sensitive Ca^{2+} Channel mRNA in Streptozotocin-induced Diabetic Rat Heart. J Mol Cell Cardiol, v. 32, n.4, Jan, p. 655-664. 2000.
145. Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, Aoki K, Yufu K, Nakagawa M, Saikawa T. Production of Reactive Oxygen Species in the Diabetic Heart: Roles of Mitochondria and NADPH Oxidase. Circ J, v. 78, n.2, Feb,p. 300–306. 2014.
146. Trenker M, R. Malli, I. Fertschai, S. Levak-Frank, W.F. Graier, Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca^{2+} uniport. Nat Cell Biol, v. 9, n.4, Apr, p. 445-452. 2007.
147. Tsujino T, Kawasaki D, Masuyama T. Left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: pathophysiology and therapeutic implications, Am J Cardiovasc Drugs, v.6 n.4, Jul, p. 219-230. 2006.
148. 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.772-780. 2006.
149. Wang G, Li W, Lu X, Bao P, Zhao, X. J Luteolin ameliorates cardiac failure in type I diabetic cardiomyopathy. Diabetes Complications,v. 26, n.4, Jul , p. 259-265. 2012.
150. 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.549-555. 2008.
151. Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R. and Marks, A. R. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. Circ Res, v.94, n.6, Apr 2, p.61-70. 2004.

152. 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, and p.2126-33.1996.
153. 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.2082-2089.1994.
154. 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.2158-2166. 2008.
155. Zhou, M., Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. Anal. Biochem, v. 253, n. 2, Nov, p.162–168.1997.
156. 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.113-120.1994.

13. ANEXOS

Attenuation of Ca²⁺ homeostasis, oxidative stress, and mitochondrial dysfunctions in diabetic rats heart: insulin therapy or aerobic exercise?

Márcia F. da Silva^a, Antônio J. Natali^{b*}; Edson da Silva^{ac}, Gilton J. Gomes^b, Bruno G. Teodoro^d, Daise N.Q. Cunha^b, Lucas R. Drummond^b, Anselmo G. Moura^b, Felipe G. Belfort^b, Alessandro de Oliveira^b, Izabel R. S. C. Maldonado^{a*}, Luciane C. Alberici^{d*#}

*The authors share senior authorship.

^aDepartamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^bDepartamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^cDepartamento de Ciências Básicas, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brasil.

^dDepartamento de Física e Química, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

#Corresponding author: Luciane Carla Alberici

Address: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Av. Do Café s/n, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Post code: 14040-903

Phone: +55 (16) 36024435 Fax: +55 (16) 36024880

e-mail: alberici@fcfrp.usp.br

Abbreviations:

CaMKII Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase

CE Control exercised

CS Control sedentary

DE Diabetic exercised

DEI Diabetic trained treated plus insulin

DM Diabetes mellitus

DS Diabetic sedentary

DSI Diabetic sedentary

GSH Reduced glutathione

GSSH Oxidized glutathione

LV- Left ventricle

LVM- Left ventricular myocytes

MPTP Mitochondrial permeability transition pore

Nox-4) NADPH oxidase 4

RHR Resting heart rate

ROS Reactive oxygen species

SOD Superoxide dismutase

STZ Streptozotocin

UCP-2 Uncoupling protein-2

Abstract

Diabetic cardiomyopathy is associated with impaired intracellular Ca^{2+} homeostasis, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions. Here, we addressed the effects of swimming training and insulin therapy, separately or in combination, on the cardiac dysfunctions in diabetic rats.

Methods

Male Wistar rats were separated into control, diabetic or diabetic plus insulin groups. Type 1 diabetes mellitus was induced by streptozotocin. Insulin treated groups received 4 UI of insulin. Each group was divided into sedentary or exercised rats. Trained groups were submitted to swimming training 90 min/day, 5 days/week/8weeks. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in left ventricular myocytes (LVM), oxidative stress in left ventricular (LV) tissue and mitochondrial functions in heart were assessed.

Results

Diabetes reduced the amplitude, prolonged the times to peak and to half decay of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in LVM, increased Nox-4 expression, decreased superoxide dismutase and increased carbonyl protein contents in LV tissue. In isolated mitochondria, diabetes increased Ca^{2+} uptake, susceptibility to permeability transition pore opening, UCP-2 expression and oxygen consumption, but reduced H_2O_2 release. Swimming training alone only corrected the times to peak and to half decay of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient, and the mitochondrial Ca^{2+} uptake; Insulin replacement also corrected these parameters and further normalized Nox-4 expression and carbonyl protein content. However, LV and mitochondrial functions in diabetic heart were only restored in conjunction by swimming training combined with insulin replacement.

Conclusion/interpretation

Only the combination of swimming training with insulin replacement attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunctions, as well as Ca^{2+} homeostasis in the diabetic heart.

Keywords: Physical activity; Diabetes mellitus; Mitochondria; calcium, Oxidative stress; Nox-4

1. Introduction

Diabetic cardiomyopathy leads initially to diastolic dysfunction which frequently progress to heart failure and sudden death (11). Cardiac systolic and diastolic dysfunctions

are associated with impaired intracellular Ca^{2+} homeostasis (15, 21, 40, 45) due to decreased expression and/or activity of Ca^{2+} regulatory proteins (45, 21, 40, 15, 9, 44).

Heart failure induced by diabetes is also associated with increased ROS (17) associated to NADH oxidase activation by glycated proteins and mitochondrial dysfunction (44). Mitochondrial dysfunctions in diabetic hearts are related with increased expression of mitochondrial uncoupling protein-3 (UCP-3) (7, 24, 41) impaired respiratory capacity, altered expression of respiratory chain complexes (7) and Ca^{2+} uptake, higher susceptibility to mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening and elevated apoptotic signaling molecules (7). Recently, (30) it has been demonstrated that in diabetic hearts the expression of phosphorylated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and NADPH oxidase were augmented and its activation by impaired Ca^{2+} metabolism would increase ROS production.

Aerobic exercise and insulin replacement are strategies to management of diabetes (39, 43). Endurance exercise training was shown to improve cardiomyocyte Ca^{2+} cycling and restore its $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and hence contractile function in diabetic rats (39). Endurance exercise is also known to protect the rat myocardium against oxidative stress (20). The stimulation of Ca^{2+} uptake by insulin replacement is involved in the regulation of heart metabolism and transporter activities (32). However, the effects of combined endurance exercise training and insulin treatment on cardiac oxidative stress and mitochondrial function of diabetic rats are poorly understood. Then, this study sought to examine the effects of swimming training combined with insulin treatment on cardiac oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in STZ-induced diabetic rats.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Male Wistar rats (30 days; $80.2 \pm 1.8\text{g}$) had free access to chow and water and were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12h light-dark cycle, and were separated in control sedentary (CS), control exercised (CE), diabetic sedentary (DS), diabetic exercised (DE), diabetic sedentary insulin (DSI) and diabetic exercised insulin (DEI). Experiments were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (Protocol number 51/2011).

2.2. Induction of diabetes and insulin treatment

Diabetic groups received an intraperitoneal injection (60 mg/kg body weight)⁻¹ of streptozotocin (STZ, Sigma, St. Louis, USA) diluted in sodium citrate buffer (0.1M, pH 4.5), and control groups received the buffer. Seven days after, animals with fasting plasma glucose above 300 mg/dL were considered diabetic. Animals from DEI and DSI received a daily dose of human insulin (1-4 U/day).

2.3. Exercise training protocol

Animals from CE, DE and DEI groups were subjected to a swimming training program (five days/week/eight weeks) (Adapted from [18]). On the first week the animals exercised with no load for 10-50 min/day and exercise duration was increased by 10 min/day. In the second week, the animals exercised with a load corresponding to 1% of BW and the exercise duration was increased by 10 min/day up to a total of 90 min of continuous swimming in one session. From the third week on, the load was increased weekly (1% of BW/wk) up to a load of 5% of BW on the eighth week.

2.4. Resting heart rate assessment

Resting heart rate was obtained from electrocardiogram. Animals were placed inside a chamber for anesthesia (isoflurane 2% and oxygen 100%) at a constant flow of 1L/minute. The electrocardiogram (DII) was acquired using the data acquisition system PowerLab ® (AD Instr., SP, Brazil) and data analyzed using the program Lab Chart Pro ® (AD Instr. Lab Chart 7, SP, Brazil). Heart rate was obtained by average of five consecutive cardiac cycles.

2.4. Echocardiographic examinations

Animals were anesthetized with isoflurane via mask (isoflurane 3% and oxygen 100% constant flow (1 L/min). Cardiac contraction and relaxation were assessed noninvasively by transthoracic echocardiography using parasternal long- and short-axis images. Two-dimensional, M-mode echocardiographic images and color-guided pulsed-wave Doppler images were obtained by standard echocardiographic techniques (10) (MyLabTM30, Esaote, Genova, Itália).

2.5. Isolation of cardiomyocytes and mitochondria from LV

Two days after the last exercise training session the rats were euthanized by cervical dislocation and their hearts were removed. LV myocytes were enzymatically isolated (Adapted from (8), using 1 mg/mL of collagenase type II (Worthington, USA) and 0.1

mg/mL of protease (Sigma). LV mitochondria were isolated by standard differential centrifugation (38).

2.6. Intracellular Ca^{2+} measurements

Intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) transients in cardiomyocytes were evaluated as described (33) using 5 μM fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). A Meta LSM 510 scanning system (Carl Zeiss GmbH, Germany) with an x63 oil immersion objective was used for confocal fluorescence imaging (488/510 nm ex/em). Digital image processing was performed using routines custom-written in the Matlab® platform. The time of the peak of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient and time from peak transient to half resting level of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were determined.

2.7. Heart Redox State

Reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione and protein carbonyl levels were assessed in LV tissue (50 mg/mL in cold 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4) by the fluorimetric ortho-phthalaldehyde method (18). Protein carbonyl were detected spectrophotometrically by derivatisation of the carbonyl group with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (37, 38). Superoxide dismutase content in LV tissue was determined spectrophotometrically by the tetrazolium salt formation using a Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman®).

2.8. Mitochondrial standard incubation procedure and assays

Mitochondria were energized with 5 mM glutamate and malate in an incubation medium containing of 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 2 mM K_2HPO_4 , 10 mM HEPES-KOH pH 7.4, at 30 °C. Mitochondrial respiration was monitored using a temperature-controlled computer-interfaced Clark-type oxygen electrode (Oxytherm, Hansatech Inst, UK). Hydrogen peroxide production was monitored spectrofluorimetrically using 1 μM Amplex red (Molecular Probes, OR, USA) and 1 UI/mL horseradish peroxidase (46); these assays were performed in the presence of 0.1 mM EGTA. Ca^{2+} influx and efflux were monitored spectrofluorimetrically using 150 nM Calcium Green 5N (Molecular Probes, OR, USA) (34). Ca^{2+} flux and H_2O_2 production were monitored in a Model F-4500 Hitachi fluorescence spectrophotometer at the 506/531 and 563/587 (ex/em) wavelength pair, respectively.

2.9. Analysis of mRNA expression

RNA was isolated using the TRIzol reagent (Invitrogen®). For real-time PCR analysis, RNA was reverse transcribed using the Reverse Transcriptase IMPROM II (PROMEGA®) and used in quantitative PCR reactions containing EVA-green fluorescent dye (BioRad®). Relative expression of mRNAs was determined after normalization by β -actin using the $\Delta\Delta C_t$ method (4). Quantitative PCR was performed using Eppendorf Realplex4 Mastercycler Instrument (Eppendorf®). Primers for NOX4, β -actin and UCP-2 were designed as described in Table 1.

2.10. Statistical analysis

Comparisons were performed by using Student's t-test, or ANOVA, as appropriate (Statistical Analysis System software - SAS version 9.3) and post hoc Student-Newman-Keuls test. Statistical significance was defined at $P \leq 0.05$. Results are presented as means $\pm$ SEM.

3. Results

3.1. General characteristics of rats

The initial FPG levels were no different among the groups (Table 2). Diabetic rats displayed a severe hyperglycemia (~500 mg/dL) during the experimental period. However, insulin treatment alone or combined with exercise training reduced FPG in diabetic rats (~300 mg/dL). Exercise training alone did not affect PG either in diabetic or control.

The initial body weight was not different among groups, but STZ-treated animals gained less body weight than controls during the experimental period. Neither insulin treatment nor exercise training alone or its combination altered the body weight gain in diabetic rats.

Diabetes reduced the heart weight (HW) gain, but insulin treatment attenuated such reduction. Exercise training alone did not alter the HW, but exercise training combined with insulin treatment increased the HW in diabetic rats. The HW/BW was not affected in diabetic rats when compared to controls. However, diabetic rats treated with insulin showed higher HW/BW than untreated diabetic rats. Exercise training did not affect the HW/BW either in diabetic or in controls.

Resting heart rate was lower in diabetic sedentary and exercised animals as compared to their respective controls. Insulin treatment corrected these reductions in diabetic sedentary and exercised animals. Exercise training itself did not change RHR either in diabetic or in controls.

Diabetic animals exhibited reduced ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) as compared to controls which indicates systolic dysfunction (Table 3). Although exercise training increased the FS in controls, neither exercise training nor insulin treatment reversed the left ventricular systolic dysfunction induced by diabetes. However, the combination of treatments partially restored left ventricular systolic function in diabetic rats. Here, diabetic rats showed higher E/A ratio than controls which characterizes diastolic dysfunction. Nevertheless, exercise training and insulin treatment, either isolated or in combination, did not reverse the diastolic dysfunction induced by diabetes.

3.2. Intracellular global calcium transients

Figure 1 shows that the $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude in diabetic myocytes was significantly smaller than in controls (Fig. 1A). Exercise training and insulin treatment themselves did not affect the $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude in diabetic rats. However, exercise training combined with insulin treatment increased significantly the $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude.

Diabetes did not modify the time to peak of $[Ca^{2+}]_i$ transient (Fig. 1B). Nevertheless, exercise training reduced the time to peak of $[Ca^{2+}]_i$ transient both in insulin treated and untreated animals by 8.67% and 6.49%, respectively. In controls, similar effect of exercise training was found.

STZ-induced diabetes prolonged the time to half decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient by 17.10% (Fig. 1C). In contrast, insulin treatment itself as well as exercise training reduced the time to half decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient in diabetic animals by 10.12% and 5.73%, respectively. In addition, exercise training combined with insulin reduced the time to half decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient by 5.17%.

3.3. Heart Redox State

We observed that hearts of diabetic sedentary rats exhibited an increased expression of Nox-4, as compared to control sedentary rats (Fig. 2A), which was reduced by insulin

treatment. However, exercise training itself had no effect. Control levels of Nox-4 expression in hearts of diabetic rats were reached only by exercise training combined with insulin.

In normal conditions, the excess of $O_2^{\bullet-}$ is inactivated and converted to H_2O_2 by superoxide dismutase (SOD). However, along with the increased Nox-4 expression hearts of our diabetic sedentary displayed a diminished SOD content, which was not reversed by insulin treatment and exercise training, either alone or in combination (Fig. 2B). An additional indicative of low SOD content in hearts of our diabetic sedentary rats was verified by the reduced oxidized glutathione (GSH/GSSG), since GSH is consumed by glutathione peroxidase to degrade H_2O_2 generating GSSG and H_2O . We found a slight increase (not statistically significant) in GSH/GSSG in diabetic hearts (Fig. 2C), indicating low productions of H_2O_2 , despite the apparent increase of $O_2^{\bullet-}$ production by elevated Nox-4 expression.

The oxidative damage, as a consequence of an unbalanced production/inactivation of $O_2^{\bullet-}$, was verified by the content of carbonyl proteins (Fig. 2D). Heart proteins of diabetic sedentary rats were more oxidized, an effect that was reversed by insulin treatment itself as well as by insulin combined with exercise training. Furthermore, the modulation of carbonyl contents promoted by diabetes and treatments (insulin or exercise) follow the profile found for Nox-4 expression, suggesting linked effects.

3.4. Mitochondrial function

Diabetes reduced (not statistically significant) the respiration rates in the phosphorylating state (State III), augmented respiration rates in the resting state (State IV), and thereby decreased the respiratory control ratios (Table 4). Neither swimming training nor insulin treatment of diabetic rats restored any of the respiratory parameters. Only the combination of swimming training with insulin reversed at least the high State IV respiration of diabetic rats. Exercise training itself elevated the oxygen consumption of isolated heart mitochondria in controls. In addition, LV of diabetic rats also presented an augment of 75% in the expression of mitochondrial UCP-2 (Fig. 3), which was only totally reversed by combined swimming training and insulin.

The release of H_2O_2 in isolated heart mitochondria was monitored (Fig. 4). The representative experiment (Fig. 4A) and averages (Fig. 4B) show that isolated heart mitochondria from sedentary diabetic rats release lower amounts of H_2O_2 as compared to those from controls. Neither exercise training nor insulin treatment of diabetic rats reversed

the reduced mitochondrial H₂O₂ release. However, swimming training and insulin associated reversed the lower H₂O₂ release in heart mitochondria from diabetic rats.

The heart mitochondria isolated from sedentary diabetic rats presented higher capacity of Ca²⁺ uptake (~ 32%) when compared to those from controls (Fig. 5A). Exercise training and insulin either alone or in combination normalized the ability of Ca²⁺ uptake in heart mitochondria of diabetic rats.

The Ca²⁺ retention capacity was monitored to check the susceptibility to MPTP opening in isolated heart mitochondria (Fig. 5B). Traces of the external Ca²⁺ concentration dynamics in response to sequential additions of Ca²⁺ show that heart mitochondria isolated from diabetic sedentary rats did not sustain the preloaded Ca²⁺ (after 6 additions of 20 nmol Ca²⁺), in contrast to heart mitochondria isolated from control sedentary rats, indicating an increased susceptibility to Ca²⁺-induced inner membrane permeabilization (Fig. 5B). This condition was only reversed by exercise training combined with insulin treatment. Surprisingly, both swimming training and insulin treatment separately further reduced the capacity of Ca²⁺ retention in heart mitochondria of diabetic rats. CSA, a classical inhibitor of MPTP opening, totally prevented the release of accumulated Ca²⁺ in heart mitochondria of diabetic sedentary, diabetic exercised or diabetic exercised rats treated with insulin, and partially prevented it in heart mitochondria of diabetic rats treated with insulin (Fig. 5C). Together, these results indicate that diabetes induces high Ca²⁺ uptake and thus increases the susceptibility to MPTP opening in heart mitochondria. Higher Ca²⁺ uptake and the susceptibility to MPTP opening, as well as the respiratory, UCP-2 expression and H₂O₂ release patterns were only reversed by insulin treatment combined with exercise training.

4. Discussion

We examined the effects of endurance exercise training combined with insulin therapy on cardiac oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in diabetic rats. Our data showed that endurance training associated with insulin treatment attenuated the cardiac oxidative stress (i.e. reduced Nox-4 expression and the content of carbonyl proteins) and mitochondrial dysfunctions (i.e. reduced UCP-2 expression, Ca²⁺ uptake and MPTP opening susceptibility, and increased H₂O₂ release) caused by STZ-induced severe type 1 DM in rats.

Here, diabetes impaired the *in vivo* cardiac systolic and diastolic functions as it reduced the ejection fraction and fractional shortening as well as it increased peak E/peak A ratio in rats. These dysfunctions were also evident at the cellular level inasmuch as diabetes

reduced the amplitude and prolonged the time to half decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient in left ventricular myocytes. These disruptions in experimental diabetes have been shown previously and are related to dysfunctions in the cellular Ca^{2+} regulatory proteins (21). Regarding the systolic dysfunction, the Ca^{2+} release from the SR is not uniform in cardiomyocytes of diabetic rodents which is due to reductions in the number of functional RyR2 (6), reduced Ca^{2+} channel activities (21) and depressed SERCA2 expression or activity and hence intra-SR Ca^{2+} stores (21). This would help to explain the observed reduced $[Ca^{2+}]_i$ transient amplitude. As for the diastolic dysfunction, the prolonged Ca^{2+} transient decay observed here is consistent with a prolonged cytosolic Ca^{2+} removal via decreased SERCA2 expression or activity in diabetic hearts (21). It is noteworthy that an increased activity of NCX activity may contribute to reduced SR Ca^{2+} load in diabetic myocytes, although the relative contribution of NCX to cytosolic Ca^{2+} removal in rats is small ($\sim 7\%$) and in diabetic hearts increased or unchanged NCX activity or decreased NCX expression were reported (9).

Despite the fact that cytosolic removal of Ca^{2+} into mitochondria in rats is small ($\sim 1\%$) and seems not to impact on the $[Ca^{2+}]_i$ transient (5), we observed an increased capacity of mitochondrial Ca^{2+} uptake in mitochondria isolated from diabetic hearts. Mitochondria are sensitive to Ca^{2+} concentration, which is important for the modulation of mitochondrial metabolism. These organelles may act as a Ca^{2+} buffering system removing and modulating the local Ca^{2+} concentration. Calcium is transported through the inner membrane matrix by two mechanisms: a uniporter (MCU) and a rapid uptake mode (RaM) that are dependent of the electrochemical gradient for Ca^{2+} . Calcium flux rates through the MCU are fast, equivalent to fast gated pores but slower than the most channels. Calcium uptake through the RaM occurs very rapidly, faster than MCU and at the beginning of Ca^{2+} pulse. The localization of mitochondria close to Ca^{2+} release sites of the endoplasmic or sarcoplasmic reticulum or even near plasma membrane Ca^{2+} channels also facilitates mitochondrial Ca^{2+} handling (see (14) for review). Furthermore, in different cell types an increased peak of mitochondrial Ca^{2+} concentration in response to Ca^{2+} mobilizing stimuli has been described to be increased by UCP-2 and UCP-3 overexpression (42). We found indications of increased UCP activity, such as enhanced resting respiration rate, UCP-2 expression and reduced mitochondrial H_2O_2 release in diabetic hearts. Thus, our findings agree with previous works (16) showing that mitochondria per se apart from the insulin-deficient diabetic profile remain free from ROS production, despite considerable evidences suggesting that diabetes is associated with oxidative tissue damage in the heart of diabetic rodents (2).

Our results showed that cardiac oxidative damage was related to upregulation of Nox-4 expression, as showed previously by Maalouf and coworkers (25) and also found in LV dysfunctions such as heart failure progression and aging (1). Nox-4 is localized in perinuclear organelles, including mitochondria (1), and is supposed to be constitutively active, not requiring cytosolic factors for its activation. Therefore, its expression levels determine the amount of $O_2^{\bullet -}$ production in the cells. Oxidative damage is also favored when $O_2^{\bullet -}$ production is associated to an impaired antioxidant system, as demonstrated here by diminished SOD in hearts of diabetic rats. Reductions in SOD content and/or activity have been shown previously in STZ-induced diabetic cardiomyopathy (26). Thus, oxidative damage in LV of diabetic rats is a consequence of high production and low inactivation of $O_2^{\bullet -}$ promoted by high Nox-4 expression and low SOD content.

It is possible that the impaired intracellular Ca^{2+} homeostasis in our diabetic rat heart have increased oxidative stress by activating CaMKII. Nishio et al. (30) demonstrated an augmented $[Ca^{2+}]_i$ in cardiomyocytes exposed to high glucose concentrations due to increased NHE expression and activity which activated NCX in reverse mode. High glucose also up-regulated the phosphorylated CaMKII expression that was suppressed by inhibiting NCX in reverse mode. In addition, a CaMKII inhibitor attenuated the ROS level in these myocytes. In STZ-induced diabetic rat hearts they observed up-regulation of ROS level and components of NADPH oxidase, p47phox and p67phox, which were attenuated by a CaMKII inhibitor. In fact, our diabetic rat hearts exhibited augmented expression Nox-4, the major catalytic component of NADPH oxidase.

We suggest that increased Nox-4 activity could also sensitize MPTP opening in the heart mitochondria of STZ-diabetic rats, inasmuch as Nox-4 activity leads to cysteine oxidation of mitochondrial proteins including components of the MPTP complex and mitochondrial damage as reported previously (1). This sensibility associated to an excessive mitochondrial Ca^{2+} load could trigger MPTP opening, following dissipation of the inner mitochondrial membrane potential and swelling.

More important, our results showed that eight weeks of combined swimming training and insulin is able to restore intracellular Ca^{2+} homeostasis as well as cardiac oxidative stress and mitochondrial dysfunctions. Regarding the Ca^{2+} homeostasis, both exercise training and insulin treatment either alone or in combination restored the time to half decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient in left ventricular myocytes of diabetic rats, being the amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ transient restored in exercised animals treated with insulin. Although we did not measure Ca^{2+} handling proteins, exercise training has been shown to improve SR Ca^{2+} resequestration via

increases in SERCA2a and PLB expression and/or activity along with augments of Ca^{2+} efflux via NCX in diabetic rat hearts (22, 39). It is noteworthy that SR Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release is insulin-dependent as insulin regulates the cardiac function by stimulating I_{CaL} . Insulin also interacts with SERCA2 via insulin receptor substrate (IRS) indicating that IRS proteins bind to the SERCA2 in an insulin-regulated fashion (3). Our echocardiographic data show that diabetic rats exercised and treated with insulin had their systolic function partially restored, despite no recovery of diastolic function.

On the subject of cardiac oxidative stress, the combined treatments reduced Nox-4 expression and the content of carbonyl proteins. Insulin therapy is known to restore Nox-4 expression by controlling blood glucose levels (25) which leads to attenuated oxidative stress. It is also possible that the restored intracellular Ca^{2+} homeostasis in the heart of insulin-treated and exercised diabetic animals have helped reducing ROS production via down-regulation of the phosphorylated CaMKII expression.

As for the mitochondrial STZ-induced dysfunctions, the combination of insulin with exercise training was able to reduce UCP-2 expression, Ca^{2+} uptake and MPTP opening susceptibility and increased H_2O_2 release. Insulin itself is known to improve the activities of complexes I, II and/or IV after four weeks, as shown by (36). It is probably related to the levels of mRNA for the peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α (PGC-1 α) that up-regulate nuclear genes required for mitochondrial biogenesis (29). Long-term treadmill running (14 weeks) prevented the elevation of proteins involved in MPTP pore formation and apoptotic signaling in hearts of diabetic rats (24). Nevertheless, in our eight-week treatment, endurance exercise training or insulin alone restored the mitochondrial Ca^{2+} uptake only.

Finally, we observed that diabetes reduced the RHR in rats, as shown elsewhere (19). This can be explained in part by the reduction in the expression of beta adrenergic receptors (β_1 e β_2) in diabetic rats (27). As expected, bradycardia was normalized in sedentary and exercised animals by insulin, as demonstrated previously (35). Insulin exerts positive inotropic and chronotropic effects on the myocardium (23). Along with the impaired growth of the animals induced by STZ, by the end of the experiment diabetic rats exhibit lower HW. In rats with diabetes, in addition to insulin, the secretion of hormones such as the growth hormone, glucagon, pancreatic polypeptide and, consequently, growth factor similar to that of insulin, are altered and affect their growth (13, 28). We observed that insulin therapy increased the HW gain and the HW to BW ratio in both sedentary and exercised diabetic animals.

4. Conclusion

Endurance training alone corrects Ca^{2+} homeostasis and the mitochondrial Ca^{2+} uptake; Insulin replacement itself also reclaims these parameters and further normalizes Nox-4 expression and carbonyl protein content. However, whole cellular and mitochondrial dysfunctions in the hearts of rats with severe type 1 DM are only attenuated when both therapies are associated.

Acknowledgments

This study was funded by the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG – CDS APQ 01171/11) and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP – 2010/17259-9). A. J. Natali is a CNPq fellow. M. F. da Silva was recipient of a doctoral scholarship from FAPEMIG. The confocal experiments were performed in the facilities of the *Núcleo de Microscopia e Microanálise* at the Federal University of Viçosa (UFV). We acknowledge Ieda M.R. Prado for the technical support.

Duality of interest

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript

References

1. **Ago T1, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J.** Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2010 Apr 16;106(7):1253-64.
2. **Aragno M, Mastrocola R, Galloatti G, Vercellinatto I, Bardini P, Geuna S, Catalano MG, Danni O, Boccuzzi G.** Oxidative stress triggers cardiac fibrosis in the heart of diabetic rats. *Endocrinology.* 2008; 149:380-388
3. **Aulbach F, Simm A, Maier S, Langenfeld H, Walter U, Kersting U, Kirstein M.** Insulin stimulates the L-type Ca^{2+} current in rat cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 1999 Apr;42(1):113-20.
4. **Barbosa MR, Sampaio IH, Teodoro BG, Sousa TA, Zoppi CC, Queiroz AL, Passos MA, Alberici LC, Teixeira FR, Manfiolli AO, Batista TM, Cappelli AP, Reis RI, Frasson D, Kettelhut IC, Parreiras-e-Silva LT, Costa-Neto CM,**

- Carneiro EM, Curi R, Silveira LR.** Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: effect of catalase overexpression. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1832(10):1591-604.
5. **Bers DM.** Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:23-49.
 6. **Bidasee KR1, Dinçer UD, Besch HR Jr.** Ryanodine receptor dysfunction in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Pharmacol*. 2001 Dec;60(6):1356-64.
 7. **Bugger H, Abel ED.** Mitochondria in the diabetic heart. *Cardiovasc Res*. 2010 Nov 1;88(2):229-40.
 8. **Carneiro-Júnior MA, Prímola-Gomes TN, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, Felix LB, Oliveira EM, Cruz JS, Natali AJ, Mill JG.** Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. *J Appl Physiol* (1985). 2013 Jul 1;115(1):107-15.
 9. **Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Lederer WJ, Matlib MA.** Defective intracellular Ca(2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Oct;283(4):H1398-408.
 10. **Dent CL, Bowman AW, Scott MJ, Allen JS, Lissauskas JB, Janif M, Wickline SA, Kovács SJ.** Echocardiographic characterization of fundamental mechanisms of abnormal diastolic filling in diabetic rats with a parameterized diastolic filling formalism. *J Am Soc Echocardiogr*. 2001 Dec;14(12):1166-72.
 11. **Fang ZY, Prins JB, Marwick TH.** Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications.. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):543-67.
 12. **Gomes RJ, de Mello MA, Caetano FH, Sibuya CY, Anaruma CA, Rogatto GP, Pauli JR, Luciano E.** Effects of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats. *Growth Horm IGF Res*. 2006 Oct-Dec;16(5-6):326-31.
 13. **Gomes RJ1, Leme JA, de Moura LP, de Araújo MB, Rogatto GP, de Moura RF, Luciano E, de Mello MA.** Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training *Cell Biochem Funct*. 2009 Jun;27(4):199-204.
 14. **Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K.** Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium*. 2000 Nov-Dec;28(5-6):285-96.
 15. **Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, Kemmotsu O,**

- Kanno M.** Diminished function and expression of the cardiac $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchanger in diabetic rats: implication in Ca^{2+} overload. *J Physiol.* 2000 Aug 15;527 Pt 1:85-94.
16. **Herlein JA, Fink BD, O'Malley Y, Sivitz WI.** Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology.* 2009 Jan;150(1):46-55.
 17. **Hidaka S, Kakuma T, Yoshimatsu H, Sakino H, Fukuchi S, Sakata T.** Streptozotocin treatment upregulates uncoupling protein 3 expression in the rat heart. *Diabetes.* 1999 Feb;48(2):430-5.
 18. **Hissin PJ, Hilf R.** A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976 Jul;74(1):214-26.
 19. **Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M, Adeghate E.** Effects of insulin treatment on heart rhythm, body temperature and physical activity in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 Apr;33(4):327-31.
 20. **Kim JD; Yu BP; MCCarter, RJM; Lee SY; Herlihy JT.** Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *F Radic Biol & Medic.* 1996; 20:283-288. [16]
 21. **Lacombe VA1, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Sridhar A, Emani S, Bonagura JD, Feldman DS, Györke S, Carnes CA.** Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Nov;293(5):R1787-97.
 22. **Le Douairon Lahaye S, Gratas-Delamarche A, Malardé L, Zguira S, Vincent S, Lemoine Morel S, Carré F, Rannou Bekono F.** Combined insulin treatment and intense exercise training improved basal cardiac function and Ca^{2+} -cycling proteins expression in type 1 diabetic rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012 Feb;37(1):53-62
 23. **Lucchesi BR, Medina M, Kniffen, FJ.** The positive inotropic action of insulin in the canine heart. *Eur J Pharmacol.* 1972 Apr;18(1):107-15.
 24. **Lumini-Oliveira J, Magalhaes J, Pereira CV, Moreira AC, Oliveira PJ, Ascensao A.** Endurance training reverts heart mitochondrial dysfunction, permeability transition and apoptotic signaling in long-term severe hyperglycemia. *Mitochondrion.* 2010; 11:54-63.
 25. **Maalouf RM1, Eid AA, Gorin YC, Block K, Escobar GP, Bailey S, Abboud HE.** Nox4-derived reactive oxygen species mediate cardiomyocyte injury in early type 1 diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 Feb 1;302(3):C597-604.

26. **Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB.** Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2003 May;14(5):288-94.
27. **Matsuda N, Hattori Y, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, Kemmotsu O, Kanno M.** Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *J Physiol.* 2000 Aug 15;527 Pt 1:85-94.
28. **Menon RK, Stephan DA, Rao RH, Shen-Orr Z, Downs LS Jr, Roberts CT Jr, LeRoith D, Sperling MA.** Tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol.* 1994 Sep;142(3):453-62.
29. **Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M.** Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell.* 2003 Nov 26;115(5):629-40.
30. **Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, Kume O, Fukunaga N, Hara M, Nakagawa M, Saikawa T.** Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 May;52(5):1103-11.
31. **Pedersen PL, Greenawalt JW, Reynafarje B, Hullihen J, Decker GL, Soper JW, Bustamante E.** Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver derived tissues. *Methods Cell Biol.* 1978;20:411-81.
32. **Pierce GN, Ganguly PK, Dzurba A, Dhalla NS.** Modification of the function of cardiac subcellular organelles by insulin. *Adv Myocardiol.* 1985; 6:113–125. [17]
33. **Prímola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, Lemos VS, Coimbra CC, Soares DD, Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Souza MO, Cruz JS, Natali AJ.** Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes, *J Appl Physiol* (1985). 2009 Aug;107(2):593-8.
34. **Rajdev S, Reynolds IJ.** Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca²⁺ concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. *Neurosci. Lett.* 1993; 162:149–152. [27]
35. **Ramanadham S, Decker P, Tenner TE.** Effect of insulin replacement on streptozotocin-induced effects in the rat heart. *Life Sci.* 1983; 33:289-6.

36. **Remor AP, de Matos FJ, Ghisoni K, da Silva TL, Eidt G, Búrigo M, de Bem AF, Silveira PC, de León A, Sanchez MC, Hohl A, Glaser V, Gonçalves CA, Quincozes-Santos A, Borba Rosa R, Latini A.** Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov;1812(11):1460-71.
37. **Reznick AZ, Packer L.** Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for the carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994; 233:357–363.
38. **Schild L, Reinheckel T, Wiswedel I, Augustin W.** Short-term impairment of energy production in isolated rat liver mitochondria by hypoxia/reoxygenation: involvement of oxidative protein modification. *Biochem J*. 1997; 15:205–210.
39. **Shao CH, Wehrens XH, Wyatt TA, Parbhu S, Rozanski GJ, Patel KP, Bidasee KR.** Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol*. 2009 Apr;106(4):1280-92.
40. **Teshima Y1, Takahashi N, Saikawa T, Hara M, Yasunaga S, Hidaka S, Sakata T.** Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine sensitive Ca^{2+} Channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Apr;32(4):655-64.
41. **Teshima Y1, Takahashi N, Nishio S, Saito S, Kondo H, Fukui A, Aoki K, Yufu K, Nakagawa M, Saikawa T.** Production of Reactive Oxygen Species in the Diabetic Heart – Roles of Mitochondria and NADPH Oxidase. *Circ J*. 2014;78(2):300-6.
42. **Trenker M, Malli R, Fertschai I, Levak-Frank S, Graier WF.** Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca^{2+} uniport. *Nat Cell Biol*. 2007; 9:445-452. [32]
43. **Winnick JJ, Sherman WM, Habash DL, Stout MB, Failla ML, Belury MA, Schuster DP.** Short-term aerobic exercise training in obese humans with type 2 diabetes mellitus improves whole-body insulin sensitivity through gains in peripheral, not hepatic insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Mar;93(3):771-8.
44. **Yu T, Sheu SS, Robotham JL, Yoon Y.** Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res*. 2008; 79:341–51.
45. **Zhao XY, Hu SJ, Li J, Mou Y, Chen BP, Xia Q.** Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem*. 2006; 62: 1–8.

46. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland R P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* 2007; 15: 162–168. [26]

Table 1. Forward and Reverse sequences of primers used in the real time RT-PCR assays.

Gene	Forward	Reverse
Nox-4	5'TTCTGGACCTTTGTGCCTATAC3'	5'CCATGACATCTGAGGGATGATT3'
UCP	5'ATGTGGTAAAGGTCCGCTTC3'	5'CATTTCGGGCAACATTGGG3'
β-actin	5'CACTTTCTACAATGAGCTGCG3'	5'CTGGATGGCTACGTACATGG3'

UCP-2, uncoupling protein-2; Nox-4, NADPH oxidase-4; β-actin.

Table 2. General characteristics of animals in the experimental groups.

	CS	DS	DSI	CE	DE	DEI
Initial PG (mg/dL)	66.61±3.81	68.61±3.01	64.21±3.21	70.20±1.60	67.21±1.71	62.60±2.61
Final PG (mg/dL)	90.21±2.81	529.21±22.70 ^{*#}	338.20±39.00 [*]	87.21±3.80	492.20±34.50 [¥]	316.81±67.01 ^{¥§}
Initial BW (g)	83.40±1.61	85.20±3.40	85.80±2.71	84.81±2.91	85.80±2.71	83.60±1.80
Final BW (g)	351.20±23.31	198.80±20.40 [*]	200.81±16.11 [*]	286.60±25.10	190.80±16.60 ^{*¥}	232.60±11.80 [*]
HW (g)	1.86±0.08	1.00±0.10 ^{*#}	1.43±0.15 [*]	1.95±0.12	1.01±0.07 [¥]	1.62±0.07 ^{*¥§}
HW/BW (mg/g)	5.43±0.47	5.07±0.20 [#]	7.46±1.28	7.07±0.83	5.48±0.68	7.02±0.39 [§]
RHR (bpm)	345.90±9.01	267.00±11.3 ^{*#}	345.3±17.8	337.30±7.61	277.20±15.81 [¥]	349.21±9.81 ^{†§}

Data expressed as mean ± SEM of 10 animals in each group. BW, body weight. PG, plasma glucose. CS, control sedentary. CE, control exercised. DS, diabetic sedentary. DE, diabetic exercised. DSI, diabetic sedentary with insulin. DEI, diabetic exercised with insulin. HW, heart weight. RHR, resting heart rate. ^{*} Different from CS; [†] Different from DS; [#] Different from DSI; [¥] Different from CE; [§] Different from DE.

Table 3. Left ventricular systolic and diastolic functions measured by resting echocardiography at the end of the experimental period.

	CS (n=7)	DS (n=7)	DSI (n=7)	CE (n=7)	DE (n=7)	DEI (n=7)
Ejection fraction (%)	77.33±2.86	64.80±3.14 [*]	63.33±2.86 [*]	83.75±2.48	58.66±2.86 [§]	71.41±2.86 [§]
Fractional shortening (%)	41.00 ± 1.54	30.80 ± 1.69 [*]	30.16 ± 1.54 [*]	47.43 ± 1.33 [*]	29.41 ± 1.54 [§]	35.91 ± 1.54 ^{§#&}
Peak E (m/s)	0.497±0.041	0.621±0.045 [*]	0.615±0.038 [*]	0.504±0.038	0.539±0.045	0.563±0.041
Peak A (m/s)	0.316±0.031	0.223±0.031	0.208±0.032 [*]	0.285±0.031	0.216±0.033 [§]	0.208±0.030 [§]
E/A ratio	1.66 ± 0.16	3.10 ± 0.18 [*]	3.02 ± 0.15 [*]	1.77 ± 0.15	2.54 ± 0.18 [§]	2.95 ± 0.16 [§]

CS-Control Sedentary. CE-control exercised. DS- Diabetic Sedentary. DSI- Diabetic Sedentary Insulin. DE-Diabetic exercised. DEI- Diabetic exercised Insulin. Data are mean±S.E.M. n, number of animals. ^{*} Diferente de CS. [†] Diferente de DS. [#] Diferente de DSI. [§] Diferente de CE. [&] Diferente de DE.

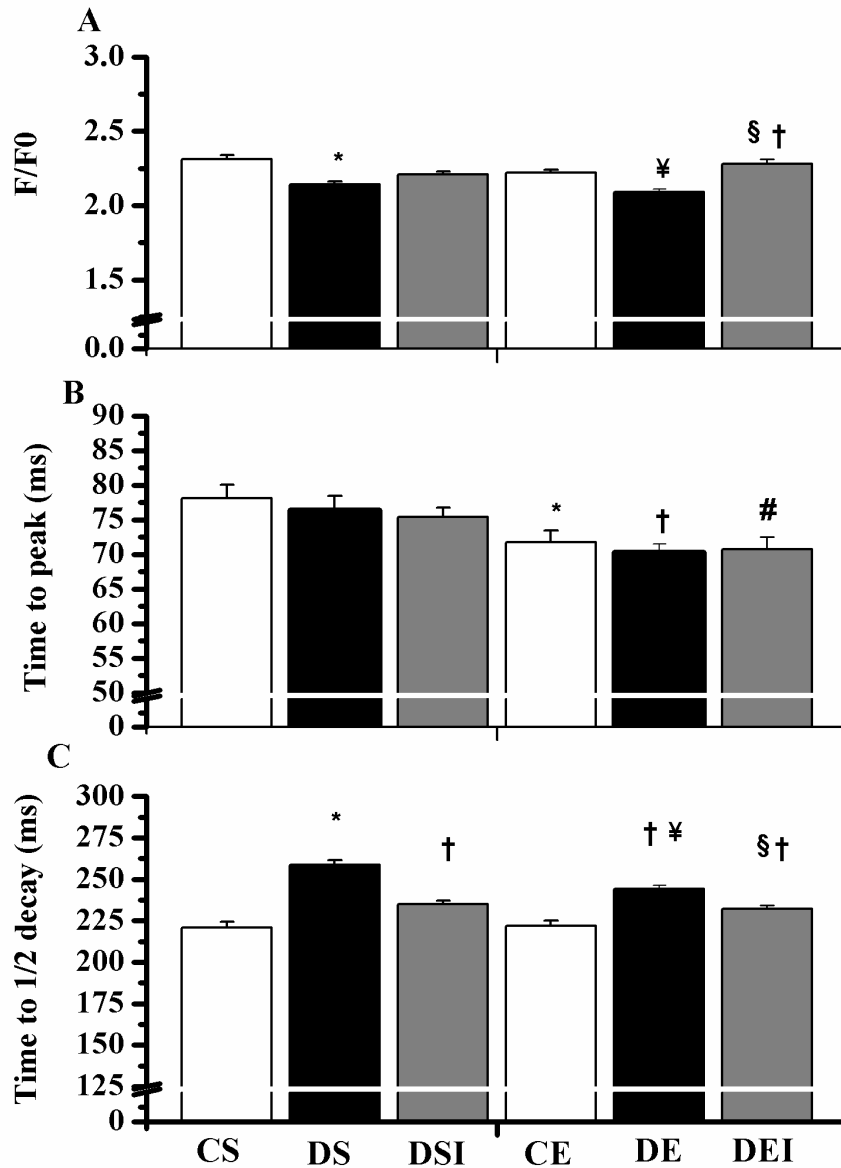


Figure 1. Intracellular global Ca^{2+} transient in isolated left ventricular myocytes. (A) Amplitude of transient. (B) Time to peak. (C) Time from peak transient to half resting value.* Different from CS; † Different from DS; # Different from DSI; ¥ Different from CE; § Different from DE. N = 87-103 cells/group.

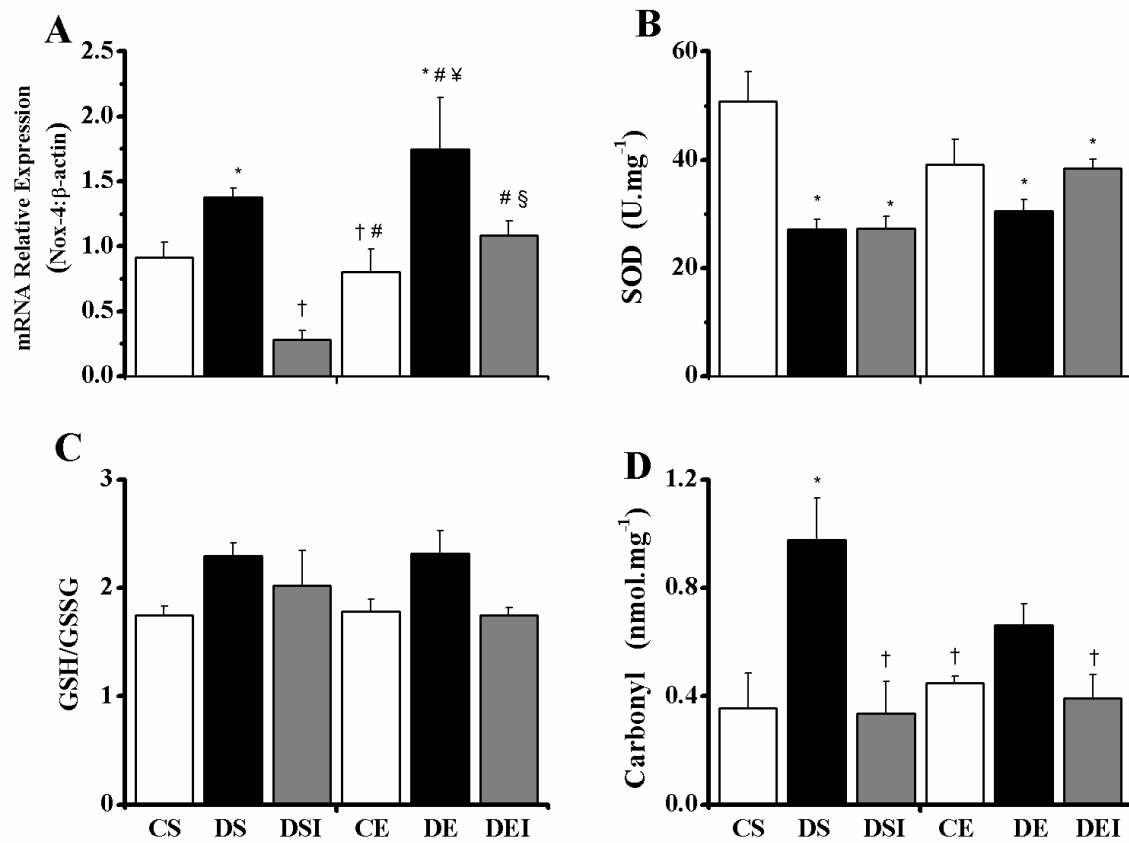


Figure 2. Redox state parameters in rat hearts. (A) mRNA relative expression of Nox-4. (B) SOD content. (C) GSH/GSSG. (D) Protein carbonyl content.. * different from CS; †different from DS; ‡different from DSI; ¶different from CE; §different from DE. N = 6.

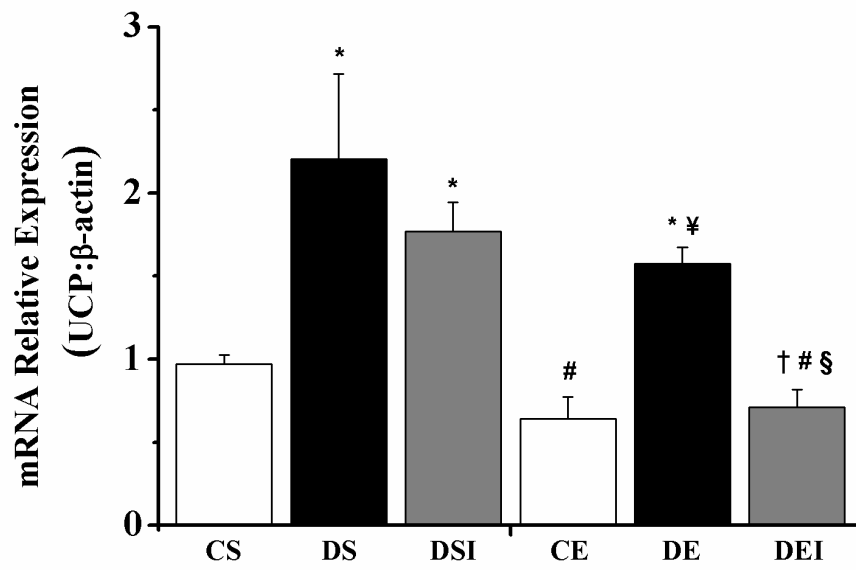


Figure 3. mRNA relative expression of UCP-2 in left ventricles. * Different from CS; † Different from DS; # Different from DSI; ¥ Different from CE; § Different from DE. N = 6

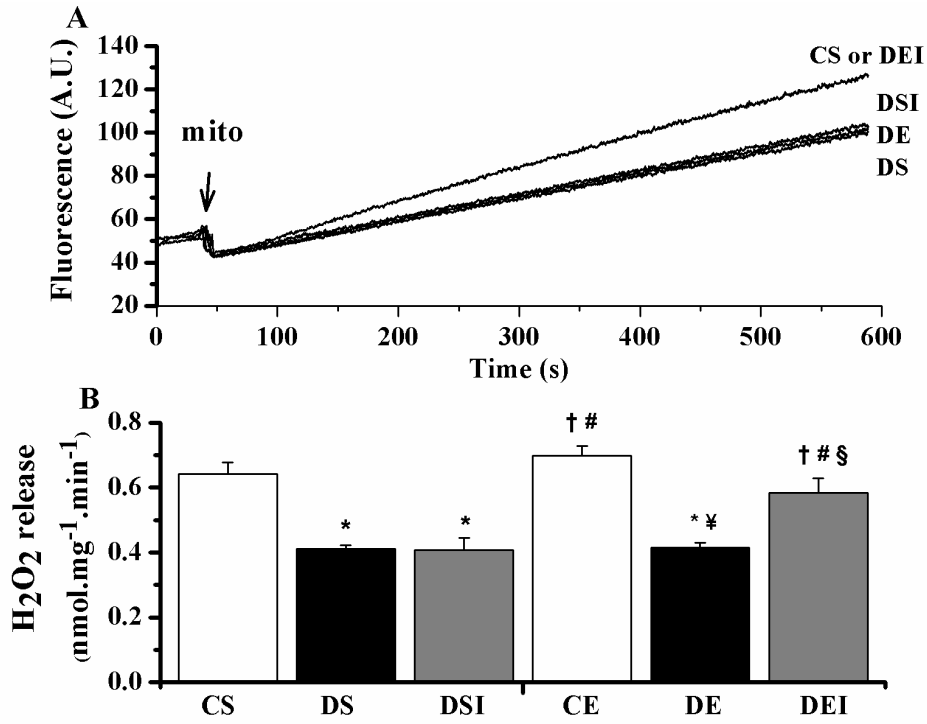


Figure 4. H₂O₂ release in heart isolated mitochondria. (A) Typical traces and (B) mean data of H₂O₂ release rates are presented. Traces are representative of five experiments with different mitochondrial preparations of each group. * different from CS; † different from DS; # different from DSI; ‡ different from CE; § different from DE. N = 6.

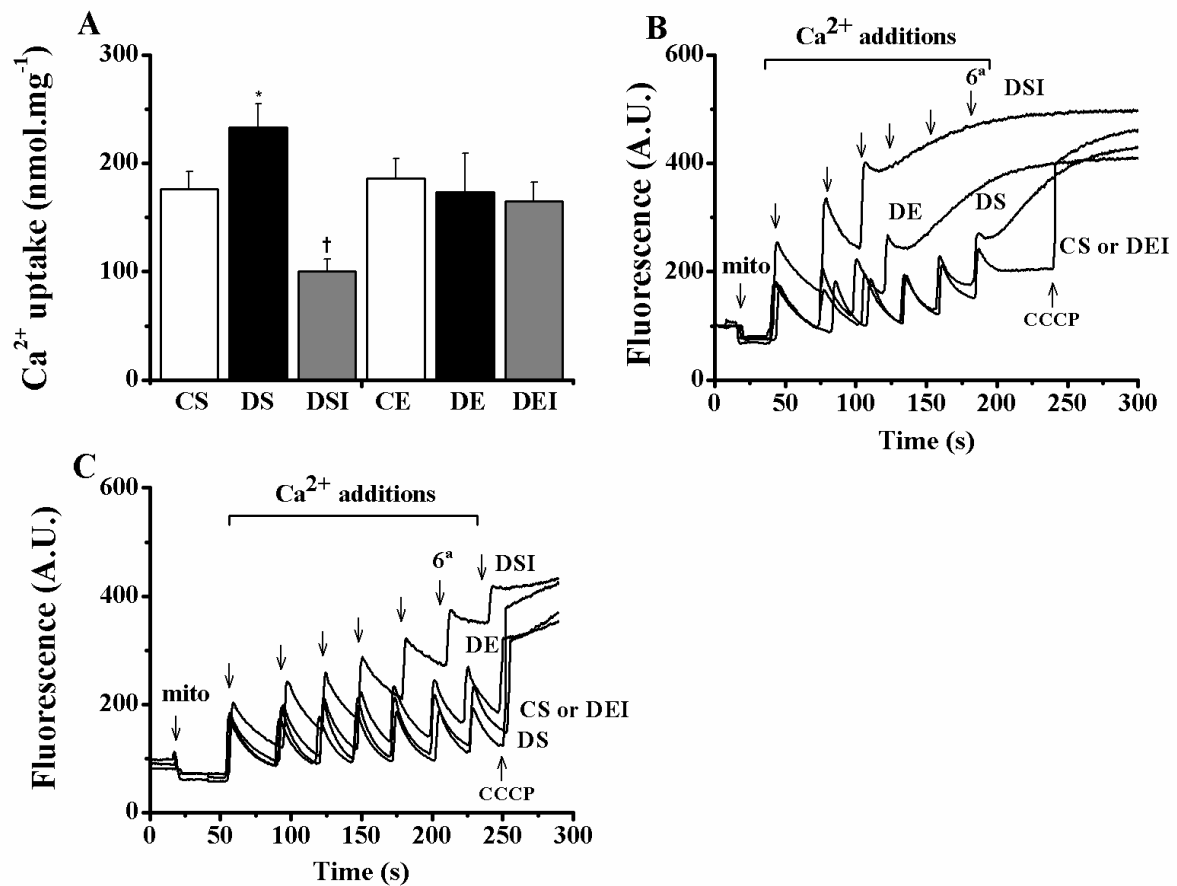


Figure 5. Calcium dynamics in heart isolated mitochondria. (A) Mean $\pm$ SEM data of Ca^{2+} uptake measured in the presence of 1 μM CSA (to prevent MPTP opening). (B) Representative raw experiments of Ca^{2+} retention capacity induced by MPTP opening in the absence of 1 μM CSA. (C) Representative raw experiments of Ca^{2+} retention capacity induced by MPTP opening in the presence of 1 μM CSA. Where indicated were added 20 nmol Ca^{2+} or 1 μM CCCP. CCCP was used to collapse membrane potential and release the full accumulated Ca^{2+} . Traces are representative of five experiments with different mitochondrial preparations of each group.. * different from CS; † different from DS.