

Entrenamiento en Natación Atenúa la Disfunción Contráctil de Cardiomiocitos de Ratones Diabéticos

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

Resumen

Fundamento: La diabetes experimental promueve el trastorno contráctil de los cardiomiocitos, pero los efectos del entrenamiento en natación en este trastorno no se conocen.

Objetivo: Probar los efectos de un programa de capacitación en natación (PTN) sobre el trastorno contráctil de cardiomiocitos de ratas con diabetes experimental.

Métodos: Ratas Wistar (edad: 30 días, peso corporal medio: 84,19 g) con diabetes inducida por estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal, glucosa > 300 mg/dl) fueron divididos en diabéticos sedentarios (DS, n = 10) y diabéticos ejercitados (DE, n = 13). Animales de la misma edad y peso sirvieron de controles sedentarios (CS, n = 10) y controles ejercitados (CE, n = 06). Los animales DE y CE se sometieron a un PTN (05 días/semana, 90 min/día), por 08 semanas. Los miocitos del ventrículo izquierdo (VI) fueron aislados y estimulados eléctricamente a 3,0 Hz en temperatura ambiente (~ 25° C).

Resultados: La diabetes disminuyó la función contráctil de los cardiomiocitos de los animales en comparación con los controles (es decir, menor amplitud de la contracción, la duración de la contracción y relajación). El PTN atenuó la reducción de la amplitud de la contracción (CS, $11 \pm 0,2\%$ frente a la DE, $11,6 \pm 0,2\%$), el tiempo para la contracción máxima (CS, $319 \pm 5,8$ ms vs DE, $333 \pm 4,8$ ms) y el tiempo para el 50% de relajación (CS, $619 \pm 22,2$ ms vs DE, $698 \pm 18,6$ ms) de los cardiomiocitos de los animales diabéticos. La diabetes redujo las dimensiones de los cardiomiocitos, sin embargo, el PTN minimizó la reducción de la anchura y volumen celular, sin cambiar la longitud.

Conclusión: El programa de entrenamiento de natación atenuó la disfunción contráctil de los miocitos del VI de las ratas con diabetes experimental. (Arq Bras Cardiol 2011; 97(1):33-39)

Palabras clave: Natación, esfuerzo físico, miocitos cardíacos, ratones, diabetes mellitus.

Introducción

La diabetes mellitus tipo 1 es un factor de riesgo para eventos cardiovasculares, incluyendo el desarrollo de la miocardiopatía diabética. La incapacidad para mantener la homeostasis de la glucosa en el miocardio compromete la estructura y la función cardíaca en humanos y animales con diabetes experimental¹⁻⁴. En nivel celular, se demostró que la diabetes perjudica la función contráctil de los cardiomiocitos, principalmente por provocar alteraciones estructurales y funcionales en la regulación del calcio (Ca^{2+}) intracelular⁵⁻⁷.

El ejercicio regular se viene utilizando como un agente eficaz para la protección cardíaca para los diabéticos, ya que las anomalías estructurales y funcionales del corazón diabético responden favorablemente al ejercicio⁸⁻¹⁰. Por ejemplo, en

animales diabéticos, el ejercicio crónico atenuó alteraciones en la función ventricular izquierda, tales como la reducción en los volúmenes sistólico, diastólico final y de eyección, en el débito cardíaco y en la fracción de acortamiento^{7,11,12}.

A nivel celular, sin embargo, pocos estudios sobre los efectos del ejercicio crónico en la función contráctil de los cardiomiocitos de animales diabéticos se llevaron a cabo y, además de usar sólo la carrera en cinta, mostraron resultados contradictorios. Por ejemplo, los programas de carrera continua en cinta con intensidad baja (09 m/min, 0% mínimo de una inclinación de 30 min/día) o moderada (18 m/min, 0% de inclinación) no afectaron la contracción de los cardiomiocitos ratones¹³. Otro programa de carrera continua con intensidad alta (18 m/min, 5% de inclinación, 60 min/día) provocó adaptaciones negativas, ya que prolongó el tiempo de contracción celular y no alteró la amplitud de contracción de los cardiomiocitos de ratones¹⁴. Sin embargo, programas de corrida en cinta con intensidad más alta (20-25 m/min, 5% de inclinación, 60 min/día) fueron capaces de restaurar la función contráctil de los cardiomiocitos de ratones y camundongos^{7,15}. Por tanto, hasta el momento, los efectos del ejercicio continuo con

Correspondencia: Antonio Jose Natali •

Av. PH Rolfs, s/n - Departamento de Educação Física - Campus Universitário da Universidade Federal de Viçosa - 36570-000 - Viçosa, MG - Brasil
E-mail: anatali@ufv.br
Artículo recibido el 06/08/10; revisado recibido el 29/10/10; aceptado el 21/12/10.

duración superior a 60 minutos diarios, específicamente la natación, sobre la función contráctil de cardiomiocitos de ratones diabéticos no se conocen.

Este estudio tiene como objetivo probar si un programa de natación, que dura 90 minutos diarios, altera la función contráctil de los cardiomiocitos aislados del ventrículo izquierdo de ratones con diabetes experimental.

Métodos

Animales de experimentación y los tratamientos

Ratones Wistar (a la edad de 30 días, el peso corporal medio de 84,19 g) se dividieron en 04 grupos: Controles sedentarios (CS, n = 10); Control ejercitado (CE, n = 10); Diabéticos sedentarios (DS, n = 20); y el Diabético ejercitado (DE, n = 20) se mantuvieron en ambiente a la temperatura promedio de 22° C y régimen de luminosidad invertido de 12/12 horas claro/oscuro con agua y ración comercial *ad libitum*.

Se siguieron las normas establecidas en el *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1996)* y respetados los Principios Éticos para la Experimentación Animal del Colegio Brasileño de Experimentación Animal (COBEA). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Federal de Viçosa (proceso Nº 03/2009).

Inducción de la diabetes

Después de ayunar por 12 horas, los animales de los grupos DE y DS recibieron una inyección intraperitoneal (60 mg/kg de peso corporal) de estreptozotocina (STZ, Sigma, St. Louis, EE.UU.), diluida en 1,0 ml de tampón de citrato sódico (0,1 M, pH 4,5). Los animales de los grupos CS y CE recibieron la misma dosis de tampón citrato sódico (0,1 M pH 4,5) sin STZ. Siete días después de la aplicación de STZ y ayuno por 12 horas, la glucosa sanguínea en sangre se midió en reposo (One touch ultra - Johnson & Johnson, México). Los animales con niveles de glucosa en sangre en ayunas por encima de 300 mg/dl fueron considerados diabéticos (DS, n = 10; DE, n = 13). La glucosa sanguínea de ayunas y el peso corporal fueron monitoreados semanalmente durante el período experimental.

Programa de capacitación en natación

Después de 45 días de la hiperglucemia, los animales en el grupo DE y la CE se sometieron a un programa de entrenamiento de natación (adaptado de Medeiros et al¹⁶) durante 8 semanas. En la primera semana, los animales se ejercitaron en el agua, sin sobrecarga, más de 10-50 minutos, la duración aumentó en 10 minutos/día. En la segunda semana, los animales se ejercitaron con una carga del 1% de su peso corporal y la duración del ejercicio se incrementó en 10 min/día hasta alcanzar 90 minutos de natación continuada. Desde la tercera semana, la carga se incrementó semanalmente (0,5% del peso corporal) hasta alcanzar el 4% del peso corporal en la 8ª semana. Durante las sesiones de natación, los animales de los grupos DS y CS eran colocados

en una caja de polipropileno con agua calentada (28-30° C) y una profundidad de 10 cm.

Cuatro animales del grupo CE se murieron por ahogamiento.

Aislamiento de los cardiomiocitos

Después de la eutanasia, se removió el corazón y los miocitos del ventrículo izquierdo fueron aislados según describieron Natali et al¹⁷. En resumen, una vez canulado el corazón vía arteria en un sistema Langendorff, se lo perfundió con solución de aislamiento [composición (mM): 130 Na⁺; 5,4 K⁺; 1,4 Mg⁺; 140 Cl⁻; 0,75 Ca²⁺; 5,0 Hepes; 10 glucosa; 20 taurina; y 10 creatina; pH = 7,3 en temperatura ambiente]. A continuación, el corazón fue perfundido con solución libre de calcio conteniendo 0,1 mM de *ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA)*, por un período de 4-6 min. En la secuencia, el corazón fue perfundido con solución conteniendo 1,0 mg.ml⁻¹ de colagenasa tipo 2 (*Worthington, EUA*) y 100,0 mM de CaCl₂ por 20 a 25 min. Las soluciones utilizadas se oxigenaron (O₂ 100% - *White Martins, Brasil*) y se mantuvieron en temperatura de 35° C. Tras perfusiones, los ventrículos fueron separados de las aurículas y pesados. Así que, el ventrículo izquierdo se colocó en un envase que contenía 5,0 ml de la solución enzimática (colagenasa) y albúmina de suero bovino (10%). El envase se agitó moderadamente durante 05 minutos en baño maría a 37° C, después del cual el tejido fue removido del envase y el resto fue centrifugado (3.000 rpm) durante 30 s. Se removió el sobrenadante y los cardiomiocitos se suspendieron en la solución de aislamiento y almacenados en refrigerador (5° C) hasta su utilización.

Función contráctil de los cardiomiocitos

Las contracciones de la célula se midieron utilizando la técnica de cambio de la longitud de los cardiomiocitos mediante el sistema de detección de bordes (Ionoptix, Milton, MA-EE.UU.) montado en un microscopio invertido (Nikon Eclipse - TS100, Japón), como se describe previamente¹⁸. En suma, los miocitos se agruparon en una cámara experimental con la base de cristal y bañados por solución tampón con la siguiente composición (en mM): 136,9 NaCl; 5,4 KCl; 0,37 NaH₂PO₄; 0,57 MgCl₂; 5,0 Hepes = 5; 5,6 Glucosa e 1,0 CaCl₂ (pH = 7,4 en temperatura ambiente). Los miocitos se ven en un monitor a través de una cámara (Myocam, Ionoptix, frecuencia de 240 Hz) unido al microscopio utilizando un programa de detección de imágenes (Ionwizard, Ionoptix). Los cardiomiocitos fueron estimulados externamente a una frecuencia de 3.0 Hz (10 Volts, con una duración de 5 minutos) con una dupla de electrodos de acero y un estimulante eléctrico de campo (Myopacer, Ionoptix). Los movimientos de los bordes longitudinales de los miocitos fueron capturados por el sistema de detección de bordes (Ionwizard, Ionoptix) y se almacena para su posterior análisis. Se utilizaron para las mediciones de contracción sólo los que se encontraban en buenas condiciones, con los bordes y las estriaciones sarcoméricas bien definidas, relajados en reposo, sin presentar contracciones voluntarias. Las contracciones se analizaron como se describe previamente¹⁹.

Dimensiones de los cardiomiocitos

La longitud y la anchura de los miocitos se midieron utilizando un sistema de captura de imágenes, a partir de imágenes de los cardiomiocitos que aparecen horizontalmente en la pantalla de una microcomputadora, como descrito¹⁷. La longitud celular se determinó con la medición de la imagen de la célula generada en el monitor, desde el borde derecho hasta el borde izquierdo, en el punto medio de la anchura del cardiomiocito. La anchura de las células se determinó mediante la medición de la imagen generada en el monitor, desde el borde superior hasta el borde inferior, en el punto medio de la longitud de los cardiomiocitos. El volumen celular se calculó mediante la fórmula: [Volumen (pL) = longitud (mm) x anchura (mm) x (7,59 x 10⁻³ pL/mm²)], conforme Satoh et al²⁰.

Análisis estadístico

Para la comparación de las medias de las variables analizadas entre los 04 grupos (factores ejercicio y la diabetes, dos grupos cada uno), se utilizó el análisis de varianza con dos entradas (ANOVA two-way) y *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. Este análisis se realizó a través del software Sigma Stat, versión 3,0. Se adoptó el nivel de significancia de hasta 5% (p ≤ 0,05).

Resultados

Antes de la aplicación de STZ, no hubo diferencia estadística en la glucosa sanguínea entre los grupos (Tabla 1). Cuarenta y cinco días tras la aplicación de STZ (inicio del ejercicio) y al final del experimento, los animales diabéticos presentaron glucosa sanguínea superior a la de los animales. Los niveles de glucosa en la sangre no se alteraron por el ejercicio, tanto en animales diabéticos (DE vs DS) como en los control (CE vs CS). No hubo interacción entre los factores ejercicio y diabetes (ANOVA two-way, p > 0,05) para esta o para las demás variables analizadas.

Los pesos corporales iniciales no fueron distintos entre los cuatro grupos (Tabla 1). Cuarenta y cinco días después de la aplicación de STZ, los animales en dos grupos DS y DE presentaron pesos corporales inferiores a los controles CS y CE. Lo mismo ocurrió al final del experimento. Asimismo, el programa de natación no alteró los parámetros en los animales

tanto del grupo DE, cuando comparados a DS, como en los CE comparados a CS.

Los animales DS presentaron menores pesos ventriculares (p < 0,05) que los CS (Tabla 1). El programa de natación no alteró el peso ventricular de los animales diabéticos (DS vs DE). Sin embargo, en los animales control, el peso ventricular fue mayor en los animales CE que en los CS. El peso de los ventrículos en relación con el índice de peso corporal, índice de hipertrofia ventricular, fue mayor en DS que en el CS. Entre los animales diabéticos, los DE presentaron peso relativo de los ventrículos mayor que los DS. Entre los controles, los animales CE mostraron un mayor peso relativo de los ventrículos que los CS.

Independientemente, la diabetes redujo la longitud de los cardiomiocitos en los animales sedentarios (DS vs CS) y entrenados (DE vs CE ; Tabla 2). Sin embargo, el programa de natación no ha cambiado la longitud de los cardiomiocitos en los ratones diabéticos (DE vs DS) y en los no diabéticos (CS vs CE). La diabetes redujo la anchura de los miocitos en los animales sedentarios (DS vs CS) y entrenados (DE vs CE). Sin embargo, el programa de natación incrementó la anchura de los cardiomiocitos en los animales diabéticos (DE vs DS). Esto no ocurrió en los animales control (CE vs CS). Hubo una reducción del volumen celular en el grupo DS comparado con el grupo CS. El programa de natación incrementó el volumen de células en los animales diabéticos (DE vs DS), pero no en los animales control (CE vs CS). Se observa que la relación longitud/anchura de los cardiomiocitos no se vio afectada por la diabetes o por el programa de natación.

El análisis de la función contráctil de los cardiomiocitos mostró que la amplitud de la contracción celular se redujo por la diabetes (CS, 11,0 ± 0,2% vs DS, 10,2 ± 0,2%, p < 0,001) (Figura 1A). El programa de natación ha aumentado la amplitud de la contracción de los cardiomiocitos en estos animales (DS, 10,2 ± 0,2% vs DE, 11,6 ± 0,2%, p < 0,001). Entre los animales controles, el programa de natación aumentó la amplitud de contracción (CS, 11,0 ± 0,2% vs CE, 12,4 ± 0,2%, p < 0,001)

Los cardiomiocitos de los animales en el grupo DS, tenían tiempo hasta el pico de contracción más largo que el grupo CS (361 ± 5,7 ms vs 319,0 ± 5,8 ms, respectivamente, p < 0,001) (Figura 1 B). El programa de natación redujo el tiempo

Tabla 1 - Dimensiones de los cardiomiocitos de los ratones controles y diabéticos

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

Datos en media ± EPM. n - número de animales; CS - controles sedentarios; CE - control ejercitados; DS - diabéticos sedentarios; DE - diabéticos ejercitados; GS - glucosa en sangre; PC - peso corporal; PV - peso de los ventrículos; [†], diferente de DS y DE; [†], diferente de CS y CE; [‡], diferente de CS; [§], diferente de DS (p < 0,05).

Tabla 2 - Dimensiones de los cardiomiocitos de los ratones controles y diabéticos

	CS (n = 190)	CE (n = 149)	DS (n = 256)	DE (n = 253)
Longitud (µm)	157,32 ± 1,60 [*]	159,77 ± 1,80 [†]	150,49 ± 1,50	151,29 ± 1,50
Anchura (mm)	22,38 ± 0,41 [*]	22,97 ± 0,44 [†]	19,48 ± 0,4	20,74 ± 0,4 [*]
Volumen (pL)	26,73 ± 0,55 [*]	27,65 ± 0,65 [†]	22,19 ± 0,5	24,00 ± 0,5 [*]
Longitud/anchura	7,48 ± 0,19	7,25 ± 0,19	7,51 ± 0,15	7,91 ± 0,15

Valores en media ± EPM. n - número de cardiomiocitos; CS - controles sedentarios; CE - controles ejercitados; DS - diabéticos sedentarios; DE - diabéticos ejercitados. * - diferente de DS; † - diferente de DS y DE (p < 0,05).

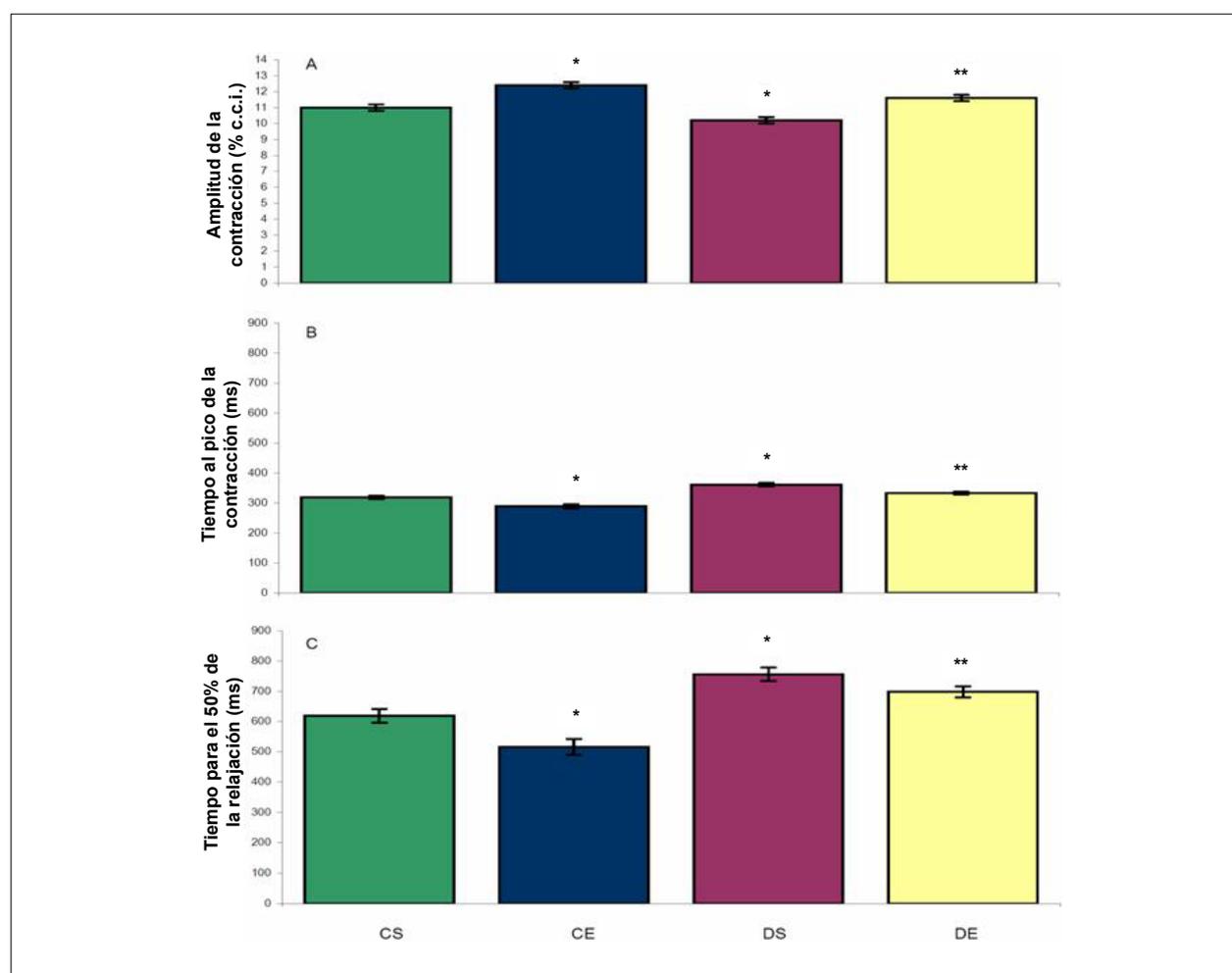


Fig. 1 - Función contráctil de cardiomiocitos de ratones control y diabéticos. A - Amplitud de la contracción; B - Tiempo al pico de la contracción; C - Tiempo para el 50% de la relajación; CS - los controles sedentarios (106 células); CE - control ejercitados (78 células); DS - diabéticos sedentarios (109 células); DE - diabéticos ejercitados (153 células). Los datos son media ± EPM*, diferente de CS**, diferente de DS (p < 0,05).

al pico de la contracción en los animales diabéticos (DS, 361 ± 5,7 ms vs DE, 333,0 ± 4,8 ms, p < 0,001). Igual efecto se observó en los cardiomiocitos de los animales control (CE, 289,0 ± 6,8 ms vs CS, 319,0 ± 5,8 ms, p < 0,001).

Para el 50% de la relajación, el tiempo fue mayor en los cardiomiocitos de animales diabéticos sedentarios que en los controles sedentarios (DS, 756 ± 22,1 ms vs CS, 619,0 ± 22,2 ms, p < 0,001) (Figura 1C). El programa de natación redujo el tiempo para el 50% de la relajación en los cardiomiocitos

de estos animales (DS, 756 ± 22,1 ms vs DE, 698 ± 18,6 ms, p = 0,044). Igual efecto se observó en los cardiomiocitos de los animales control (CE, 516,0 ± 26,1 ms vs CS, 619,0 ± 22,2 ms, p = 0,003).

Discusión

Nuestros datos demuestran que la disfunción contráctil de los cardiomiocitos producida por la diabetes fue moderada

por el programa de entrenamiento de natación de 90 minutos. Por otra parte, el aumento de la anchura y el volumen de los cardiomiocitos, sin alterar la longitud de la célula en respuesta al ejercicio crónico.

La reducción en la amplitud de la contracción observada aquí refleja cambios importantes en el miocardio de ratas diabéticas, *in vivo*, tales como la reducción en la fracción de acortamiento, en el diámetro diastólico final, el diámetro sistólico final del ventrículo izquierdo y en el débito cardíaco^{7,11}. Aunque no probamos los mecanismos, se sabe que la reducción de la sensibilidad de los miofilamentos contráctiles al Ca^{2+} y la reducción de la concentración intracelular del Ca^{2+} están implicados²¹. Sin embargo, cardiomiocitos de ratones Goto-Kakizaki presentaron aumento de la amplitud de contracción asociada a la reducción del transiente de Ca^{2+} . Esto sugiere que la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} estaba aumentada, lo que podría ser uno mecanismo compensatorio para preservar la función mecánica del corazón en la diabetes²². Hay evidencias de que la concentración intracelular de Ca^{2+} se presenta reducida en cardiomiocitos de animales con diabetes experimental²³. Esto ocurre debido al aumento de la actividad del trocador de sodio y calcio (NCX) y de la disminución de la recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplasmático (RS), vía calcio ATPasa del RS (SERCA2)¹⁵ y de la reducción de la liberación de Ca^{2+} del RS, vía receptores de rianodina (RyR2)²⁴. Además de esto, es posible que la reducción de la densidad de túbulos transversos de los cardiomiocitos de animales diabéticos pueda alterar el espacio entre los canales de calcio tipo L y los RyR2, lo que reduce la eficiencia del acoplamiento excitación-contracción¹⁵.

Por el contrario, el ejercicio crónico empleado aumentó la amplitud de contracción en los animales diabéticos y controles. Para los animales diabéticos, este hecho indica que el ejercicio promueve adaptaciones positivas en los cardiomiocitos que contribuyen a aliviar algunas de las anomalías mecánicas observadas en el miocardio diabético *in vivo*^{7,11,12}. Algunos mecanismos vienen siendo propuestos como responsables del aumento de la amplitud de contracción de los cardiomiocitos de ratones en respuesta al ejercicio crónico: hay evidencias que el ejercicio físico crónico puede normalizar el funcionamiento del NCX y del calcio calmodulina quinasa II (CaMKII), reducir la fuga de Ca^{2+} del RS y aumentar el contenido de Ca^{2+} del RS^{7,15}.

La diabetes experimental prolongó el tiempo necesario para el pico de contracción celular. Esto indica que los cardiomiocitos de ratones diabéticos se contraían más lentamente que los de sus controles. Esta alteración tiene implicaciones negativas en la función cardíaca de estos animales. La velocidad de la contracción de los cardiomiocitos es controlada por las proteínas reguladoras de la movilidad de Ca^{2+} intracelular y por la tasa de hidrólisis de ATP que, a su vez, regula la tasa de formación de puentes cruzados²¹. Cardiomiocitos de animales diabéticos presentan reducción en la expresión de proteínas regulatorias, tales como CaMKII, NCX, RyR2, SERCA2 y fosfolambana (PLB)^{5,7,15,24-26}, lo que puede retardar la disponibilidad de Ca^{2+} para la contracción celular.

Sin embargo, el programa de natación redujo el tiempo para el pico de contracción en los animales diabéticos.

Las adaptaciones al ejercicio regular, que aceleran la disponibilidad de Ca^{2+} en el citosol y aumentan la tasa de hidrólisis de ATP, contribuyeron a esta reducción. La velocidad de la disponibilidad de Ca^{2+} en el citosol se rige principalmente por la velocidad de salida del Ca^{2+} del RS, vía RyR2²¹. Hay evidencias de que el ejercicio físico regular aumenta la expresión y/o la actividad de los RyR2 y la sensibilidad de los RyR2 y de los miofilamentos contráctiles al Ca^{2+} en animales diabéticos⁷. Además de esto, el ejercicio físico es capaz de aumentar la densidad y la responsividad de los receptores betaadrenérgicos en ratones diabéticos¹², lo que puede afectar la velocidad de contracción celular.

También demostramos que la diabetes experimental prolongó el tiempo de relajación celular. La relajación de los cardiomiocitos depende de la remoción del Ca^{2+} desde el citosol a la RS (a través de SERCA2, PLB) para el medio extracelular (a través de NCX, Ca^{2+} ATPasa sarcolema) y la mitocondria (a través del transporte de Ca^{2+} mitocondrial)²¹. La expresión y la función de estas estructuras celulares están disminuidas en los cardiomiocitos de animales diabéticos^{12,25-28}. Tal hecho disminuye la velocidad de modo que el Ca^{2+} se remueve del citosol. Estos cambios también se asocian con la depresión de la proteína quinasa A (PKA) y CaMKII y estas proteínas son responsables de la fosforilación de PLB. Además, la no fosforilación de PLB por CaMKII reduce la afinidad de la SERCA2 de Ca^{2+} e inhibe la recaptación de Ca^{2+} por lo RS, lo que ayuda a retardar la relajación celular²⁶. Tales hallazgos en nivel celular son compatibles con las disfunciones diastólicas observadas en corazones diabéticos *in vivo*^{7,11}.

El programa de natación aplicada, a su vez, redujo el tiempo de relajación de los cardiomiocitos de los animales diabéticos. Este efecto ha estado siendo atribuido a la capacidad de ejercicio regular para aumentar la velocidad de eliminación de Ca^{2+} del citosol a través de una mayor expresión de SERCA2 y PLB^{7,15}, una normalización de la expresión y función de los NCX, una reducción en la fosforilación de la CaMKII y la restauración de la densidad de túbulos trasversos¹⁵.

El programa de natación aplicado no afectó a la glucosa de ayuno de los animales diabéticos en reposo. En ratones diabéticos, la STZ induce la apoptosis de las células β -pancreáticas²⁹, lo que inhibe la secreción de insulina. También es posible que haya habido un aumento en la secreción de glucagón de dichos animales³⁰ y su acción contrarreguladora haya ayudado en el mantenimiento de la hiperglucemia. Nuestros resultados son consistentes con los de otros estudios^{7,11-14,31}, aunque estos utilizaron diferentes protocolos de ejercicio (es decir, cinta de correr). Por otro lado, algunos estudios demostraron que el ejercicio fue capaz de mejorar el metabolismo de la glucosa en ratones diabéticos^{32,33}. Probablemente, la falta de consenso entre los resultados de estos estudios se debe al uso de diferentes procedimientos metodológicos.

Los animales diabéticos presentaron características poliuria y polidipsia, características de la diabetes, pero a pesar de la alimentación normal, sin restricciones de alimentos [por ejemplo, el consumo semanal de alimentos (diabéticos: $199,47 \pm 3,55$ g vs controles: $194,36 \pm 4,4$ g)], hubo libre circulación dentro de la caja de alojamiento (grupo DS) y se ejercitaron (grupo DE), no ganaron tanto peso como los controles no diabéticos. Los menores pesos corporales

y ventriculares de los animales diabéticos indicaron que ellos tuvieron el crecimiento perjudicado. En ratones con diabetes inducida por STZ, además de la secreción de insulina, la secreción de hormonas tales como la hormona del crecimiento, el glucagón, el polipéptido pancreático y, en consecuencia, el factor de crecimiento similar a la insulina, se alteran y afectan al crecimiento³⁴⁻³⁶. Se sabe también que la diabetes induce el aumento de la utilización de ácidos grasos y acelera el catabolismo proteico³⁷.

Sin embargo, el programa de natación utilizado fue incapaz de alterar significativamente el peso corporal de los pacientes diabéticos o no diabéticos, pero aumentó el peso absoluto de los ventrículos en los animales no diabéticos. Sin embargo, más importante, tanto la diabetes como el programa de natación aumentaron el peso relativo de los ventrículos en los animales diabéticos y el programa de natación aumentó este parámetro en los animales control no diabéticos, lo que demuestra la hipertrofia ventricular. La hipertrofia cardíaca inducida por la diabetes experimental (patológica) y por el ejercicio crónico (fisiológica) ha sido documentada en estudios previos^{7, 14, 17, 31}.

La reducción en las dimensiones de los cardiomiocitos en los animales diabéticos con relación a los controles, observada en este estudio, es coherente con el menor peso del ventrículo presentado por los animales diabéticos. Sin embargo, el programa de natación utilizado aumentó el volumen de los cardiomiocitos de ratones diabéticos. Esto sugiere que la

inhibición del crecimiento celular causada por la diabetes se vio afectada por el ejercicio físico aplicado y denota hipertrofia celular. De hecho, el aumento del peso relativo del ventrículo en los animales del grupo DE fue más pronunciado que en los animales CE (33,3% vs 31,5%, respectivamente).

Conclusión

Concluimos que el programa de entrenamiento de natación aplicado atenuó la disfunción contráctil de los cardiomiocitos del VI de los ratones con diabetes experimental. Estos resultados son relevantes para la comprensión a nivel celular, de los beneficios del ejercicio físico sobre la función contráctil del músculo cardíaco de las personas con diabetes tipo I.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

El presente estudio fue financiado por la FAPEMIG y por la Beca de productividad del CNPq (nivel 2).

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de Disertación de Maestría de Márcia Ferreira da Silva, por la *Universidade Federal de Viçosa*.

Referencias

1. Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2004;25(4):543-67.
2. Jweied EE, McKinney RD, Walker LA, Brodsky I, Geha AS, Massad MG, et al. Depressed cardiac myofilament function in human diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(6):H2478-83.
3. Lacombe VA, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, Sridhar A, Emani S, Bonagura JD, et al. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(5):R1787-97.
4. Reuter H, Gronke S, Adam C, Ribati M, Brabender J, Zobel C, et al. Sarcoplasmic Ca²⁺ release is prolonged in nonfailing myocardium of diabetic patients. *Mol Cell Biochem*. 2008;308(1-2):141-9.
5. Kim HW, Ch YS, Lee HR, Park SY, Kim YH. Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression. *Life Sci*. 2001;70(4):367-79.
6. Bracken N, Howarth FC, Singh J. Effects of streptozotocin-induced diabetes on contraction and calcium transport in rat ventricular cardiomyocytes. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1084:208-22.
7. Shao CH, Wehrens XH, Wyatt TA, Parbhu S, Rozanski GJ, Patel KP, et al. Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol*. 2009;106(4):1280-92.
8. Lehmann R, Kaplan V, Bingisser R, Bloch KE, Spinass GA. Impact of physical activity on cardiovascular risk factors in IDDM. *Diabetes Care*. 1997;20(10):1603-11.
9. Searls YM, Smirnova IV, Fegley BR, Stehno-Bittel L. Exercise attenuates diabetes-induced ultrastructural changes in rat cardiac tissue. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(11):1863-70.
10. Monteiro P, Gonçalves L, Providencia LA. Diabetes and cardiovascular disease: the road to cardioprotection. *Heart*. 2005;91(12):1621-5.
11. Loganathan R, Bilgen M, Al-Hafez B, Zhero SV, Alenezy MD, Smirnova IV. Exercise training improves cardiac performance in diabetes: in vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. *J Appl Physiol*. 2007;102(2):665-72.
12. Bidasee KR, Zheng H, Shao CH, Parbhu SK, Rozanski GJ, Patel KP. Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of beta-adrenoceptors. *J Appl Physiol*. 2008;105(3):907-14.
13. Howarth FC, Almagaddum FA, Qureshi MA, Ljubicavijevic M. Effects of varying intensity exercise on shortening and intracellular calcium in ventricular myocytes from streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2008;317(1-2):161-7.
14. Howarth FC, Almagaddum FA, Qureshi MA, Ljubicavijevic M. The effects of heavy long-term exercise on ventricular myocyte shortening and intracellular Ca²⁺ in streptozotocin-induced diabetic rat. *J Diabetes Complications*. 2009;24(4):278-85.
15. Stolen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, et al. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2009;105(6):527-36.
16. Medeiros A, Gianolla RM, Kalil LMP, Bacurau RFP, Rosa LFBC, Negrão CE, et al. Efeito do treinamento físico com natação sobre o sistema cardiovascular de ratos normotensos. *Rev paul Educ Fís*. 2000;14(1):7-15.
17. Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM, White E. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *J Physiol*. 2002;541(Pt 3):863-75.
18. Prímola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, et al. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *J Appl Physiol*. 2009;107(2):593-8.
19. Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA, Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, et al. Changes in cellular contractility and cytokines profile during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(3):238-46.

20. Satoh H, Delbridge LM, Blatter LA, Bers DM. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys J*. 1996;70(3):1494-504.
21. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:23-49.
22. Howarth FC, Qureshi MA. Myofilament sensitivity to Ca²⁺ in ventricular myocytes from the Goto-Kakizaki diabetic rat. *Mol Cell Biochem*. 2008;315(1-2):69-74.
23. Ren J, Bode AM. Altered cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from spontaneously diabetic BB rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(1):H238-44.
24. Bidasee KR, Nallani K, Yu Y, Cocklin RR, Zhang Y, Wang M, et al. Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. *Diabetes*. 2003;52(7):1825-36.
25. Bidasee KR, Zhang Y, Shao CH, Wang M, Patel KP, Dincer UD, et al. Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Diabetes*. 2004;53(2):463-73.
26. Choi KM, Zhong Y, Hoyt BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, et al. Defective intracellular Ca²⁺ signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(4):H1398-408.
27. Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, et al. Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *J Physiol*. 2000;527(Pt 1):85-94.
28. Vasanji Z, Cantor EJ, Juric D, Moyan M, 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*. 2008;291(4):C772-80.
29. Konrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, Kudlow JE. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem J*. 2001;356(1):31-41.
30. Ponery AS, Adeghate E. Distribution of NPY and SP and their effects on glucagon secretion from the in vitro normal and diabetic pancreatic tissues. *Peptides*. 2000;21(10):1503-9.
31. Howarth FC, Marzouqi FM, Al Saeedi AM, Hameed RS, Adeghate E. The effect of a heavy exercise program on the distribution of pancreatic hormones in the streptozotocin-induced diabetic rat. *JOP*. 2009;10(5):485-91.
32. Broderick TL, Poirier P, Gillis M. Exercise training restores abnormal myocardial glucose utilization and cardiac function in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005;21(1):44-50.
33. Hall JL, Sexton WL, Stanley WC. Exercise training attenuates the reduction in myocardial GLUT-4 in diabetic rats. *J Appl Physiol*. 1995;78(1):76-81.
34. Gomes RJ, Leme JA, de Moura LP, de Araújo MB, Rogatto GP, de Moura RF, et al. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. *Cell Biochem Funct*. 2009;27(4):199-204.
35. de Almeida Leme JA, de Araújo MB, de Moura LP, Gomes RJ, de Moura RF, Rogatto GP, et al. Effects of physical training on serum and pituitary growth hormone contents in diabetic rats. *Pituitary*. 2009;12(4):304-8.
36. Menon RK, Stephan DA, Rao RH, Shen-Orr Z, Downs LS, Roberts CT, et al. Tissue-specific regulation of the growth hormone receptor gene in streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Endocrinol*. 1994;142(3):453-62.
37. Howarth FC, Chandler NJ, Kharche S, Tellez JO, Greener ID, Yamanushi TT, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein expression in ventricular muscle. *Mol Cell Biochem*. 2008;319(1-2):105-14.