**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**HISTOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURA DA MUSCULATURA VENTRICULAR
ESQUERDA DE RATOS DIABÉTICOS: EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO.**

ALEXANDRE CASTELLAR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Biologia Celular e Molecular)

Março - 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO**

Alexandre Castellar

**HISTOQUÍMICA E ULTRA-ESTRUTURA DA MUSCULATURA
VENTRICULAR ESQUERDA DE RATOS DIABÉTICOS: EFEITOS DO
EXERCÍCIO FÍSICO.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Biologia Celular e Molecular)

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano
Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Gomes

**Rio Claro, SP
2010**

*Aos meus pais Oswaldo e Lúcia
e ao meu irmão Anderson.*

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Ao Departamento de Biologia e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP, Campus de Rio Claro, nas pessoas do Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, dos técnicos Antônio Teruyoshy Yabuky, Mônica Iamonti, Gerson Melo Souza, e demais funcionários pela convivência e presteza. Ao Departamento de Educação Física nas pessoas da Prof.^a Dr.^a Eliete Luciano, técnicos China e Beto, e dos amigos José Alexandre e Rodrigo Dalia pela sempre prestativa ajuda.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, como professor, orientador e amigo, meu Muito Obrigado pela confiança, pelos ensinamentos e pela grande amizade!

Ao Prof. Dr. Ricardo José Gomes, como co-orientador e amigo, pela sempre prestativa ajuda e pelos ensinamentos.

Aos meus amigos companheiros nessa dura jornada Rafael, Rodrigo e Bruno pelo grande auxílio, apoio, brigas, discussões, comemorações, jogatinas e por tudo o que vocês significaram neste trabalho.

A todos os meus amigos de Rio Claro, que sempre estiveram comigo, mesmo não estando ao meu lado! Ficam aqui, agradecidos por nome aqueles que foram mais constantes ao longo da confecção desta dissertação: Henrique, Débora, Marina, Taís, Cibele, Lúcia e Mariana. Os meus mais sinceros agradecimentos a estes e a todos os outros não citados, por tudo que significaram em minha vida.

À Beatriz, por tudo que ela significa para mim e por ter me ajudado e cuidado de mim nos momentos mais difíceis. Saiba que eu te amo muito.

Aos meus pais e ao meu irmão, simplesmente por que vocês são tudo para mim. Se hoje eu me considero uma pessoa digna e se hoje me considero realizado pela pessoa que me tornei e por tudo que conquistei, isso se deve a vocês. Muito obrigado simplesmente por serem vocês.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho, que torceram e se preocuparam, estejam certos de que tenho vocês como amigos.

RESUMO GERAL

O Diabetes mellitus, doença que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, é considerado um significativo fator de risco para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares. Caracterizado principalmente pelo quadro de hiperglicemia, o diabetes pode apresentar ainda um conjunto de características que, associadas, contribuem para o surgimento de complicações vasculares e para o aumento do risco de morte por problemas cardíacos independente de outros fatores. Atualmente, o exercício físico regular, juntamente com a insulino terapia e o planejamento alimentar, tem sido considerada como uma das principais abordagens no tratamento do diabetes tipo I, com o objetivo de aproximar as condições metabólicas do paciente a um estado fisiológico normal, impedindo ou retardando as complicações crônicas do diabetes. Este estudo tem por objetivo avaliar as alterações morfológicas causadas pelo diabetes na musculatura ventricular esquerda de ratos diabéticos, bem como o efeito do exercício físico na recuperação ou prevenção destas alterações. Para isso, foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar divididos em quatro grupos: diabéticos sedentários (DS), diabéticos treinados (DT), controle sedentário (CS) e controle treinado (CT), sendo que os grupos treinados realizaram um protocolo de exercício físico. O diabetes experimental do tipo I foi induzido por meio da aplicação de aloxana monoidratada Sigma® (35 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5. O protocolo de treinamento consistiu de natação por 60 minutos diários, 5 dias por semana, durante 8 semanas consecutivas com uma carga de 4,8% (para animais diabéticos) e 5,2% (para os animais saudáveis), correspondente à máxima fase estável de lactato. As análises histológicas e histoquímicas mostraram várias alterações morfológicas em decorrência do diabetes experimental. Ficou evidente através da técnica de Hematoxilina-Eosina a desorganização tecidual da musculatura ventricular esquerda que ocorreu em DS. Já os indivíduos DT apresentaram organização próxima ao normal. A reação de PAS se apresentou mais intensa nos indivíduos DS, tanto no endomísio como no citoplasma das fibras, possivelmente devido a alterações nas quantidades de fibras colágenas e a baixa utilização da glicose nesses animais. Nos animais do grupo DT foi observado uma leve recuperação a níveis próximos ao observado nos controles. A técnica de Picrossírius-Hematoxilina mostrou intensidade de reação alterada no endomísio dos indivíduos DS, possivelmente

devido à deposição de fibras colágenas, tendo os animais do grupo DT apresentado reação muito próxima aos controles. A técnica para evidenciar fibras elásticas (Prata amoniacal) apresentou resultados muito próximos para todos os grupos. A análise ultraestrutural mostrou que os animais do grupo DS apresentaram grande desorganização das miofibrilas, miofibrilas em degeneração e mitocôndrias com matriz mitocondrial alterada, quando comparados aos animais dos grupos controles (CS e CT). Os animais do grupo DT apresentaram organização tecidual muito próxima à observada nos controles, porém exibiram mitocôndrias com algumas alterações morfológicas em decorrência do exercício. As mesmas alterações foram observadas em CT. O exercício físico regular se mostrou benéfico em prevenir as alterações morfológicas, decorrentes do diabetes experimental, analisadas neste trabalho.

GENERAL ABSTRACT

Diabetes mellitus, a disease that affects millions of people around the world, is considered a significant risk factor for developing cardiovascular problems. Mainly characterized by hyperglycemia, diabetes can also present a set of characteristics which when associated contribute to the onset of vascular complications and to the increase of the risk of death from heart disease independent of other factors. Currently, regular exercise, along with insulin therapy and meal planning, has been regarded as one of the main approaches in the treatment of type 1 diabetes, aiming to approximate the metabolic conditions of the patient to a normal physiological state, preventing or delaying the chronic complications of diabetes. This study aims to analyse the morphological changes caused by diabetes in the left ventricular muscle of diabetic rats and the effect of exercise on recovery or prevention of these changes. To do this, were used adult male Wistar rats, which were divided into four groups: diabetic sedentary (DS), diabetic training (DT), sedentary control (SC) and trained control (TC), and the trained groups conducted a protocol of physical exercise. Experimental diabetes type 1 was induced by the application of alloxan monohydrate Sigma[®] (35 mg / kg body weight) dissolved in citrate buffer 0.01 M, pH 4.5. Training protocol consisted of swimming for 60 minutes daily, 5 days a week for 8 weeks, with a load of 4.8% (for diabetic animals) and 5.2% (for healthy animals), corresponding to the maximal lactate steady state. Histological and histochemical analysis showed morphological changes due to experimental diabetes. It was evident through the hematoxylin-eosin technique tissue disorganization of the ventricular muscle which occurred in DS. However tissue organization was close to normal in DT animals. The PAS reaction was most intense in DS animals, both in the endomysium as in the cytoplasm of the fibers, possibly because of changes in amounts of collagen fibers and to a low utilization of glucose in these animals. In the group TD has seen a slight recovery to levels close to that observed in controls. The Picrosirius-hematoxylin technique showed a change in reaction intensity of the endomysium in DS animals, possibly due to a collagen fibers deposition, while the animals of DT group showed reaction very close to the controls. The technique to evidence elastic fibers (Silver ammonia) showed very similar results for all groups. The ultrastructural analysis showed that DS group animals presented great disorganization of myofibrils, degeneration of myofibrils and mitochondria with altered mitochondrial matrix, when

compared to the control groups' animals (CS and CT). The DT group animals showed tissue organization very close to that one observed in controls, but exhibited mitochondria with some alterations due to exercise. The same alterations were observed in CT. Regular exercise has proven beneficial in preventing the morphological changes resulting from experimental diabetes, analyzed in this work.

Keywords: Diabetes mellitus. Exercise. Myocardium. Histology. Ultrastructure.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Análise histoquímica das alterações causadas pelo diabetes experimental na musculatura ventricular esquerda	11
1.1 Resumo.....	12
1.2 Introdução	13
1.3 Objetivos	17
1.4 Materiais e Métodos.....	17
1.4.1 Indução do diabetes e delineamento experimental.....	17
1.4.2 Protocolo de Treinamento.....	18
1.4.3 Avaliação dos animais e sacrifício	19
1.4.4 Histologia/Histoquímica	19
1.5 Resultados	20
1.5.1 Hematoxilina-Eosina	21
1.5.2 Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	21
1.5.3 Picrossírius-Hematoxilina.....	22
1.5.4 Prata Amoniacal.....	22
1.6 Discussão.....	23
1.7 Conclusão	27
1.8 Literatura Citada.....	28
1.9 Apêndice (figuras e tabelas).....	33
 CAPÍTULO 2 – Análise ultraestrutural das alterações causadas pelo diabetes experimental na musculatura ventricular esquerda: Efeitos do exercício físico	39
2.1 Resumo.....	40
2.2 Introdução	41
2.3 Objetivos	45
2.4 Materiais e Métodos.....	45
2.4.1 Indução do diabetes e delineamento experimental.....	45
2.4.2 Protocolo de Treinamento.....	46
2.4.3 Avaliação dos animais e sacrifício	46
2.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (Rotina).....	47
2.5 Resultados	47

2.5.1 Análises prévias ao sacrifício dos animais.....	47
2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	48
2.6 Discussão.....	51
2.7 Conclusão	56
2.8 Literatura Citada.....	57
2.9 Apêndice (figuras e tabelas).....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
LITERATURA GERAL CITADA	77

**ANÁLISE HISTOQUÍMICA DAS ALTERAÇÕES CAUSADAS
PELO DIABETES EXPERIMENTAL NA MUSCULATURA
VENTRICULAR ESQUERDA**

CAPÍTULO 1

1.1.RESUMO

O Diabetes mellitus, doença que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, é considerado um significativo fator de risco para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares. Caracterizado principalmente pelo quadro de hiperglicemia, o diabetes pode apresentar ainda um conjunto de características que associadas, contribuem para o surgimento de complicações vasculares e para o aumento do risco de morte por problemas cardíacos independente de outros fatores. Atualmente, o exercício físico regular tem sido considerado como umas das principais abordagens no tratamento do diabetes do tipo I, podendo levar a uma melhora na performance cardíaca atingindo números muito próximos ao de corações não-diabéticos. Neste estudo, foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus Wistar*), divididos em quatro grupos: diabéticos sedentários (DS), diabéticos treinados (DT), controle sedentário (CS) e controle treinado (CT), sendo que os grupos treinados realizaram um protocolo de treinamento físico. O diabetes experimental do Tipo I foi induzido por meio da aplicação de aloxana monoidratada Sigma (35 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5. O

protocolo de treinamento consistiu de natação por 60 minutos diários, 5 dias por semana, durante 8 semanas consecutivas e com sobrecarga atada ao tórax, correspondendo à Máxima Fase Estável do Lactato (MFEL). A técnica de Hematoxilina-Eosina evidenciou uma série de alterações na organização das fibras musculares nos indivíduos DS. Já os indivíduos DT apresentaram organização próxima ao normal. A reação de PAS se apresentou mais intensa nos indivíduos DS, tanto no endomísio, possivelmente devido a alterações nas quantidades de fibras colágenas, como no citoplasma das fibras, possivelmente devido à baixa utilização da glicose nesses indivíduos. Nos animais do grupo DT foi observado uma leve recuperação a níveis próximos ao observado nos controles. A técnica de Picrossírius-Hematoxilina mostrou intensidade de reação alterada no endomísio dos indivíduos DS, possivelmente devido à deposição de fibras colágenas, tendo os animais do grupo DT apresentado reação muito próxima aos controles. A técnica para evidenciar fibras elásticas (Prata amoniacal) apresentou resultados muito próximos para todos os grupos. A atividade física se mostrou eficiente na prevenção das alterações causadas pelo diabetes na musculatura ventricular, visto a recuperação a níveis normais observada em quase todas as técnicas.

1.2.INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus, síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da resistência à sua ação (NEGRÃO & BARRETTO, 2006), tem o número de casos aumentando significativamente nas últimas décadas. Dados da estimativa da Organização Mundial de Saúde mostram que em 2003 cerca de 177 milhões de pessoas no mundo eram diabéticas, e que em 2030 o número de pessoas acometidas pela doença deve chegar a 366 milhões (WILD et al., 2004). No Brasil, o diabetes atinge cerca de 7% da população (OLIVEIRA, 2000), sendo considerado pelo Ministério da Saúde um dos maiores problemas de saúde pública atualmente.

Segundo a Associação Americana de Diabetes o diabetes pode ser classificado da seguinte maneira (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006):

- Diabetes mellitus Tipo 1 (insulino-dependente): Quando há destruição das células β -pancreáticas, causando um quadro de deficiência absoluta de insulina. Pode ter causa autoimune ou idiopática.

- Diabetes mellitus Tipo 2 (não insulino-dependente): Quando há vários graus de deficiência e resistência a ação da insulina.
- Diabetes Gestacional: Causada por alterações hormonais e metabólicas durante a gravidez, que induzem a um quadro de resistência à insulina.
- Outros tipos de diabetes: São causados por problemas genéticos, doenças pancreáticas ou endócrinas, infecções virais, dentre outras causas.

Experimentalmente, o diabetes pode ser induzido de várias formas, por exemplo com a utilização de hormônios como glucagon, somatotropina, glicocorticóides, adrenalina, entre outros. Para a indução do diabetes tipo 1 permanente podem ser utilizadas drogas específicas dentre as quais destacam-se a Aloxana (ALX) e a Estreptozotocina (STZ), que destroem seletivamente as células beta-pancreáticas gerando um quadro de hipoinsulinemia permanente (LERCO et al., 2003; WEI et al., 2003).

O indivíduo diabético apresenta diminuição na captação de glicose pelas suas células e, como consequência, ocorre o aumento da concentração de glicose circulante (hiperglicemia). Outros sintomas também podem se manifestar, dentre os quais se destacam a poliúria, a polidipsia, a glicosúria (presença de glicose na urina), a fome exagerada (polifagia) e o aumento na presença de corpos cetônicos na urina e no sangue (LEON, 1987).

Os indivíduos diabéticos são considerados de alto risco para desordens vasculares que afetam coração, cérebro, rins e vasos periféricos. Estes pacientes diabéticos vêm apresentando significativa elevação da mortalidade, principalmente nas últimas décadas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003; ALEXANDER, LANDSMAN, TEUTSCH, 2000). A doença cardiovascular é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes tipos 1 e 2, acometendo cerca de metade de todos os diabéticos (SMANIO, 2007). Se forem comparados aos não-diabéticos, os diabéticos apresentam mais eventos cardíacos, como infarto do miocárdio, e maior frequência de isquemia silenciosa (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998).

Em longo prazo, o diabetes também pode trazer complicações microvasculares, conhecidas como microangiopatia diabética, e também pode tornar o indivíduo predisposto a traumatismos e injúrias prejudicando também a cicatrização dos ferimentos (LUCIANO, 1996). As principais características associadas ao diabetes e que contribuem para as complicações vasculares e morfológicas são hiperglicemia,

resistência à insulina, hipoinsulinemia, dislipidemias, além de alterações na produção de citocinas, hormônios vasoativos e fatores de crescimento (FREITAS et al., 2002; NORBY et al.). A hiperglicemia é o principal fator, a nível celular, responsável pela promoção e progressão das doenças vasculares causadas pelo diabetes. Além disso, há um acréscimo de proteínas na matriz extracelular, principalmente de colágeno IV, laminina e fibronectina, que reduz a elasticidade e altera as propriedades seletivas da membrana basal (ZHU, KIM e STEFFES, et al., 1994).

Estudos apontam ainda para a existência de uma cardiomiopatia diabética específica, que contribui para o aumento do risco de morte por problemas cardíacos para os dois tipos de diabetes, independente de outros fatores como problemas macrovasculares. Essa cardiomiopatia acarreta numa disfunção da sístole e da diástole, distúrbios esses caracterizados pela contração e pelo relaxamento prolongados e em menor velocidade, além da redução do poder de contração de todo o coração, do tecido muscular cardíaco e de miócitos ventriculares isolados (LI, CULVER e REN, 2003). Embora os processos relacionados a essa patologia não sejam ainda bem conhecidos, especula-se que estes estejam ligados a redução da produção de energia devido à diminuição da respiração mitocondrial e da atividade das desidrogenases, à disfunção nas proteínas regulatórias e contráteis, bem como ao prejuízo na homeostase de cálcio intracelular (LI, CULVER e REN, 2003).

A disfunção diastólica no portador de diabetes pode também estar relacionada com a deposição intersticial de colágeno. Tanto os colágenos do Tipo I quanto do Tipo III estão presentes na musculatura cardíaca de indivíduos normais e diabéticos, porém, biópsias do miocárdio de indivíduos diabéticos mostraram uma proporção significativamente elevada de colágeno do Tipo III quando comparados a indivíduos não diabéticos (BAN & TWIGG, 2008). A quantidade elevada ou a diferença estrutural destes dois tipos de colágeno podem influenciar negativamente a diástole e a sístole, afetando o desempenho cardíaco.

A diminuição da capacidade de contração das fibras musculares cardíacas, característica da cardiomiopatia diabética, pode também estar relacionada com alterações estruturais e bioquímicas (VADLAMUSDI et al., 1982). Em fibras musculares estriadas de indivíduos saudáveis, as mitocôndrias são encontradas intimamente associadas às gotas de lipídios sendo que ambas se dispõem entre as miofibrilas, porém quando observou-se as fibras de indivíduos diabéticos foram

encontrados miofilamentos desorganizados e desaparecimento de linhas Z (TAKESHITA et al., 1997), miofibrilas anormais com vários graus de degeneração, e mitocôndrias intumescidas, com arranjo anormal e com acúmulo de gotas de lipídeos (TOMITA et al., 1996).

Estudos com animais diabéticos experimentais sugerem que o diabetes, independente de outros fatores, induz à disfunção diastólica ventricular esquerda (NEMOTO et al, 2006), onde ocorrem anormalidades na função mecânica da contração durante a diástole. Esta disfunção resulta no aumento da probabilidade de falhas cardíacas.

O diabetes é também considerado um significativo fator de risco para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares, tais como aterosclerose e doenças da artéria coronária, podendo trazer também prejuízos à retina e rins. A incidência e a mortalidade para doenças cardiovasculares são de duas a cinco vezes maiores em pacientes diabéticos (WÄGNER et al, 2003).

O comprometimento dos grandes vasos é refletido no processo aterosclerótico precoce e acelerado das artérias coronárias, cerebrais e de membros inferiores, responsável pela alta taxa de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e gangrena de membros inferiores (NEGRÃO & BARRETTO, 2006). Os danos coronarianos ocorrem principalmente devido às modificações estruturais que estes vasos sofrem quando expostos a condições de hiperglicemia como, por exemplo, a atenuação da capacidade de vasodilatação. Além da hiperglicemia, a dislipidemia, o processo que leva ao aumento na concentração de triglicérides e na composição das lipoproteínas, também causa danos às coronárias, pois acelera os processos ateroscleróticos.

Atualmente, o exercício físico regular, juntamente com a insulinoterapia e o planejamento alimentar, tem sido considerado como uma das principais abordagens no tratamento do diabetes do Tipo I. O tratamento tem como objetivo aproximar as condições metabólicas do indivíduo com diabetes Tipo I de um estado fisiológico normal, prevenindo ou retardando as complicações crônicas do diabetes (DE ANGELIS et al, 2006).

O exercício físico regular induz adaptações metabólicas relevantes, tais como o aumento na utilização de glicogênio muscular durante o exercício físico, aumento do número e tamanho das mitocôndrias musculares, aumento da atividade das enzimas-chave da mobilização e oxidação dos lipídeos e aumento da sensibilidade

dos tecidos periféricos à insulina (KRAUS et al., 2002; LUCIANO et al. 2002). O exercício físico promove ainda alterações agudas e crônicas nos sistemas neuroendócrino e cardiovascular (BENETTI, 1996).

Além disso, tanto indivíduos diabéticos como indivíduos não diabéticos apresentam melhor sensibilidade à insulina induzida pelo exercício, efeitos estes causados por uma serie de adaptações do organismo tais como: aumento da densidade capilar, aumento da expressão e translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, aumento das fibras musculares mais sensíveis à ação da insulina, dentre outros (DE ANGELIS et al, 2006).

1.3.OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é de avaliar, através de análises qualitativas, os efeitos histológicos e histoquímicos causados pelo diabetes experimental na musculatura ventricular esquerda de ratos diabéticos aloxânicos, bem como avaliar os efeitos do exercício físico moderado sobre a possível recuperação ou prevenção dessas alterações.

1.4.MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico do Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS (protocolo número 634/2008).

Foram utilizados 22 ratos adultos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus Wistar*), machos, com aproximadamente 70 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, medindo 37 x 31 x 16 centímetros, e mantidos à temperatura ambiente de 25° C, com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, alimentados com ração balanceada Purina® padrão e água “*ad libitum*”.

1.4.1. Indução do diabetes e delineamento experimental

Para indução do diabetes experimental, os ratos foram anestesiados moderadamente com éter etílico e, em seguida, receberam Aloxana monoidratada Sigma (35 mg/kg de peso corporal), dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5,

injetada na veia peniana. Após este procedimento, os ratos foram recolocados nas gaiolas, recebendo no primeiro dia pós-aloxana, solução de água e glicose (15%), além de ração (LUCIANO & LIMA, 1997). Cinco dias após a administração da droga, foi realizado um teste de glicemia para comprovação do estado diabético dos animais, sendo considerados diabéticos apenas aqueles ratos que apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg por 100 mL de sangue, sendo descartados os demais. Os animais diabéticos, juntamente com os animais não induzidos (controles) foram então distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- Controle Sedentário (CS) - ratos saudáveis que não realizaram exercícios físicos. N=5;
- Controle Treinado (CT) - ratos saudáveis que realizaram um protocolo de exercícios físicos. N=6;
- Diabético Sedentário (DS) - ratos diabéticos aloxânicos que não realizaram exercícios físicos. N=5;
- Diabético Treinado (DT) - ratos diabéticos aloxânicos que realizaram o mesmo protocolo de exercícios físicos do grupo (CT). N=6;

1.4.2. Protocolo de Treinamento

Todos os ratos foram submetidos a testes de esforço para a identificação da Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL), por meio da qual foi definida a sobrecarga para cada grupo de treinamento (GOMES et al, 2009).

O protocolo de exercícios consistiu de natação por 1 hora/dia, 5 vezes/semana, durante 8 semanas consecutivas e com sobrecarga atada ao tórax (em % do peso corporal) correspondendo à MFEL (4,8% para animais diabéticos e 5,2% para animais saudáveis).

Período de adaptação: Com a finalidade de respeitar o princípio fisiológico da sobrecarga, os animais realizaram a adaptação ao meio aquático com aumento progressivo da sobrecarga.

As sessões de natação foram realizadas em tanques de amianto com 100 cm de comprimento, 70 cm de largura e 60 cm de altura. A profundidade foi mantida a 40cm, para que os animais não pudessem apoiar a cauda no fundo do tanque. A temperatura da água foi mantida em $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante a realização do exercício, por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura do ratos.

1.4.3. Avaliação dos animais e sacrifício

Ao final do período experimental, os ratos de cada grupo foram mantidos em repouso por 48 horas em relação à última sessão de exercícios, sem jejum prévio. O sacrifício foi realizado por decapitação em guilhotina, com prévia anestesia em câmara de CO₂. O sangue coletado foi centrifugado à 3000 rpm por 10 minutos e a partir do soro foi realizada a análise de glicemia: a glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase (HENRY, CANNON & WILKEMAN 1974).

Baseado nos valores obtidos na análise de glicemia, três animais de cada grupo foram selecionados para a realização das análises histológicas e histoquímicas. Os animais selecionados foram aqueles cujos valores de glicemia foram considerados os mais representativos dentro de seus grupos. Destes indivíduos foram então coletadas as amostras para a realização das análises histológicas e histoquímicas.

1.4.4. Histologia/Histoquímica

Após o sacrifício, foram coletadas partes do ventrículo esquerdo, que foram fixados em Bouin. Os tecidos foram incluídos em historesina e cortados em micrótomo. Os cortes foram, então, submetidos às seguintes técnicas histoquímicas de coloração:

- Hematoxilina-Eosina (rotina): os cortes foram hidratados, submetidos a hematoxilina (10 min), lavados e submetidos a eosina (5 min). Em seguida, os cortes foram lavados e montados em bálsamo do Canadá (Adaptado de JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

- Ácido Periódico de Schiff (PAS - polissacarídeos em vermelho púrpura): os cortes foram submetidos a solução do Ácido Periódico 0,4% por 10 minutos, lavados em água destilada e colocados no reagente de Schiff (1 hora no escuro). Em seguida, o material foi lavado em água sulfurosa (3 minutos), água corrente (20 minutos) e montado em bálsamo do Canadá (Adaptado de JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

- Picrosirius-hematoxilina (fibras colágenas): Os cortes foram submetidos à solução de Picrosirius (60 minutos a 60°C), lavados em água, submetidos a

hematoxilina (10 minutos), lavados novamente em água, e montados com bálsamo do Canadá (Adaptado de JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

- Prata Amoniacal (fibras reticulares): os cortes foram colocados em água destilada, oxidados em permanganato de potássio a 2% por 3 minutos e em seguida lavados em água corrente por 2 minutos. Após isso, foram diferenciados com solução de metabissulfito a 2% por 3 minutos, lavados em água corrente por 2 minutos, e banhados na solução de sulfato férrico amoniacal por 3 minutos. Os cortes foram então lavados em água corrente por 2 minutos e colocados em água destilada (2 vezes de 30 segundos). Seqüencialmente, foram impregnados em solução de prata amoniacal diluída a 1:8, durante 20 minutos. Os cortes foram então lavados em água destilada por 3 vezes, com duração de 20 segundos cada vez. O material foi, então, colocado na solução de formaldeído por 9 minutos e, logo depois, lavado por 3 minutos em água corrente e banhado em água destilada. Em seguida, foi executada a viragem em cloreto de ouro a 0,2% por 15 minutos. O material foi então mergulhado em água destilada, reduzido na solução de metabissulfito de potássio por 3 minutos, fixado em solução de tiosulfato de sódio a 2% por 3 minutos, lavado em água corrente por 2 minutos, e montado em bálsamo do Canadá (adaptado de JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

Após a reação do material a partir das técnicas histoquímicas listadas e a montagem em bálsamo do Canadá, o material foi fotografado em fotomicroscópio LEICA, modelo DM2000, com câmera LEICA, modelo DFC280, com o auxílio do programa IM50. Foi realizada uma análise qualitativa das lamínas, baseada na intensidade da reação de cada técnica com a musculatura ventricular.

1.5.RESULTADOS

A Tabela 1(encontrada no Apêndice) apresenta a análise qualitativa referente às técnicas histoquímicas realizadas, para cada indivíduo de cada grupo. Baseado nessa análise qualitativa, foram escolhidos os indivíduos cujas intensidades de reação representavam a maioria dentro do seu grupo e estes foram então fotografados.

1.5.1. Hematoxilina-Eosina

A técnica de Hematoxilina-Eosina foi utilizada para avaliar os aspectos gerais do tecido muscular cardíaco (Figura 1) e através desta técnica foi possível observar algumas alterações estruturais no tecido. O grupo CS apresentou uma organização normal das fibras musculares, sendo claramente observados os Discos Intercalares. O grupo CT apresentou um aspecto muito próximo ao normal, sendo observado apenas uma leve compactação das fibras musculares, quando comparado com o grupo CS. O grupo CT apresentou maior vascularização quando comparado ao grupo CS. Além disso, o grupo CT apresentou uma maior marcação dos Discos Intercalares quando comparado ao grupo CS.

Em relação aos grupos controles, o grupo DS apresentou uma notável desorganização tecidual. As fibras musculares do grupo DS não apresentam a mesma compactação tecidual observada nos grupos controle, além de apresentar uma rede de capilares bastante tortuosa. Além disso, observa-se uma leve alteração na intensidade da reação do citoplasma das fibras do grupo DS, bem como uma leve alteração dos núcleos, menores e mais corados. As fibras musculares apresentaram um diâmetro levemente menor nos indivíduos do grupo DS em relação aos grupos CS e CT.

Os indivíduos do grupo DT apresentaram as fibras musculares com organização e diâmetro muito próximo a das fibras dos grupos controle. As fibras se apresentaram de maneira muito mais organizada e compacta neste grupo do que no grupo DS. A presença dos discos intercalares evidentes se aproxima muito a condição observada no grupo CT, bem como a elevada presença de capilares, porém, estes se apresentam de maneira bastante linear e organizada, diferentemente do modo tortuoso na qual são encontrados estes vasos no grupo DS. Os núcleos das fibras musculares dos indivíduos do grupo DT são menores, mais compactos e corados do que os observados nos grupos controle, porém estas características os aproximam dos núcleos observados nos indivíduos do grupo DS.

1.5.2. Ácido Periódico de Schiff (PAS)

A técnica para evidenciar polissacarídeos (PAS) mostrou reação muito próxima em todos os grupos (Figura 2), sendo menos evidente em CS.

Através desta técnica pode-se observar que os indivíduos do grupo DS apresentaram uma reação levemente mais intensa do que a reação observada nos

demaís grupos, sendo que este aumento leve na reação foi observado tanto no sarcoplasma quanto no endomísio. Esta reação levemente aumentada evidencia um acúmulo de carboidratos tanto no interior das fibras, quanto no endomísio.

Os indivíduos dos grupos controles apresentaram intensidade de reação praticamente idêntica. Em ambos os grupos (CS e CT) a reação foi mais evidente no endomísio, sendo que o interior das fibras musculares apresentou reação pouco intensa.

Os animais do grupo DT apresentaram reação muito próxima ao observado para os grupos controle. Esta diminuição da reação, em relação aos indivíduos do grupo DS, foi melhor observada no interior das células musculares, porém não foi tão evidente quando se observa o endomísio.

A técnica de PAS, assim como em H.E., evidenciou também a maior presença de vasos capilares nos animais dos dois grupos treinados (CT e DT).

1.5.3. Picrossírius-Hematoxilina

A técnica de Picrossírius-Hematoxilina (Figura 3) para evidenciar fibras colágenas mostrou um leve aumento na concentração destas fibras no endomísio da musculatura cardíaca dos animais do grupo DS, quando comparado com os demais grupos, evidenciando uma possível deposição deste tipo de fibras no endomísio dos animais do grupo DS.

O grupo diabético treinado (DT) apresentou uma reação muito próxima à observada para os grupos controles (CS e CT), evidenciando o que pode ter sido uma leve recuperação ou prevenção da deposição de colágeno observado nos animais do grupo DS.

Os grupos controle não apresentaram grandes diferenças na reação com a técnica quando comparados entre si, não havendo alteração na quantidade de colágenos totais pela ação do exercício físico.

1.5.4. Prata Amoniacal

A técnica de Prata Amoniacal para evidenciar fibras reticulares não apresentou diferenças notáveis entre os indivíduos dos quatro grupos (Figura 4). Os animais do grupo diabético (DS) apresentaram reação levemente menor quando comparadas com os animais dos grupos controle (CS e CT) e do grupo DT.

Quando comparados entre si, os grupos controle não apresentaram nenhuma diferença expressiva. O mesmo foi observado comparando-se os animais dos grupos controle (CS e CT) com o grupo diabético treinado.

1.6.DISSCUSSÃO

O Diabetes mellitus é classificado como um grupo de moléstias metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, sendo estas associadas, em longo prazo, com dano, disfunção ou deficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos.

É clássica a eficácia da prática regular de atividade física para prevenção primária e secundária de numerosas doenças crônicas dentre as quais encontra-se o diabetes. Tal efeito é alcançado pelas várias modificações causadas pelo exercício no organismo como a redução da mobilização do tecido adiposo, e possível melhora da captação e utilização dos ácidos graxos livres nos indivíduos diabéticos (LUCIANO, 1996). No presente trabalho, foi investigado o efeito da atividade física sobre as possíveis alterações morfológicas causadas pelo diabetes na musculatura ventricular esquerda.

A análise da técnica Hematoxilina-Eosina (HE) mostrou uma organização normal da musculatura ventricular nos animais dos grupos saudáveis (CS e CT). Entretanto, as fibras musculares nos indivíduos do grupo CT se apresentaram de forma ligeiramente mais compacta e com diâmetro levemente maior quando comparado com os animais do grupo CS, DS e DT. Esta leve alteração se deve provavelmente às modificações estruturais causadas pela atividade física, levando a um maior desenvolvimento da musculatura dos animais treinados (hipertrofia) tendo em vista o maior esforço desta. No exercício dinâmico (como a natação) se observa o aumento da frequência cardíaca, levando a sobrecarga do coração que se reflete na hipertrofia ventricular esquerda (NEGRÃO & BARRETTO, 2006), o que seria uma possível explicação para as alterações observadas.

A sobrecarga de atividade da musculatura cardíaca também explicaria a maior vascularização observada no miocárdio dos animais treinados (CT e DT), tendo em vista que a maior atividade demanda maior quantidade de oxigenação da musculatura para que haja a manutenção da contração. Além disso, a sobrecarga

sobre a musculatura cardíaca pode ser considerada responsável por outra alteração observada nos indivíduos treinados, a maior presença de discos intercalares (DI). Os DI são complexos juncionais exclusivos da musculatura cardíaca, encontrados na interface de células musculares adjacentes, sendo encontrados nestes complexos três tipos de especializações juncionais principais: zônula de adesão, desmossomos e junções comunicantes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Possivelmente, a quantidade elevada de complexos juncionais observada nos animais treinados se deve à maior necessidade de manter as fibras musculares unidas, devido à maior força mecânica a que estavam sujeitas.

Apesar de não terem sido encontrados sinais de necrose, fibrose e de inflamação, sabe-se que estas são consideradas alterações comuns no tecido muscular cardíaco de diabéticos. Estudos no miocárdio de ratos diabéticos induzidos por aloxana mostraram sinais de edemas, proliferação de histiócitos e inflamação após 26 semanas de experimentação (MIR & DARZI, 2009). Além disso, estudos demonstram que a ocorrência de apoptose e necrose no tecido atrial é maior em pacientes diabéticos do que em pacientes saudáveis, bem como a presença de fibrose (CHOWDHRY, VOHRA & GALIÑANES, 2007).

A desorganização das fibras observada no grupo DS pode ser um estágio inicial que irá culminar em um quadro de inflamação tecidual, e possível necrose destas células. Estas modificações histopatológicas podem ser atribuídas aos efeitos causado pela prolongada hiperglicemia a que se encontram sujeitos os animais diabéticos, a qual induz a alterações degenerativas no tecido devido possivelmente à presença de radicais livres de oxigênio (OBERLEY, 1988) e ao estresse oxidativo por eles causados.

Os animais do grupo DT apresentaram uma melhor organização e compactação das fibras musculares se comparado ao resultado observado no grupo DS. A atenuação da hiperglicemia causada pela atividade física (LUCIANO & LIMA, 1997) é, possivelmente, responsável por esta melhora em relação ao grupo DS, visto que a hiperglicemia é a principal causa por trás do estresse oxidativo e pelos conseqüentes danos no tecido.

A técnica para a marcação de polissacarídeos (PAS) evidenciou um leve aumento na concentração destes polissacarídeos tanto no sarcoplasma quanto no endomísio dos animais do grupo DS quando comparado com os animais dos grupos controle (CS e CT). Uma possível explicação para a maior reação é a baixa captação de

glicose que se observa nestes animais diabéticos, devido à ausência quase total de insulina. A insulina atua sobre receptores encontrados na membrana plasmática, desencadeando uma série de reações que resultam na mobilização de transportadores de glicose (GLUT), armazenados em vesículas no retículo endoplasmático (NEGRÃO & BARRETTO, 2006), para a membrana da célula, possibilitando a captação de glicose pela célula. A ausência da insulina gera, por uma falha nesta mobilização, a baixa captação de glicose pelas células musculares. Além disso, o aumento dos ácidos graxos livres no miocárdio destes animais diabéticos leva a criação de um acúmulo de glicogênio no miocárdio (LUCIANO & LIMA, 1997). O acúmulo de glicogênio, que é PAS positivo, levaria assim a uma maior reação com a técnica de PAS nos indivíduos diabéticos sedentários.

Quanto ao endomísio, a reação mais intensa possivelmente se deve à deposição de colágeno nesta região sendo que esta deposição pode ter sido tanto de colágeno do tipo III (COSSON & KEVORKIAN, 2003), rico em carboidratos e que reage positivamente com o PAS (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004), como de colágeno do tipo IV, também PAS positivo (FEENER & KING, 1997).

A recuperação do grupo DT a níveis muito próximos aos controles, observada pela diminuição da reação com o PAS, pode estar relacionada com o fato de que os estímulos contráteis levam à translocação de GLUT4 à membrana plasmática pela via sinalizadoras da AMPK (MACHADO, SCHAAAN & SERAPHIN, 2006), fazendo com que houvesse uma melhora na captação da glicose. A AMPK é uma enzima importante para a manutenção energética intracelular, especificamente durante situações de estresse, como o exercício físico. Uma vez ativada a AMPK induz a fosforilação e inibe a atividade da acetil CoA carboxilase (ACC). Evidências sugerem que essa via de sinalização participa de eventos metabólicos importantes como a lipólise, metabolismo de lipídios, transporte de glicose (PÁDUA et al, 2008), porém o papel da ativação da AMPK na regulação da captação de glicose pelo miocárdio não é conhecida (RUSSEL 3rd et al, 1999).

A técnica Picrossírius-Hematoxilina, utilizada para evidenciar fibras colágenas, apresentou reação levemente aumentada no endomísio dos animais do grupo DS, em comparação ao observado nos grupos controle. Esta marcação confirma que uma das possíveis causas da maior reação observada no grupo DS pela reação de PAS, possa ser pela deposição de colágeno.

As fibras de colágeno I e III são considerados os principais componentes estruturais do interstício do miocárdio e, a quantidade aumentada ou estrutura alterada deste componente fibrilar, pode influenciar negativamente as contrações sistólicas e diastólicas. O excesso de colágeno pode isolar os miócitos e conseqüentemente romper a ordenada transmissão da força contrátil entre eles (JALIL et al, 1989). As alterações histopatológicas encontradas no miocárdio de pacientes diabéticos incluem hipertrofia do miócitos e fibrose intersticial e perivascular. As regiões de fibrose intersticial são compostas em grande parte por fibras colágenas (SHIMIZU et al, 1993). O aumento de fibras colágenas observado no grupo DS pode ser indicativo de um processo inicial de fibrose no miocárdio, o que a longo prazo poderia causar graves disfunções cardíacas.

Shimizu e cols. (1993) mostrou também que há um substancial acúmulo de colágenos dos tipos I, III e VI no interstício do miocárdio de indivíduos diabéticos, em contrapartida não houve acúmulo de colágeno dos tipos IV e V. Além disso, este trabalho mostrou que a fibrose intersticial no miocárdio é significativamente maior em indivíduos diabéticos e que boa parte desta fibrose é composta por fibras colágenas.

A presença de fibras de colágeno no grupo DT apresentou aspectos muito próximos aos observados para os animais dos grupos controle (CS e CT), mostrando que possivelmente o exercício físico auxiliou na prevenção das alterações prejudiciais causadas pelo diabetes.

A técnica de Prata Amoniacal evidencia fibras reticulares, ricas em colágeno do tipo III, porém a baixa especificidade da técnica não nos permite fazer análises mais profunda sobre o colágeno tipo III, um dos componentes mais afetados pelo diabetes. A partir desta técnica foi possível observar que os grupos apresentaram colorações muito próximas, porém pôde-se notar um leve aumento na intensidade de reação no grupo DS, em comparação com os grupos controle (CS e CT). O grupo DT não acompanhou este aumento, apresentando aspecto idêntico aos grupos CS e CT. Este resultado mostra que pode ter ocorrido uma deposição de colágeno do tipo III nos animais do grupo DS, representada pelas fibras evidenciadas pela reação, possivelmente devido a um estado inicial de fibrose, que poderia ter progredido, atingindo estágio avançados, como observado em humanos por Shimizu e cols, (1993).

Em contrapartida, estudo realizado com modelos animais de diabetes induzidos por estreptozotocina, não encontraram alterações na quantidade de colágeno III,

após 18 semanas de diabetes (NEMOTO et al, 2006). Este mesmo estudo aponta para um aumento na presença de laminina e colágeno do tipo IV, constituintes da membrana basal de capilares, em capilares de animais diabéticos, bem como para um aumento da tortuosidade destes capilares, assim como observado nos capilares do grupo DS. Apesar da grande quantidade de estudos relacionados com as alterações causadas pelo diabetes no balanço dos tipos de colágeno presente na musculatura cardíaca, este ainda carece de maiores explicações.

O protocolo de atividade física realizado neste experimento se mostrou eficiente principalmente na prevenção de boa parte dos efeitos danosos causados pelo diabetes do Tipo I, possivelmente devido à melhora induzida pelo exercício nas condições metabólicas dos animais diabéticos.

1.7.CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados, pode-se concluir que a prática de exercícios físicos regulares pode apresentar um papel importante na possível prevenção, ou mesmo na recuperação, das alterações negativas causados pelo diabetes, em um modelo animal, devido à significativa melhora no aspecto metabólico dos animais diabéticos. Porém, é sempre válido lembrar que há uma grande limitação em simplesmente aplicar os resultados deste estudo para as alterações causadas pelo diabetes em humanos.

1.8. LITERATURA CITADA

ALEXANDER, C. M.; LANDSMAN, P. B.; TEUTSCH, S.M. Diabetes mellitus, impaired fasting glucose, atherosclerotic risk factors, and prevalence of coronary heart disease. **Am. J. Cardiol.** v.86, p.897-902, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical Practice Recommendations. **Diabetes Care**, v. 26, s.1, s1-156, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Consensus development conference on the diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, p.1551-9, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2006. **Diabetes Care**, v. 29, s4-s42, 2006.

BAN, R. C.; TWIGG, S. M. Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. **Vasc. Health and Risk Management**, v.4(3), p.575-596, 2008.

BENETTI, M. Atividade Física e Diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva**, São Paulo, v. 2, p. 75-78, 1996.

CHOWDHRY, M. F.; VOHRA, H. A.; GALIÑANES, M. J. Diabetes increases apoptosis and necrosis in both ischemic and nonischemic human myocardium: Role of caspases and poly-adenosine diphosphate-ribose polymerase. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v.134, p.124-31, 2007.

COSSON, S.; KEVORKIAN, J. P. Left ventricular diastolic dysfunction: na early sign of diabetic cardiomyopathy? **Diabetes Metab.**, v. 29, p.455-66, 2003.

DE ANGELIS, K.; PUREZA, D. Y. da; FLORES, L. J. F.; RODRIGUES, B.; MELO, K. F. S.; SCHAAN, B. D.; IRIGOYEN, M. C. Efeitos Fisiológicos do Treinamento

Físico em Pacientes Portadores de Diabetes Tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.50(6), p.1005-10013, 2006.

FEENER, E. P., KING, G. L. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. **Lancet.**, v.350, p. 9-13, 1997.

FREITAS, A.M.; CORRÊA, Z.M.S.; MARCON, I.M.; SCHIMIDT, H.A. Proteinuria como um fator de risco para retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.65, n.1, São Paulo, 2002.

GOMES, R. J., LEME, J. A. C. A., MOURA, L. P., ARAÚJO, M. B., ROGATTO, G. P., MOURA, R. F., LUCIANO, E., MELLO, M. A. R. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. **Cell Biochem. Funct.**, v.27, p.199–204, 2009.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WILKEMAN, J. (2ed) **Clinical chemistry, principles and techniques**. New York: Harper and Harper Row Publishes, 1974.

JALIL, J. E.; DOERING, C. W.; JANICKI, J. S.; PICK, R.; SHROFF, S. G.; WEBER, K. T. Fibrillar Collagen and Myocardial Stiffness in the Intact Hypertrophied Rat Left Ventricle. **Circ. Res.**, v. 64, p. 1041-1050, 1989.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia Básica**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA & JUNQUEIRA. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983.

KRAUS, W.E. HOUMARD, J.A.; DUCHA, B.D.; KNETZGER, K.J.;WHARTON, M.B. McCARTNEY J.S. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **N. Engl. J. Med.**, v. 374, p. 1483-92, 2002.

LEON, A. S. Exercise testing and exercise prescription for special cases. **Diabetes**, p.115-133, 1987.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus induzido pela aloxana em ratos. Estudo Clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n.2, 132-42, 2003.

LI, S.; CULVER, B.; REN, J. Benefit and risk of exercise on myocardial function in diabetes. **Pharmacological Research**, v.48, p.127–132, 2003.

LUCIANO, E. Atividade física e metabolismo lipídico em ratos diabéticos experimentais. **Rev. Bras. Ativ. Fis. Saúde**, v.1, n.4, p.19-26, 1996.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E.M.; CARVALHO, C.R.O.; CARVALHEIRA, J.B.C.; PERES, S.B.; REIS M.A.B.; SAAD, M.J.A.; BOSCHERO, A.C.; VELLOSO, L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur. J. Endocrinol.**, v.147, p.149-157. 2002.

LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, Botucatu, v. 18, p.47-60, 1997.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIN, P. M. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.50(2), p. 177-189, 2006.

MIR, S. H & DARZI, M. M. Histopathological abnormalities of prolonged alloxan-induced diabetes mellitus in rabbits. **Int. J. Exp. Path.**, v.90, p.66–73, 2009.

NEGRÃO, C. E.; BARRETTO, A. C. P. **Cardiologia do exercício: Do atleta ao cardiopata**. 2ª Edição. Barueri, SP: Editora Manole, 2006.

NEMOTO, O.; KAWAGUCHI, M.; YAOITA, H.; MIYAKE, K.; MAEHARA, K.; MARUYAMA, Y. Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Circ. J.**, v. 70, p. 327 –334, 2006.

NORBY, F.L.; WOLD, L. E.; DUAN, J.; HINTZ, K. K.; REN, J. IGF-1 attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 283 (4), p. E658-66, 2002.

OBERLEY, L.W. Free radicals and diabetes. **Free Radic. Biol. Med.** v. 5, p. 113–124, 1988.

OLIVEIRA, E.F.; GRANJA, L.A.; WAJCHENBERG, B.L. Cardiopatía do diabético. **Rev. Assoc. Bras.**, v.2, n. 3, p. 103-15, 2000.

RUSSEL, R. R., 3rd; BERGERON, R.; SHULMAN, G. I.; YOUNG, L. H. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.277, p.H643–H649, 1999.

SHIMIZU, M.; UMEDA, K.; SUGIHARA, N.; YOSHIO,H.; INO, H.; TAKEDA, R.; OKADA, Y.; NAKANISHI, I. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. **J. Clin. Pathol.**, v.46, p. 32-36, 1993.

SMANIO, P. Doença Cardiovascular em Mulheres Diabéticas Assintomáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.51, n.2, p. 305-311, 2007

TAKESHITA, M., et al. Ultrastructural study of capillary and myocytic changes in the masseter and heart of KK-A-y mice. **Journal of Electron. Microscopy.**, v.46, n.5, p.413-23, 1997.

TOMITA, M. et al. Mitochondrial respiratory impairment in streptozotocin-induced diabetic rat heart. **Japanese Circulation Journal.**, v. 60, n29, p.673-82, 1996.

VADLAMUSDI, S. V., RODGES, R. L. & MCNEILL, J. H. The effect of chronic alloxan and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart performance. **Can. Physiol. Pharmacol.**, v.60, p.902-11, 1982.

WÄGNER, A.M., MARTINEZ-RUBIO, A., ORDONEZ-LLANOS J., PEREZ-PEREZ, A. Diabetes mellitus and cardiovascular disease. **European Journal of Internal Medicine**, v.13, p.15–30, 2003.

WEI, M.; ONG, L.; SMITH, M. T.; ROSS, F. B.; SCHMID, K.; HOEY, A. J.; BURSTOW, D.; BROWN, L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart, lung and circulation**, v. 12, p.44-50, 2003.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetics: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-53, 2004.

ZHU, D.; KIM, Y.; STEFFES, M.W., et al. Glomerular distribution of type IV collagen in diabetes by high resolution quantitative immunochemistry. **Kidney Int.**, v.45, p.425-33, 1994.

1.9. APÊNDICE

Figuras e tabelas

Tabela 1. Caracterização qualitativa dos resultados obtidos nas técnicas histoquímicas.

Técnica Histoquímica/Rato	CS1	CS2	CS3	CT1	CT2	CT3	DS1	DS2	DS3	DT1	DT2	DT3
PAS-Endomísio	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
PAS-Fibra	++	+	+	++	+	+	++	++	++	+	+	+
Picrossírius	++	+	++	++	++	++	+++	++++	++++	+++	++	++
Prata Amoniacal	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(+) Reação fraca com a técnica de coloração; (++) Reação moderada com a técnica de coloração; (++) Reação forte com a técnica de coloração; (+++++) Reação intensa com a técnica de coloração;

Figura 1 – Miocárdio submetido técnica HE (400x). Observe a visível desorganização das fibras no canto superior direito de DS e o aumento dos núcleos em CT; As setas (→) indicam discos intercalares; C-capilar sanguíneo; CS-Control Sedentário; CT-Control Treinado; DS-Diabético Sedentário; DT-Diabético Treinado.

Figura 2 – Miocárdio submetido técnica PAS (400x). Observe o significativo aumento da intensidade de reação no endomísio do grupo DS. As setas (➡) indicam discos intercalares; C-Capilar sanguíneo; CS-Control Sedentário; CT-Control Treinado; DS-Diabético Sedentário; DT-Diabético Treinado.

Figura 3 – Miocárdio submetido técnica Picrosirius-Hematoxilina (400x). Observe o aumento da intensidade da reação no endomísio em DS. As setas (↗) indicam discos intercalares; As cabeças de setas (▶) indicam as fibras colágenas; C-Capilar sanguíneo; CS-Controlado Sedentário; CT-Controlado Treinado; DS-Diabético Sedentário; DT-Diabético Treinado.

Figura 4 – Miocárdio submetido técnica Prata Amoniocal (400x). Observe a intensidade de reação bastante similar nos quatro grupos. As setas (➡) indicam as fibras elásticas. VS= Vaso Sangüíneo; CS-Controlle Sedentário; CT-Controlle Treinado; DS-Diabético Sedentário; DT-Diabético Treinado.

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS ALTERAÇÕES
CAUSADAS PELO DIABETES EXPERIMENTAL NA
MUSCULATURA VENTRICULAR ESQUERDA: EFEITOS DO
EXERCÍCIO FÍSICO**

CAPÍTULO 2

2.1.RESUMO

O Diabetes Mellitus, síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da resistência à sua ação, tem o número de casos aumentando significativamente nas últimas décadas. Experimentalmente, o diabetes pode ser induzido de várias formas, por exemplo com a utilização de hormônios como glucagon, somatotropina, glicocorticóides, adrenalina, entre outros, sendo que para a indução do diabetes tipo I permanente podem ser utilizadas drogas específicas como a Aloxana. A doença cardiovascular é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes tipos I e II, acometendo cerca de metade de todos os diabéticos. Estudos apontam ainda para a existência de uma cardiomiopatia diabética específica que contribui para o aumento do risco de morte por problemas cardíacos para os dois tipos de diabetes, independente de outros fatores como problemas macrovasculares. A diminuição da capacidade de contração das fibras musculares cardíacas, característica da cardiomiopatia diabética, pode também estar relacionada com alterações estruturais e bioquímicas. Atualmente, o exercício físico regular tem sido considerado como umas das principais abordagens

no tratamento do diabetes do tipo I, podendo levar a uma melhora no desempenho cardíaca atingindo números muito próximos ao de corações não-diabéticos. Este estudo tem por objetivo avaliar as alterações ultraestruturais causadas pelo diabetes na musculatura ventricular esquerda de ratos diabéticos, bem como o efeito do exercício físico na recuperação ou prevenção destas alterações. Para isso, foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar, divididos em quatro grupos: diabéticos sedentários (DS), diabéticos treinados (DT), controle sedentário (CS) e controle treinado (CT), sendo que os grupos treinados realizaram um protocolo de treinamento físico. O diabetes experimental do tipo I foi induzido por meio da aplicação de aloxana monoidratada Sigma (35 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5. O protocolo de treinamento consistiu de natação por 60 minutos diários, 5 dias por semana, durante 8 semanas consecutivas e com sobrecarga atada ao tórax, correspondendo à Máxima Fase Estável do Lactato (MFEL). Os animais do grupo DS apresentaram grande desorganização das miofibrilas, miofibrilas em degeneração e mitocôndrias com matriz mitocondrial alterada, quando comparados aos animais dos grupos controles (CS e CT). Os animais do grupo DT apresentaram organização tecidual muito próxima à observada nos controles, porém exibiram mitocôndrias com algumas alterações morfológicas em decorrência do exercício. As mesmas alterações foram observadas em CT. O exercício físico regular se mostrou benéfico em prevenir as alterações morfológicas, decorrentes do diabetes experimental, analisadas neste trabalho.

2.2.INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus, síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da resistência à sua ação (NEGRÃO & BARRETTO, 2006), tem o número de casos aumentando significativamente nas últimas décadas. Dados da estimativa da Organização Mundial de Saúde mostram que em 2003 cerca de 177 milhões de pessoas no mundo eram diabéticas, e que em 2030 o número de pessoas acometidas pela doença deve chegar a 366 milhões (WILD et al., 2004). No Brasil, o diabetes atinge cerca de 7% da população (OLIVEIRA, 2000), sendo considerado pelo Ministério da Saúde um dos maiores problemas de saúde pública atualmente.

Segundo a Associação Americana de Diabetes o diabetes pode ser classificado da seguinte maneira (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006):

- Diabetes mellitus Tipo 1 (insulino-dependente): Quando há destruição das células β -pancreáticas, causando um quadro de deficiência absoluta de insulina. Pode ter causa autoimune ou idiopática.

- Diabetes mellitus Tipo 2 (não insulino-dependente): Quando há vários graus de deficiência e resistência a ação da insulina.

- Diabetes Gestacional: Causada por alterações hormonais e metabólicas durante a gravidez, que induzem a um quadro de resistência à insulina.

- Outros tipos de diabetes: São causados por problemas genéticos, doenças pancreáticas ou endócrinas, infecções virais, dentre outras causas.

Experimentalmente, o diabetes pode ser induzido de várias formas por exemplo, com a utilização de hormônios como glucagon, somatotropina, glicocorticóides, adrenalina, entre outros. Para a indução do diabetes tipo 1 permanente podem ser utilizadas drogas específicas dentre as quais destacam-se a Aloxana (ALX) e a Estreptozotocina (STZ), que destroem seletivamente as células beta-pancreáticas gerando um quadro de hipoinsulinemia permanente (LERCO et al., 2003; WEI et al., 2003).

O indivíduo diabético apresenta diminuição na utilização de glicose pelas suas células e, como consequência, ocorre aumento da concentração de glicose circulante (hiperglicemia). Outros sintomas também podem se manifestar, dentre os quais a poliúria, a polidipsia, a glicosúria (presença de glicose na urina), a fome exagerada (polifagia) e o aumento na presença de corpos cetônicos na urina e no sangue (LEON, 1987).

A hiperglicemia é o principal fator, a nível celular, responsável pela promoção e progressão das doenças vasculares causadas pelo diabetes. Uma característica das doenças vasculares causadas pelo diabetes é o aumento da espessura da membrana basal (FEENER & KING, 1997).

A doença cardiovascular é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes tipos I e II, acometendo cerca de metade de todos os diabéticos (SMANIO, 2007). Se forem comparados aos não-diabéticos, os diabéticos apresentam mais eventos cardíacos e maior frequência de isquemia silenciosa (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1998).

Estudos apontam ainda para a existência de uma cardiomiopatia diabética específica (FRIEDMAN, 1989; LEDET, 1976; PIERCE et al, 1983) que contribui para o aumento do risco de morte por problemas cardíacos para os dois tipos de

diabetes, independente de outros fatores como problemas macrovasculares. Essa cardiomiopatia acarreta numa disfunção da diástole e da sístole, distúrbios esses caracterizados pela contração e pelo relaxamento prolongados e em menor velocidade e pela redução do poder de contração de todo o coração, do tecido muscular cardíaco e de miócitos ventriculares isolados (LI, CULVER e REN, 2003). Embora os processos relacionados a essa patologia não sejam ainda bem conhecidos, especula-se que estes estejam ligados a redução da produção de energia devido à diminuição da respiração mitocondrial e da atividade das desidrogenases, a disfunção nas proteínas regulatórias e contráteis, bem como o prejuízo da homeostase de cálcio intracelular (LI, CULVER e REN, 2003).

A diminuição da capacidade de contração das fibras musculares cardíacas, característica da cardiomiopatia diabética, pode também estar relacionada com alterações estruturais e bioquímicas (VADLAMUSDI et al., 1982). Em fibras musculares estriadas de indivíduos saudáveis, as mitocôndrias são encontradas intimamente associadas às gotas de lipídios sendo que ambas se dispõem entre as miofibrilas, porém quando observou-se as fibras de indivíduos diabéticos foram encontrados miofilamentos desorganizados e desaparecimento de linhas Z (TAKESHITA et al., 1997), miofibrilas anormais com vários graus de degeneração, e mitocôndrias intumescidas e com arranjo anormal e do acúmulo de gotas de lipídeos (TOMITA et al., 1996).

As alterações morfológicas no coração diabético incluem a hipertrofia dos miócitos, o aumento da matriz colágena, fibrose intersticial entre outras. Essas alterações são, provavelmente, conseqüências do metabolismo alterado de glicose e ácidos graxos no miocárdio. Além disso, a hiperglicemia crônica leva a produção de produtos finais de glicação avançadas (AGEs) e espécies reativas de oxigênio (ROS) que afetam os canais iônicos, a homeostase do cálcio, bem como problemas de disfunção contrátil (PICCINI et al, 2004). Vários trabalhos reportaram outras alterações no miocárdio de indivíduos diabéticos como a diminuição do retículo sarcoplasmático e dos túbulos T, o aumento do tamanho das mitocôndrias (AYAZ et al, 2002) e alterações nas proteínas contráteis do miocárdio (TAKEDA, 2009).

As mitocôndrias são as organelas mais abundantes nas células musculares cardíacas, sendo responsáveis pela maior parte da energia utilizada pelo miocárdio via fosforilação oxidativa (YANG et al 2009). Estudos mostram a presença de várias alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias dos indivíduos diabéticos. A

hiperglicemia do diabético estimula o sistema de transporte de elétrons das mitocôndrias, levando ao aumento na produção de ROS que danificam o DNA mitocondrial (TAKEDA, 2009) causando alterações em seu funcionamento. Pesquisas mostram ainda que a capacidade oxidativa mitocondrial se mostra reduzida no diabetes tipo I (PIERCE & DHALLA, 1985; TANAKA, KONNO e KAKO, 1992; LASHIN & ROMANI, 2004). Já a respiração mitocondrial se mostrou reduzida em ratos obesos com diabetes tipo II, além da ocorrência da baixa expressão de proteínas que participam da fosforilação oxidativa (PIERCE & DHALLA, 1985), alterações que contribuem para a disfunção cardíaca, pois reduzem a produção de ATP podendo levar a diminuição das reservas de fosfato no miocárdio, contribuindo para a redução da contração deste (VEKSLER, MURAT & VENTURA-CLAPIER, 1991).

Atualmente, o exercício físico regular, juntamente com a insulinoterapia e o planejamento alimentar, tem sido considerado como umas das principais abordagens no tratamento do diabetes do tipo I. O tratamento tem como objetivo aproximar as condições metabólicas do indivíduo com diabetes tipo I ao estado fisiológico normal, prevenindo ou retardando as complicações crônicas do diabetes. (DE ANGELIS et al, 2006).

O exercício induz adaptações metabólicas relevantes, tais como o aumento na utilização de glicogênio muscular durante o exercício físico, aumento do número e tamanho das mitocôndrias musculares, aumento da atividade das enzimas-chave da mobilização e oxidação dos lipídeos e aumento da sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina (KRAUS et al., 2002; LUCIANO et al. 2002). O exercício físico promove ainda alterações agudas e crônicas nos sistemas neuroendócrino e cardiovascular (BENETTI, 1996).

Além disso, tanto indivíduos diabéticos como indivíduos não diabéticos apresentam melhor sensibilidade à insulina induzida pelo exercício, efeitos estes causados por uma serie de adaptações do organismo tais como: aumento da densidade capilar, aumento da expressão e translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, aumento das fibras musculares mais sensíveis à ação da insulina, dentre outros (DE ANGELIS et al, 2006).

2.3.OBJETIVOS

Através da análise das fibras musculares cardíacas e de suas mitocôndrias, este trabalho tem como objetivo avaliar danos ultraestruturais causados pelo diabetes experimental na musculatura ventricular esquerda de ratos diabéticos aloxânicos, bem como avaliar os efeitos do exercício físico moderado sobre a possível recuperação ou prevenção dessas alterações.

2.4.MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Mérito Científico do Centro Universitário Hermínio Ometto - UNIARARAS (protocolo número 634/2008).

Foram utilizados 38 ratos adultos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus* Wistar), machos, com aproximadamente 70 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu. Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, medindo 37 x 31 x 16 centímetros, e mantidos à temperatura ambiente de 25° C, com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, alimentados com ração balanceada Purina® padrão e água “*ad libitum*”.

2.4.1. Indução do diabetes e delineamento experimental

Para indução do diabetes experimental, os animais foram anestesiados moderadamente com éter etílico e, em seguida, receberam Aloxana monoidratada Sigma (35 mg/kg de peso corporal), dissolvida em tampão citrato 0,01M, pH 4,5, injetada na veia peniana. Após este procedimento, os ratos foram recolocados nas gaiolas, recebendo no primeiro dia pós-aloxana, solução de água e glicose (15%), além de ração (LUCIANO & LIMA, 1997). Cinco dias após a administração da droga, foi realizado um teste de glicemia para comprovação do estado diabético dos animais, sendo considerados diabéticos apenas aqueles ratos que apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg por 100 mL de sangue, sendo descartados os demais, com a glicemia inferior a 200 mg%. Os animais diabéticos, juntamente com os animais não induzidos (controles) foram então distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

-Controle Sedentário (CS) - ratos saudáveis que não realizaram exercícios físicos. N=8;

-Controle Treinado (CT) - ratos saudáveis que realizaram um protocolo de exercícios físicos. N=10;

-Diabético Sedentário (DS) - ratos diabéticos aloxânicos que não realizaram exercícios físicos. N=10;

-Diabético Treinado (DT) - ratos diabéticos aloxânicos que realizaram o mesmo protocolo de exercícios físicos do grupo (CT). N=10;

2.4.2. Protocolo de Treinamento

Todos os ratos foram submetidos a testes de esforço para a identificação da Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) por meio da qual foi definida a sobrecarga para cada grupo de treinamento (GOMES et al, 2009).

O protocolo de exercícios consistiu de natação por 1 hora/dia, 5 vezes/semana, durante 8 semanas consecutivas e com sobrecarga atada ao tórax (em % do peso corporal) correspondendo à MFEL (4,8% para animais diabéticos e 5,2% para animais saudáveis).

Período de adaptação: Com a finalidade de respeitar o princípio fisiológico da sobrecarga, os animais realizaram uma adaptação ao meio aquático com aumento progressivo da sobrecarga. As sessões de natação foram realizadas em tanques de amianto com 100 cm de comprimento, 70 cm de largura e 60 cm de altura. A água foi mantida numa profundidade de 40 cm, para que os animais não pudessem apoiar a cauda no fundo do tanque. A temperatura da água foi mantida em $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante a realização do exercício, por ser considerada termicamente neutra em relação à temperatura dos ratos.

2.4.3. Avaliação dos animais e sacrifício

Durante o período experimental, os ratos foram avaliados semanalmente com relação ao peso corporal e ingestão hídrica e alimentar.

Ao final do período experimental, os ratos de cada grupo foram mantidos em repouso por 48 horas em relação à última sessão de exercícios, sem jejum prévio. O sacrifício foi realizado por decapitação em guilhotina, com prévia anestesia em câmara de CO_2 . O sangue coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e a partir do soro foi realizada a análise de glicemia: a glicose foi determinada pelo

método enzimático colorimétrico da glicose oxidase-peroxidase (HENRY, CANNON & WILKEMAN 1974).

Baseado nos valores obtidos na análise de glicemia, foram selecionados três animais por grupo, cuja glicemia foi a mais representativa dentro deste. Destes animais selecionados foram então coletadas as amostras para a realização da análise ultraestrutural (microscopia eletrônica de transmissão).

2.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (Rotina)

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) durante 24 horas em geladeira. A seguir, foram processadas duas lavagens em tampão cacodilato de sódio com duração de 15 minutos cada uma e, em seguida, foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% durante uma hora no escuro. O material foi, então, lavado por 15 minutos no mesmo tampão por duas vezes.

Para a contrastação, o material foi colocado em acetato de uranila 1% dissolvido em álcool 10% por 8 horas, sendo em seguida desidratado em álcoois (de 70 a 100%) e, posteriormente, embebido em resina Epon mais acetona (1:1) por 24 horas sob agitação. O material foi então incluído em resina Epon pura e levado à estufa por 72 horas, a 60°C, para polimerização.

O material foi cortado em ultramicrotomo Porter Blum, colocado em grades de cobre e em seguida contrastado em acetato de uranila (45 minutos) e citrato de chumbo (15 minutos) (REYNOLDS, 1963). Posteriormente, as amostras foram analisadas e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100 do laboratório de microscopia eletrônica do departamento de Biologia, UNESP - Rio Claro.

2.5.RESULTADOS

2.5.1. Análises prévias ao sacrifício dos animais.

Os valores médios de glicemia obtidos para os animais são apresentados na **Tabela 1**. Observa-se o aumento significativo das concentrações de glicose no soro dos animais diabéticos. Quando se compara o grupo diabético sedentário (DS) com o grupo diabético treinado (DT) observa-se uma leve redução da glicemia final, porém essa redução não apresentou diferenças estatísticas.

A média do peso corporal semanal dos animais durante o período de estudo encontra-se apresentada na **Tabela 2 e Figura 2**. Pode-se observar que os animais controle (CS e CT) mostram uma taxa de crescimento constante durante todo o período experimental, com leve ganho de peso ao final do experimento. Em contrapartida, observou-se que os animais diabéticos (DS e DT) apresentaram redução significativa no peso quando comparados aos animais sadios ($p < 0,05$), principalmente a partir da segunda semana de treinamento onde os dois grupos diabéticos passaram a diferir significativamente dos animais controle.

Os dados referentes à ingestão hídrica e alimentar são apresentados na **Tabela 3 e Figura 3**. A partir dos dados da evolução da ingestão alimentar (**Figura 3A**) pode-se observar claramente o quadro de polifagia, característica marcante do diabetes. Isto porque os animais dos grupos diabéticos (DS e DT) apresentaram consumo de alimento significativamente maior quando comparados aos grupos controles (CS e CT). A comparação entre o grupo DT e o grupo DS não evidenciou diferença significativa, porém o consumo alimentar médio dos animais DT foi levemente menor do que o observado para os indivíduos do grupo DS. Também não foram encontradas diferenças significativas para a comparação entre grupos controle (CS e CT).

Quanto à ingestão hídrica, também ficou evidente através da **Figura 3B** a ocorrência de polidipsia nos animais dos grupos diabéticos (DS e DT). Estes apresentaram um consumo significativamente maior de água quando comparado aos animais dos grupos controle (CS e CT). Ao final do experimento não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controles (CS e CT). Também não foram encontradas diferenças significativas quando os grupos diabéticos (DS e DT) foram comparados entre si, porém pode-se observar que ao longo do experimento houve diferença no consumo hídrico desses grupos principalmente a partir da segunda semana de experimento.

2.5.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fibras musculares

A análise da musculatura ventricular esquerda dos animais do grupo controle sedentário (CS) não apresentou modificações em relação ao aspecto considerado normal para as fibras musculares (**Figura 4**). As miofibrilas se apresentaram bastante compactas, separadas por mitocôndrias alinhadas. Os sarcômeros

apresentaram linhas Z bastante evidentes, além de permitir a clara identificação das bandas A, I e H (**Figura 6**). Também foi possível identificar com facilidade regiões do retículo sarcoplasmático.

Os indivíduos do grupo controle treinado (CT) apresentaram morfologia normal das miofibrilas (**Figuras 4 e 7**) sendo possível, assim como observado para o grupo CS, a identificação de linhas Z, bem como a identificação das bandas A, I e H (**Figura 6**). Regiões do retículo sarcoplasmático também foram visualizadas e apresentaram aspectos idênticos ao observado para os animais do grupo controle sedentário.

A análise ultraestrutural da musculatura ventricular esquerda dos animais do grupo diabético sedentário (DS) apresentou algumas alterações morfológicas em relação aos grupos controle (CS e CT). Ficou evidente em DS a desorganização das fibras da musculatura ventricular esquerda nos animais, caracterizado pela desorganização das miofibrilas (**Figura 8B**), que não apresentaram o padrão em paralelo observado para os animais dos grupos controle (CS e CT). Além disso, as miofibrilas apresentaram com diâmetro menor nos animais do grupo DS (**Figura 6**) quando comparadas com as miofibrilas dos grupos controle (CS e CT). Pode-se notar que as linhas Z do grupo DS apresentaram-se mais largas e com eletrondensidade irregular em comparação aos controles (CS e CT). Foram também observadas em DS, regiões onde as miofibrilas se apresentaram degeneradas (**Figura 8A**).

Também ficou evidente o aumento na presença de colágeno na musculatura ventricular esquerda nos animais do grupo DS (**Figura 5**), em comparação com os grupos controle, onde pouco colágeno foi encontrado

Os animais do grupo diabético treinado (DT) apresentaram a organização tecidual da musculatura ventricular esquerda muito próxima à observada nos animais dos grupos controle (CS e CT). As miofibrilas apresentaram-se de maneira compacta, com orientação paralela (**Figura 5**) e sendo facilmente distinguíveis as bandas A, I e H, bem como a linha Z (**Figura 6**). Pode-se observar também a presença de vesículas do retículo sarcoplasmático.

A presença de fibras de colágeno foi menos evidente no grupo DT em comparação ao grupo DS, apresentando poucas fibras de colágeno entre as fibras musculares assim como observado para os animais dos grupos controle (CS e CT).

Quanto à análise dos discos intercalares (**Figura 9**), foi possível observar que os animais treinados (CT e DT) apresentaram a região do espaço intercelular mais delgada, em comparação ao grupo CS. Também foi possível observar que os discos intercalares nos animais do grupo DS apresentaram essa mesma região mais espaçada, com uma maior eletrondensidade, em comparação ao grupo CS.

Mitocôndrias

As mitocôndrias dos animais do grupo CS mostraram-se bastante preservadas e com sua morfologia normal, sendo claramente reconhecidas a dupla membrana, as cristas e a matriz mitocondrial.

As mitocôndrias observadas na musculatura ventricular dos animais do grupo CT apresentaram uma série de diferenças quando comparadas com as mitocôndrias encontradas no grupo CS. A principal diferença observada foi quanto à sua quantidade, sendo que estas são em número bastante elevado em CT, quando comparadas àquelas de CS.

Além disso, foram observadas diferenças morfológicas nas mitocôndrias dos animais do grupo CT. Estas apresentaram-se com formas incomuns, com alguns pontos de invaginação na sua membrana (**Figura 7B**), os quais variavam em quantidade e profundidade. Além disso, foi observado o aumento no tamanho das mitocôndrias.

Os animais do grupo DS apresentaram grande aumento no número de mitocôndrias (**Figura 8**), bem como um aumento no volume de grande parte dessas, em comparação com os animais controle. Além disso, pode-se observar a diminuição da eletrondensidade da matriz mitocondrial, bem como certo grau de desorganização e degeneração das cristas mitocôndrias (**Figura 10**) quando comparado com o observado para os animais controle (CS e CT).

Em geral, as mitocôndrias dos animais do grupo DT apresentaram-se com aspecto bastante próximo ao observado nos animais do grupo CT, com grande variedade de formas e tamanhos, numerosas cristas mitocondriais e a presença de algumas invaginações da dupla membrana mitocondrial (**Figuras 5 e 10**). Algumas mitocôndrias apresentaram o aspecto pouco eletrondenso da matriz mitocondrial, observado nos animais do grupo DS.

2.6.DISCUSSÃO

Análises prévias ao sacrifício dos animais

O Diabetes mellitus é classificado como um grupo de moléstias metabólicas caracterizadas principalmente pelo quadro de hiperglicemia. Neste trabalho, a destruição das células β pancreáticas devido à ação citotóxica da aloxana (ver LENZEN, 2008 para detalhes sobre a ação da droga) provavelmente gerou um quadro de hipoinsulinemia permanente nos animais dos grupos diabéticos (DS e DT) e conseqüente hiperglicemia.

A prática regular de atividade física vem sendo positivamente utilizada na prevenção primária e secundária de numerosas doenças crônicas dentre as quais se encontra o diabetes. Tal efeito é alcançado pelas várias modificações causadas pelo exercício no organismo. Sabe-se que o exercício físico crônico reduz a mobilização do tecido adiposo e possivelmente melhora a captação e utilização dos ácidos graxos livres nos indivíduos diabéticos (LUCIANO, E. 1996).

Em modelo animal de Diabetes mellitus, Luciano e Melo (1998) verificaram a ocorrência da redução do nível glicêmico dos animais treinados, assim como foi observado no presente trabalho onde houve leve redução da glicemia média final nos animais do grupo DT quando comparados aos DS. A recuperação, mesmo que não significativa, dos níveis glicêmicos nos animais diabéticos treinados, possivelmente se deve à melhora na captação periférica da glicose devido à maior sensibilidade das células musculares e adiposas a insulina, em organismos treinados (LUCIANO e MELLO, 1998). Essa melhor captação estaria relacionada com o aumento no número de transportadores de glicose insulino-sensíveis (GLUT) para as membranas celulares e túbulos transversos nos músculos (SHERMAN et al, 1993). A insulina atua sobre receptores encontrados na membrana plasmática, desencadeando uma série de reações que resultam na mobilização do GLUT armazenados em vesículas no retículo endoplasmático para a membrana da célula (NEGRÃO & BARRETTO, 2006). Além disso, os estímulos contráteis da musculatura levam à translocação de GLUT-4 à membrana plasmática pela via sinalizadoras da AMPK (MACHADO, SCHAAN & SERAPHIN, 2006), sendo uma possível causa da melhora no quadro glicêmico dos animais DT observada no presente trabalho.

Quanto aos resultados obtidos com relação à evolução do peso corporal, ingestão hídrica e alimentar, todos os dados mostraram-se de acordo com o esperado em um

quadro clínico de diabetes. A comparação dos animais dos grupos controle (CS e CT) com os animais diabéticos (DS e DT) mostrou uma redução média significativa no peso corporal. Possivelmente isto tenha ocorrido devido aos graves distúrbios metabólicos causados pela falta da insulina ou mesmo pela ocorrência de proteínas e gorduras do tecido muscular e adiposo. Mesmo amenizando os efeitos de algumas alterações metabólicas do diabetes, o exercício físico não foi suficiente para impedir ou diminuir a perda de peso dos animais diabéticos treinados (DT).

O exercício físico também não foi eficaz em reduzir a polidipsia (sede exagerada), tampouco reduziu a polifagia, ambos sintomas observados para os animais diabéticos (DS e DT). A polidipsia, comprovada pelo significativo aumento do consumo hídrico dos animais diabéticos, ocorreu possivelmente devido ao quadro de glicosúria, decorrente da hiperglicemia e que induz a diurese (NEGRÃO & BARRETTO, 2006). Quanto ao quadro de polifagia, evidenciado pelo significativo aumento da quantidade de ração consumida pelos animais diabéticos (DS e DT), o estudo realizado por Sindelar et al (1999) sugere que este seja decorrente não da perda de peso observada em diabéticos, mas sim de alterações na resposta cerebral aos hormônios insulina, leptina ou de ambos. O mesmo estudo mostrou que, para o modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina, a deficiência em leptina modula, em parte, o aumento no consumo alimentar. Outros trabalhos sugerem ainda que a concentração plasmática de grelina também altere o consumo de alimentos em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (ISHII et al, 2002).

Fibras musculares

A análise ultraestrutural da musculatura ventricular esquerda apresentou discretas alterações na morfologia muscular, quando se comparou o grupo diabético treinado (DT) com os demais grupos. Em ambos os grupos controle (CS e CT) e no grupo diabético treinado (DT) observou-se uma organização normal das miofibrilas, dispostas paralelamente umas as outras, sendo geralmente separadas por fileiras de mitocôndrias. Nestes três grupos foi possível identificar com facilidade os sarcômeros e suas subdivisões (bandas A, I e H) bem como as linhas Z.

Quando se analisou os indivíduos do grupo diabético sedentário (DS) pode-se observar a desorganização das miofibrilas, em comparação aos demais grupos. Essa desorganização é consistente com resultados previamente analisados neste trabalho, onde a mesma desorganização foi observada na análise histológica. Isto

pode ser atribuída aos efeitos causados pela prolongada hiperglicemia a que se encontram sujeitos os animais diabéticos, induzindo a alterações degenerativas no tecido, possivelmente devido à presença de radicais livres de oxigênio e ao estresse oxidativo por eles causados (OBERLEY, 1988; TAKEDA 2009). O estresse oxidativo também pode ser considerado uma das causas da degeneração observada em algumas regiões da musculatura ventricular no grupo DS, e é considerado fator que contribui para o acelerado processo de apoptose observado no miocárdio diabético (ANEJA et al, 2008).

As alterações morfológicas encontradas em DS, como a degeneração das miofibrilas e a presença de miofibrilas com menor tamanho, estão de acordo com o observado na literatura. Ayaz et al (2002) observaram perda de miofilamentos das miofibrilas, superfície irregular das células, linhas Z aumentadas, bem como fibrose e dano na musculatura cardíaca, enquanto outros trabalhos encontraram degeneração miofibrilar (MCGRATH E MCNEILL, 1986; SEAGER et al, 1984 apud HOWARTH et al, 2000). Além disso, estudo realizado com ratos diabéticos KK-A^y, mostrou arranjo irregular de miofilamentos e desaparecimento das linhas Z, alterações provavelmente relacionadas com anormalidades no metabolismo de cálcio e com o conteúdo de metais como magnésio, ferro e zinco (TAKESHITA et al, 1997).

A maior presença de fibras de colágeno na musculatura dos animais do grupo DS pode ter sido resultado da deposição de colágeno desencadeada pelas alterações metabólicas associadas ao diabetes. As fibras de colágeno I e III são considerados os principais componentes estruturais do interstício do miocárdio e, uma quantidade aumentada ou estrutura alterada deste componente fibrilar, pode influenciar negativamente as contrações sistólicas e diastólicas (JALIL et al, 1989). As regiões de fibrose intersticial, também registradas em pacientes diabéticos, são compostas em grande parte por fibras colágenas (SHIMIZU et al, 1993). O aumento de fibras colágenas observado no grupo DS pode ser indicativo de um processo inicial de fibrose no miocárdio, o que em longo prazo poderia causar graves disfunções cardíacas.

Os animais pertencentes ao grupo diabético treinado (DT) apresentaram a organização das miofibrilas muito próxima à observada nos indivíduos controle (CS e CT). Provavelmente, essa semelhança se deva à prevenção promovida pelo exercício aos danos causados em decorrência das alterações metabólicas encontradas em diabéticos. Isso porque o exercício físico promove a atenuação da

hiperglicemia causada pela atividade física (LUCIANO & LIMA, 1997) sendo esta a principal causa por trás do estresse oxidativo e pelos conseqüentes danos no tecido.

Por outro lado, alguns estudos não mostraram as mesmas alterações observadas no presente estudo. Howarth et al (2000) não observaram grandes diferenças na musculatura cardíaca de ratos diabéticos após 4 e 8 meses da aplicação de estreptozotocina. Além disso, este mesmo trabalho mostrou que as alterações morfológicas nos miofilamentos e estruturas associadas não explicam a disfunção contrátil observada na musculatura ventricular de ratos diabéticos.

Os Discos intercalares, complexos juncionais exclusivos da musculatura cardíaca, encontrados na interface de células musculares adjacentes, (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004), apresentaram diferenças entre os grupos, quando analisados por microscopia eletrônica de transmissão.

As diferenças encontradas nos animais dos grupos treinados (CT e DT), em relação ao CS, provavelmente se devem a sobrecarga que a musculatura sofre devido à maior frequência cardíaca promovida pelo treinamento dinâmico. O maior estresse mecânico à que estas células estão sujeitas pode ter causado um aumento na quantidade das proteínas dos complexos juncionais, deixando o espaço intercelular mais delgado. Já as alterações observadas nos discos intercalares dos animais do grupo DS possivelmente devem-se às alterações metabólicas causadas pelo diabetes. Porém, são raros os estudos que apresentam estudos ultraestruturais destes complexos juncionais, sendo que a causa destas alterações permanecem desconhecidas. Howarth et al (2000) não observaram diferenças nos discos intercalares, porém alguns autores relataram a separação dos discos intercalares em ratos diabéticos após dois meses de indução por estreptozotocina. (SEAGER et al, 1984 apud HOWARTH et al, 2000).

Mitocôndrias

Quando comparados, os grupos controle (CS e CT) apresentaram pequena diferença quanto ao aspecto das mitocôndrias, além do grande aumento na quantidade no grupo CT, sendo o mesmo observado na comparação do grupo CS com o grupo DT.

O estudo clássico de Laguens et al (1967) evidenciou diferenças morfológicas em mitocôndrias de ratos submetidos ao exercício. Neste estudo os autores mostraram que após 90 e 120 minutos de exercício a massa de mitocôndrias na musculatura foi

significativamente maior do que em animais que permaneceram inativos, aparentemente devido ao aumento do volume individual das mitocôndrias.

Além disso, o mesmo estudo mostrou mudanças na forma das mitocôndrias, com o aparecimento de varias invaginações, com diferentes graus de profundidade. Apesar das mudanças na forma, a estrutura permaneceu intacta. Possivelmente, as alterações na forma das mitocôndrias observadas no presente trabalho são evidências da replicação das mitocôndrias (LAGUENS et al, 1967), visto que no exercício dinâmico (como a natação) se nota o aumento da frequência cardíaca (NEGRÃO & BARRETTO, 2006), levando a uma sobrecarga do coração, gerando assim uma maior demanda de energia.

A análise das mitocôndrias dos animais do grupo DS mostrou uma série de alterações morfológicas. Vários estudos relatam alterações morfológicas em mitocôndrias, como mitocôndrias com formas alteradas e cristas desorganizadas (MALONE et al, 1999), inchaço das mitocôndrias e “clareamento” da matriz mitocondrial (MCGRATH E MCNEILL, 1986; SEAGER et al, 1984 apud HOWARTH et al, 2000). Estas alterações possivelmente se devem a uma série de modificações do funcionamento das mitocôndrias em indivíduos diabéticos, como a capacidade oxidativa mitocondrial que se mostrou reduzida no diabetes tipo I (PIERCE & DHALLA, 1985; TANAKA, KONNO e KAKO, 1992; LASHIN & ROMANI, 2004). Além disso, estudos mostraram que a respiração mitocondrial foi reduzida em ratos obesos com diabetes tipo II, além da ocorrência da baixa expressão de proteínas que participam da fosforilação oxidativa (PIERCE & DHALLA, 1985).

Sabe-se que o diabetes altera ainda a composição das proteínas das mitocôndrias (WANG et al, 2006). A maior parte destas alterações nas proteínas mitocondriais é devido ao elevado conteúdo de enzimas necessárias para a oxidação de ácidos graxos (WANG et al, 2006). Além disso, as mitocôndrias desempenham um importante papel na apoptose (KELLY et al, 2002), sendo que a ocorrência de apoptose e a necrose é maior em pacientes diabéticos do que em pacientes saudáveis (CHOWDHRY, VOHRA & GALIÑANES, 2007).

As alterações observadas nas mitocôndrias dos animais do grupo DT, se aproximam muito as observadas nos animais do grupo CT, evidenciando uma possível prevenção das alterações morfológicas e fisiológicas causados pelo diabetes. Mokhtar et al (1993) mostraram que o treinamento físico foi capaz de abolir

completamente as anomalias na produção de energia nas mitocôndrias do miocárdio diabético.

Apesar da grande quantidade de estudos relacionados com as alterações causadas pelo diabetes na musculatura ventricular, são poucos os estudos recentes que avaliam as alterações morfológicas que acometem as células desse tecido e suas organelas.

2.7.CONCLUSÃO

Com base neste experimento pode-se concluir que o protocolo de exercício físico realizado se mostrou eficiente na prevenção de boa parte dos efeitos danosos causados pelo diabetes experimental do tipo I. Mesmo que a melhora metabólica causada pelo exercício não tenha sido profundamente avaliada neste trabalho, pode-se atribuir a ela a prevenção das alterações morfológicas observadas na musculatura ventricular esquerda, uma vez que a literatura é rica em trabalhos que comprovam essa melhora.

2.8.LITERATURA CITADA

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Consensus development conference on the diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, 1551-9, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standarts of medical care in diabetes-2006. **Diabetes Care**, v. 29, s4-s42, 2006.

ANEJA, A.; TANG, W. H. W.; BANSILAL, S.; GARCIA, M. J.; FARKOUH, M. E. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options. *Am. J. Med.*, v.121(9), p.478-457, 2008.

AYAZ, M.; CAN, B.; OZDEMIR, S.; TURAN, B. Protective Effect of Selenium Treatment on Diabetes-Induced Myocardial Structural Alterations. **Biol. Trace Element Research**. v. 89, p. 215-226, 2002.

BENETTI, M. Atividade Fisica e Diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva**, São Paulo, v. 2, p. 75-78, 1996.

CHOWDHRY, M. F.; VOHRA, H. A.; GALIÑANES, M. J. Diabetes increses apoptosis and necrosis in both ischemic and nonischemic human myocardium: Role of caspases and poly-adenosine diphosphate-ribose polymerase. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** v.134, p.124-31, 2007.

DE ANGELIS, K.; PUREZA, D. Y. da; FLORES, L. J. F.; RODRIGUES, B.; MELO, K. F. S.; SCHAAN, B. D.; IRIGOYEN, M. C. Efeitos Fisiológicos do Treinamento Físico em Pacientes Portadores de Diabetes Tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50(6), p. 1005-10013, 2006.

FEENER, E. P., KING, G. L. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. **Lancet**. v.350, p. 9-13, 1997.

FRIEDMAN, J. J. Vascular sensitivity and reactivity to norepinephrine in diabetes mellitus. **Am. J. Physiol.** v.256, H1134–H1138, 1989.

GOMES, R. J., LEME, J. A. C. A., MOURA, L. P., ARAÚJO, M. B., ROGATTO, G. P., MOURA, R. F., LUCIANO, E., MELLO, M. A. R. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. **Cell Biochem. Funct.**, v.27, p.199–204, 2009.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WILKEMAN, J. (2ed) **Clinical chemistry, principles and techniques**. New York: Harper and Harper Row Publishes, 1974.

HOWARTH, F. C.; QURESHI, M. A.; LAWRENCE, P.; ADEGHATE, E. Chronic effects of streptozotocin-induced diabetes on the ultrastructure of rat ventricular and papillary muscle. **Acta Diabetol.** v.37, p.119-124, 2000.

ISHII, S.; KAMEGAI, J.; TAMURA, H.; SIMIZU, T.; SUGIHARA, H.; OIKAWA, S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. **Endocrinology**. v.143(12), p.4934-4937, 2002.

JALIL, J. E.; DOERING, C. W.; JANICKI, J. S.; PICK, R.; SHROFF, S. G.; WEBER, K. T. Fibrillar Collagen and Myocardial Stiffness in the Intact Hypertrophied Rat Left Ventricle. **Circ. Res.** v. 64, p. 1041-1050, 1989.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia Básica**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

KELLEY, D. E.; HE, J.; MENSHIKOVA, E. V.; RITOV, V. B. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. **Diabetes**. v.51, p.2944-2950, 2002.

KRAUS, W.E. HOUMARD, J.A.; DUCHA, B.D.; KNETZGER, K.J.; WHARTON, M.B. McCARTNEY J.S. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **N. Engl. J. Med.**, v. 374, p. 1483-92, 2002.

LAGUENS, R. P.; GÓMEZ-DUMM, C. L. Fine Structure of Myocardial Mitochondria in Rats after Exercise for One-Half to Two Hours. **Circ. Res.** v.21, p.271-280, 1967.

LASHIN, O. & ROMANI, A. Hyperglycemia does not alter state 3 respiration in cardiac mitochondria from type-I diabetic rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v.267, p.31–37, 2004.

LEDET, T. Diabetic cardiomyopathy: quantitative histological studies of the heart from young juvenile diabetics. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** v. 84, p. 421–428, 1976.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia.** v.51, p.216-226, 2008.

LEON, A. S. Exercise testing and exercise prescription for special cases. **Diabetes**, p.115-133, 1987.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus induzido pela aloxana em ratos. Estudo Clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.18(2), p.132-42, 2003.

LI, S.; CULVER, B.; REN, J. Benefit and risk of exercise on myocardial function in diabetes. **Pharmacological Research.** v.48, p.127–132, 2003.

LUCIANO E.; MELLO M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. Paul. Educ. Fis.** v.12, p.202-209, 1998.

LUCIANO, E. Atividade física e metabolismo lipídico em ratos diabéticos experimentais. **Rev. Bras. Ativ. Fis. Saúde.** v. 1, n. 4, p. 19-26, 1996.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E.M.; CARVALHO, C.R.O.; CARVALHEIRA, J.B.C.; PERES, S.B.; REIS M.A.B.; SAAD, M.J.A.; BOSCHERO, A.C.; VELLOSO, L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur. J. Endocrinol.**, v.147, p.149-157. 2002.

LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, Botucatu, v. 18, p.47-60, 1997.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIN, P. M. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.50(2), p. 177-189, 2006.

MALONE, J. I.; SCHOCKEN, D. D.; MORRISON, A. D.; GILBERT-BARNES, E. Diabetic Cardiomyopathy and Carnitine Deficiency. **J. Diab. Comp.** v.13, p.86-90, 1999.

MCGRATH, G. M.; MCNEILL, J. H. Cardiac ultrastructural changes in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin treatment. **Can. J. Cardiol.** v.2, p.164-169, 1986. apud HOWARTH, et al, 2000.

MOKHTAR, N.; LAVOIE, J.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Physical training reverses defect in mitochondrial energy production in heart of chronically diabetic rats. **Diabetes.** v.42, p.682-687, 1993.

NEGRÃO, C. E.; BARRETTO, A. C. P. **Cardiologia do exercício: Do atleta ao cardiopata**. 2ª Edição. Barueri, SP: Editora Manole, 2006.

OBERLEY, L.W. Free radicals and diabetes. **Free Radic. Biol. Med.** v. 5, p. 113–124, 1988.

OLIVEIRA, E.F.; GRANJA, L.A.; WAJCHENBERG, B.L. Cardiopatia do diabético. **Rev. Assoc. Bras.**, v.2, n. 3, p. 103-15, 2000.

PICCINI, J. P.; KLEIN, L.; GHEORGHIAD, M. BONOW, R. O. New Insights into Diastolic Heart Failure: Role of Diabetes Mellitus. **Am. J. Med.** v. 116(5A), p.64-75, 2004.

PIERCE, G. N.; KUTRYK, M. J. B., DHALLA, N. S. Alterations in Ca^{++} binding by and composition of the cardiac sarcolemmal membrane in chronic diabetes **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 80, p.5412–5416, 1983.

PIERCE, G.N. & DHALLA, N.S. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. **Can. J. Cardiol.**, v.1, p.48-54, 1985.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high Ph electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of cell Biology**, v. p.208-212, 1963.

SEAGER, M. J.; SINGAL, P. K.; ORCHARD, R.; PIERCE, G. N.; DHALLA, N. S. Cardiac cell damage: a primary myocardial disease in streptozotocin-induced chronic diabetes. **Br. J. Exp. Path.** v.65, p.613-623, 1984 apud HOWARTH, et al, 2000.

SHERMAN, W. M.; FRIEDMAN, J. E.; GAO, J. P.; REED, M. J.; ELTON, C. W.; DOHM, E. L. Glycemia and exercise training alter glucose transport and GLUT-4 in Zucker rat. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.25, p.341-348 1993.

SHIMIZU, M.; UMEDA, K.; SUGIHARA, N.; YOSHIO,H.; INO, H.; TAKEDA, R.; OKADA, Y.; NAKANISHI, I. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. **J. Clin. Pathol.** v.46, p. 32-36, 1993.

SINDELAR, D. K.; HAVEL, P. J.; SEELEY, R. J.; WILKINSON, C. W.; WOODS, S. C.; SCHWARTZ, M. W. Low Plasma Leptin Levels Contribute to Diabetic Hyperphagia in Rats. **Diabetes.** v.48, p.1275-1280, 1999.

SMANIO, P. Doença Cardiovascular em Mulheres Diabéticas Assintomáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.51, n.2, p. 305-311, 2007

TAKEDA, N. Cardiac disturbances in diabetes mellitus. **Pathophysiology**. (DOI: 10.1016/j.pathophys.2009.03.012), 2009.

TAKESHITA, M., et al. Ultrastructural study of capillary and myocytic changes in the masseter and heart of KK-A-y mice. **Journal of Electron. Microscopy**. v.46, n.5, p.413-23, 1997.

TANAKA, Y.; KONNO, N.; KAKO, K.J. Mitochondrial dysfunction observed in situ in cardiomyocytes of rats in experimental diabetes. **Cardiovasc. Res.**, v.26, p.409-414, 1992.

TOMITA, M. et al. Mitochondrial respiratory impairment in streptozotocin-induced diabetic rat heart. **Japanese Circulation Journal**. v. 60, n.29, p.673-82, 1996.

VADLAMUSDI, S. V., RODGES, R. L. & MCNEILL, J. H. The effect of chronic alloxan and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart performance. **Can. Physiol. Pharmacol.** v.60, p.902-11, 1982.

VEKSLER, V.I.; MURAT, I.; VENTURA-CLAPIER, R. Creatine kinase and mechanical and mitochondrial functions in hereditary and diabetic cardiomyopathies. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.69, p.852-858, 1991.

WANG, J.; SONG, Y.; WANG, Q.; KRALIK, P. M.; EPSTEIN, P. N. Causes and Characteristics of Diabetic Cardiomyopathy. **Rev. Diabetic. Stud.** v.3, p. 108-117, 2006.

WEI, M.; ONG, L.; SMITH, M. T.; ROSS, F. B.; SCHMID, K.; HOEY, A. J.; BURSTOW, D.; BROWN, L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart, lung and circulation**, v. 12, p.4-50, 2003.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-53, 2004.

YANG, J.; YEH, H.; LIN, K. WANG, P. H. Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: Implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. **J. Molec. Cell. Card.** v. 46, p. 919–926, 2009.

2.9. APÊNDICE

Figuras, gráficos e tabelas

Tabela 1. Valores de Glicemia Final Média (mg/dL);

Parâmetro	Grupos de Tratamento (n=8)			
	Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
Glicemia	85,14 ± 11,11	79,14 ± 5,29	423,33 ± 96,45 ^{a,b}	369,68 ± 66,47 ^{a,b}

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT; c ≠ de DS; d ≠ de DT. (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni; Kruskal-Wallis, post-hoc Dunn; $p < 0,05$).

Figura 1. Gráfico da glicemia final média. CS=controle sedentário; CT=controle treinado; DS=diabético sedentário; DT=diabético treinado; a ≠ de CS; b ≠ de CT; c ≠ de DS; d ≠ de DT. (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni; Kruskal-Wallis, post-hoc Dunn; $p < 0,05$).

Tabela 2. Evolução de Peso Corporal ao longo do período de treinamento (g)

Período	Grupos (n=8)			
	Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
1ª Semana	461,7 ± 26,0	462,2 ± 54,0	389,2 ± 80,3	359,3 ± 62,3 ^{a,b}
2ª Semana	466,7 ± 27,3	460,9 ± 60,2	388,8 ± 92,8	357,1 ± 49,1 ^{a,b}
3ª Semana	476,9 ± 28,7	469,8 ± 57,2	371,9 ± 63,2 ^{a,b}	357,2 ± 47,6 ^{a,b}
4ª Semana	484,2 ± 32,3	479,1 ± 55,8	339,8 ± 102,7 ^{a,b}	333,5 ± 63,1 ^{a,b}
5ª Semana	494,4 ± 31,1	490,6 ± 65,0	358,4 ± 91,2 ^{a,b}	350,5 ± 47,7 ^{a,b}
6ª Semana	500,7 ± 30,8	502,9 ± 59,9	353,4 ± 100,7 ^{a,b}	344,6 ± 55,8 ^{a,b}
7ª Semana	475,0 ± 28,0	484,2 ± 61,9	331,1 ± 96,8 ^{a,b}	310,6 ± 58,9 ^{a,b}

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT; c ≠ de DS; d ≠ de DT. (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni; Kruskal-Wallis, post-hoc Dunn; p < 0,05).

Figura 2. Gráfico da evolução do peso corporal ao longo do período experimental. CS=controle sedentário; CT=controle treinado; DS=diabético sedentário; DT=diabético treinado;

Tabela 3. Ingestão Alimentar Média (g de ração/kg de rato) e Ingestão Hídrica (ml de água/kg de rato) após 7 semanas de treinamento.

Parâmetro	Grupos de Tratamento (n=8)			
	Controle Sedentário	Controle Treinado	Diabético Sedentário	Diabético Treinado
Ing. Alimentar (g/kg/rato)	40,6 ± 4,2	50,6 ± 2,8	139,0 ± 29,2 ^{a,b}	129,1 ± 39,1 ^{a,b}
Ing. Hídrica (mL/kg/rato)	80,1 ± 9,2	63,6 ± 12,3	434,3 ± 119,5 ^{a,b}	486,9 ± 26,2 ^{a,b}

Valores expressos como média ± desvio padrão. a ≠ de CS; b ≠ de CT; c ≠ de DS; d ≠ de DT. (ANOVA one-way, post-hoc Bonferroni; Kruskal-Wallis, post-hoc Dunn; p < 0,05).

Figura 3. Evolução da ingestão alimentar (A) e hídrica (B). CS=controle sedentário; CT=controle treinado; DS=diabético sedentário; DT=diabético treinado

Figura 4. Micrografia eletrônica da musculatura ventricular esquerda (54.000x). Observar a organização normal das miofibrilas em CS e em CT. m-mitocôndria; s-sarcômero; lp-lipídio; setas(→)-retículo sarcoplasmático; CS-controlado sedentário; CT-controlado treinado.

Figura 5. Micrografia eletrônica da musculatura ventricular esquerda (54.000x). Observar a presença de fibras colágenas em DS e a organização normal das miofibrilas e a variação de forma das mitocôndrias em DT. m-mitocôndria; c-fibras colágenas; s-sarcômero; setas(→)-retículo sarcoplasmático; DS-diabético sedentário; DT-diabético treinado.

Figura 6. Detalhe do sarcômero (135.000x). Observe que as bandas são facilmente identificadas em CS e em CT. Observar também o menor diâmetro da miofibrila em DS e a organização normal desta em DT. m-mitocôndria; setas(→)-retículo sarcoplasmático; CS-controle sedentário; CT-controle treinado; DS-diabético sedentário; DT-diabético treinado.

Figura 7. Micrografia eletrônica da musculatura ventricular esquerda de CT. (A) Organização normal das fibras observada no grupo CT, com disposição em paralelo das miofibrilas (20.500x). (B) Observe a diferença nas formas das mitocôndrias encontradas em CT com a presença de pontos de invaginação indicados pelas setas (54.000x). m-mitocôndria; s-sarcômero; setas(→)-invaginação; CT-controle treinado.

Figura 8. Micrografia eletrônica da musculatura ventricular esquerda de DS. (A) Observar na metade inferior da figura a presença da região de degeneração das miofibrilas encontradas no grupo DS (14.500x). (B) Observar a visível desorganização das miofibrilas e a grande presença de mitocôndrias com a matriz alterada em DS (8.100x). m-mitocôndria; c-fibras colágenas; s-sarcômero; N-núcleo; DS-diabético sedentário.

Figura 9. Disco intercalar (135.000x). Observar o espaço intercelular mais delgado em CT e DT e a maior eletrondensidade no espaço intercelular em DS. CS-controle sedentário; CT-controle treinado; DS-diabético sedentário; DT-diabético treinado.

Figura 10. Detalhe da musculatura ventricular esquerda em DS e DT(54.000x). Observe a presença de mitocôndrias com ruptura das cristas e matriz mitocondrial com aspecto pouco eletrondenso em DS. Observe a variedade de formas e tamanhos das mitocôndrias em DT. Observe também o melhor aspecto da matriz mitocondrial em DT quando comparado com DS. m-mitocôndria; DS-diabético sedentário; DT-diabético treinado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Diabetes mellitus é um importante problema mundial de saúde, tanto em termos no número de pessoas afetadas e mortalidade prematura, quanto nos custos envolvidos no controle e no tratamento de suas complicações. A incidência desta doença vem aumentando principalmente nos países desenvolvidos, devido à modificação nos hábitos alimentares e ao sedentarismo.

O exercício, juntamente com a dieta e o tratamento farmacológico, tem sido considerado como uma das três principais abordagens no tratamento do diabetes. A atividade física regular é recomendada para pacientes com diabetes em razão de seus vários efeitos benéficos sobre o risco cardiovascular, controle metabólico e prevenção das complicações crônicas da doença. O exercício regular acelera as adaptações metabólicas e hormonais que aparecem no início do exercício físico e contribuem para reduzir as necessidades da insulina e também aumenta a sensibilidade à insulina de forma semelhante ao indivíduo saudável.

Apesar da grande quantidade de estudos que avaliam os danos causados pelo diabetes no metabolismo dos pacientes, são raros os estudos que mostram as alterações morfológicas que os tecidos e células sofrem devido a essa doença. São ainda mais raros os trabalhos que mostram os efeitos do exercício físico sobre estas alterações.

No presente trabalho, foram avaliadas algumas alterações morfológicas causadas pelo Diabetes mellitus experimental na musculatura ventricular esquerda de ratos Wistar e os efeitos do exercício físico sobre estas. Estas alterações foram avaliadas através do uso de técnicas de histologia/histoquímica e de microscopia eletrônica de transmissão.

Tanto na análise histológica quanto na ultraestrutural, foram observadas alterações na organização das fibras dos animais diabéticos sedentários (DS), evidenciadas por alterações na organização das miofibrilas da musculatura ventricular em comparação aos controles (CS e CT). Além disso, alterações na quantidade de colágenos totais e de fibras reticulares foram observadas para este grupo. Também foi possível observar modificações na matriz mitocondrial destes animais, sendo que estas se apresentaram menos eletrondensas que as dos animais controles (CS e CT).

Quase que a totalidade das alterações observadas neste trabalho foram reduzidas a níveis próximos ao observado para os controles quando se analisou os animais do grupo diabético treinado (DT). Para quase todos os parâmetros avaliados, o treinamento físico se mostrou benéfico em prevenir ou recuperar os danos causados pelo diabetes na morfologia da musculatura ventricular esquerda.

Estes resultados mostram que a prática de exercícios físicos regulares é benéfica e previne os danos causados pelo desequilíbrio metabólico decorrente do diabetes, estando assim de acordo com um grande espectro de trabalhos que vêm demonstrando essas melhorias a níveis metabólicos, bioquímicos e moleculares.

Entretanto, estudos que agrupem estes tipos de análise ainda se fazem necessários para o completo entendimento das alterações causadas por esse complexo de desordens metabólicas que caracterizam o diabetes.

LITERATURA GERAL CITADA

ALEXANDER, C. M.; LANDSMAN, P. B.; TEUTSCH, S.M. Diabetes mellitus, impaired fasting glucose, atherosclerotic risk factors, and prevalence of coronary heart disease. **Am. J. Cardiol.** v.86, p.897-902, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical Practice Recommendations. **Diabetes Care**, v. 26, s.1, s1-156, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Consensus development conference on the diagnosis of coronary heart disease in people with diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, 1551-9, 1998.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standarts of medical care in diabetes-2006. **Diabetes Care**, v. 29, s4-s42, 2006.

ANEJA, A.; TANG, W. H. W.; BANSILAL, S.; GARCIA, M. J.; FARKOUH, M. E. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options. **Am. J. Med.**, v.121(9), p.478-457, 2008.

AYAZ, M.; CAN, B.; OZDEMIR, S.; TURAN, B. Protective Effect of Selenium Treatment on Diabetes-Induced Myocardial Structural Alterations. **Biol. Trace Element Research**. v. 89, p. 215-226, 2002.

BAN, R. C.; TWIGG, S. M. Fibrosis in diabetes complications: Pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. **Vasc. Health and Risk Management**, v.4(3), p.575-596, 2008.

BENETTI, M. Atividade Fisica e Diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva**, São Paulo, v. 2, p. 75-78, 1996.

CHOWDHRY, M. F.; VOHRA, H. A.; GALIÑANES, M. J. Diabetes increses apoptosis and necrosis in both ischemic and nonischemic human myocardium: Role

of caspases and poly-adenosine diphosphate-ribose polymerase. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** v.134, p.124-31, 2007.

COSSON, S.; KEVORKIAN, J. P. Left ventricular diastolic dysfunction: na early sign of diabetic cardiomyopathy? **Diabetes Metab.**, v. 29, p.455-66, 2003.

DE ANGELIS, K.; PUREZA, D. Y. da; FLORES, L. J. F.; RODRIGUES, B.; MELO, K. F. S.; SCHAAN, B. D.; IRIGOYEN, M. C. Efeitos Fisiológicos do Treinamento Físico em Pacientes Portadores de Diabetes Tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.50(6), p.1005-10013, 2006.

FEENER, E. P., KING, G. L. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. **Lancet.** v.350, p. 9-13, 1997.

FREITAS, A.M.; CORRÊA, Z.M.S.; MARCON, I.M.; SCHIMIDT, H.A. Proteinuria como um fator de risco para retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.65, n.1, São Paulo, 2002.

FRIEDMAN, J. J. Vascular sensitivity and reactivity to norepinephrine in diabetes mellitus. **Am. J. Physiol.** v.256, H1134–H1138, 1989.

GOMES, R. J., LEME, J. A. C. A., MOURA, L. P., ARAÚJO, M. B., ROGATTO, G. P., MOURA, R. F., LUCIANO, E., MELLO, M. A. R. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. **Cell Biochem. Funct.**, v.27, p.199–204, 2009.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WILKEMAN, J. (2ed) **Clinical chemistry, principles and techniques**. New York: Harper and Harper Row Publishes, 1974.

HOWARTH, F. C.; QURESHI, M. A.; LAWRENCE, P.; ADEGHATE, E. Chronic effects of streptozotocin-induced diabetes on the ultrastructure of rat ventricular and papillary muscle. **Acta Diabetol.** v.37, p.119-124, 2000.

ISHII, S.; KAMEGAI, J.; TAMURA, H.; SIMIZU, T.; SUGIHARA, H.; OIKAWA, S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. **Endocrinology**. v.143(12), p.4934-4937, 2002.

JALIL, J. E.; DOERING, C. W.; JANICKI, J. S.; PICK, R.; SHROFF, S. G.; WEBER, K. T. Fibrillar Collagen and Myocardial Stiffness in the Intact Hypertrophied Rat Left Ventricle. **Circ. Res.** v. 64, p. 1041-1050, 1989.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia Básica**. 10ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA & JUNQUEIRA. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Editora Santos, 1983.

KELLEY, D. E.; HE, J.; MENSHIKOVA, E. V.; RITOV, V. B. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. **Diabetes**. v.51, p.2944-2950, 2002.

KRAUS, W.E. HOUMARD, J.A.; DUCHA, B.D.; KNETZGER, K.J.; WHARTON, M.B. McCARTNEY J.S. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **N. Engl. J. Med.**, v. 374, p. 1483-92, 2002.

LAGUENS, R. P.; GÓMEZ-DUMM, C. L. Fine Structure of Myocardial Mitochondria in Rats after Exercise for One-Half to Two Hours. **Circ. Res.** v.21, p.271-280, 1967.

LASHIN, O. & ROMANI, A. Hyperglycemia does not alter state 3 respiration in cardiac mitochondria from type-I diabetic rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v.267, p.31–37, 2004.

LEDET, T. Diabetic cardiomyopathy: quantitative histological studies of the heart from young juvenile diabetics. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** v. 84, p. 421–428, 1976.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**. v.51, p.216-226, 2008.

LEON, A. S. Exercise testing and exercise prescription for special cases. **Diabetes**, p.115-133, 1987.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus induzido pela aloxana em ratos. Estudo Clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n.2, 132-42, 2003.

LI, S.; CULVER, B.; REN, J. Benefit and risk of exercise on myocardial function in diabetes. **Pharmacological Research**, v.48, p.127–132, 2003.

LUCIANO E.; MELLO M.A.R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. **Rev. Paul. Educ. Fis.** v.12, p.202-209, 1998.

LUCIANO, E. Atividade física e metabolismo lipídico em ratos diabéticos experimentais. **Rev. Bras. Ativ. Fis. Saúde**, v.1, n.4, p.19-26, 1996.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E.M.; CARVALHO, C.R.O.; CARVALHEIRA, J.B.C.; PERES, S.B.; REIS M.A.B.; SAAD, M.J.A.; BOSCHERO, A.C.; VELLOSO, L.A. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **Eur. J. Endocrinol.**, v.147, p.149-157. 2002.

LUCIANO, E.; LIMA, F.B. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. **Revista de Ciências Biomédicas**, Botucatu, v. 18, p.47-60, 1997.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIN, P. M. Transportadores de Glicose na Síndrome Metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.50(2), p. 177-189, 2006.

MALONE, J. I.; SCHOCKEN, D. D.; MORRISON, A. D.; GILBERT-BARNES, E. Diabetic Cardiomyopathy and Carnitine Deficiency. **J. Diab. Comp.** v.13, p.86-90, 1999.

MCGRATH, G. M.; MCNEILL, J. H. Cardiac ultrastructural changes in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin treatment. **Can. J. Cardiol.** v.2, p.164-169, 1986. apud HOWARTH, et al, 2000.

MIR, S. H & DARZI, M. M. Histopathological abnormalities of prolonged alloxan-induced diabetes mellitus in rabbits. **Int. J. Exp. Path.**, v.90, p.66–73, 2009.

MOKHTAR, N.; LAVOIE, J.; ROUSSEAU-MIGNERON, S.; NADEAU, A. Physical training reverses defect in mitochondrial energy production in heart of chronically diabetic rats. **Diabetes.** v.42, p.682-687, 1993.

NEGRÃO, C. E.; BARRETTO, A. C. P. **Cardiologia do exercício: Do atleta ao cardiopata.** 2ª Edição. Barueri, SP: Editora Manole, 2006.

NEMOTO, O.; KAWAGUCHI, M.; YAOITA, H.; MIYAKE, K.; MAEHARA, K.; MARUYAMA, Y. Left Ventricular Dysfunction and Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Circ. J.**, v. 70, p. 327 –334, 2006.

NORBY, F.L.; WOLD, L. E.; DUAN, J.; HINTZ, K. K.; REN, J. IGF-1 attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 283 (4), p. E658-66, 2002.

OBERLEY, L.W. Free radicals and diabetes. **Free Radic. Biol. Med.** v. 5, p. 113–124, 1988.

OLIVEIRA, E.F.; GRANJA, L.A.; WAJCHENBERG, B.L. Cardiopatia do diabético. **Rev. Assoc. Bras.**, v.2, n. 3, p. 103-15, 2000.

PICCINI, J. P.; KLEIN, L.; GHEORGHIAD, M. BONOW, R. O. New Insights into Diastolic Heart Failure: Role of Diabetes Mellitus. **Am. J. Med.** v. 116(5A), p.64-75, 2004.

PIERCE, G. N.; KUTRYK, M. J. B., DHALLA, N. S. Alterations in Ca^{++} binding by and composition of the cardiac sarcolemmal membrane in chronic diabetes **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 80, p.5412–5416, 1983.

PIERCE, G.N. & DHALLA, N.S. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. **Can. J. Cardiol.**, v.1, p.48-54, 1985.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high Ph electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of cell Biology**, v. p.208-212, 1963.

RUSSEL, R. R., 3rd; BERGERON, R.; SHULMAN, G. I.; YOUNG, L. H. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.277, p.H643–H649, 1999.

SEAGER, M. J.; SINGAL, P. K.; ORCHARD, R.; PIERCE, G. N.; DHALLA, N. S. Cardiac cell damage: a primary myocardial disease in streptozotocin-induced chronic diabetes. **Br. J. Exp. Path.** v.65, p.613-623, 1984 apud HOWARTH, et al, 2000.

SHERMAN, W. M.; FRIEDMAN, J. E.; GAO, J. P.; REED, M. J.; ELTON, C. W.; DOHM, E. L. Glycemia and exercise training alter glucose transport and GLUT-4 in Zucker rat. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.25, p.341-348 1993.

SHIMIZU, M.; UMEDA, K.; SUGIHARA, N.; YOSHIO,H.; INO, H.; TAKEDA, R.; OKADA, Y.; NAKANISHI, I. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. **J. Clin. Pathol.** v.46, p. 32-36, 1993.

SINDELAR, D. K.; HAVEL, P. J.; SEELEY, R. J.; WILKINSON, C. W.; WOODS, S. C.; SCHWARTZ, M. W. Low Plasma Leptin Levels Contribute to Diabetic Hyperphagia in Rats. **Diabetes.** v.48, p.1275-1280, 1999.

SMANIO, P. Doença Cardiovascular em Mulheres Diabéticas Assintomáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.51, n.2, p. 305-311, 2007

TAKEDA, N. Cardiac disturbances in diabetes mellitus. **Pathophysiology**. (DOI: 10.1016/j.pathophys.2009.03.012), 2009.

TAKESHITA, M., et al. Ultrastructural study of capillary and myocytic changes in the masseter and heart of KK-A-y mice. **Journal of Electron. Microscopy.**, v.46, n.5, p.413-23, 1997.

TANAKA, Y.; KONNO, N.; KAKO, K.J. Mitochondrial dysfunction observed in situ in cardiomyocytes of rats in experimental diabetes. **Cardiovasc. Res.**, v.26, p.409-414, 1992.

TOMITA, M. et al. Mitochondrial respiratory impairment in streptozotocin-induced diabetic rat heart. **Japanese Circulation Journal**. v. 60, n.29, p.673-82, 1996.

VADLAMUSDI, S. V., RODGES, R. L. & MCNEILL, J. H. The effect of chronic alloxan and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart performance. **Can. Physiol. Pharmacol.** v.60, p.902-11, 1982.

VEKSLER, V.I.; MURAT, I.; VENTURA-CLAPIER, R. Creatine kinase and mechanical and mitochondrial functions in hereditary and diabetic cardiomyopathies. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.69, p.852-858, 1991.

WÄGNER, A.M., MARTINEZ-RUBIO, A., ORDONEZ-LLANOS J., PEREZ-PEREZ, A. Diabetes mellitus and cardiovascular disease. **European Journal of Internal Medicine**, v.13, p.15–30, 2003.

WANG, J.; SONG, Y.; WANG, Q.; KRALIK, P. M.; EPSTEIN, P. N. Causes and Characteristics of Diabetic Cardiomyopathy. **Rev. Diabetic. Stud.** v.3, p. 108-117, 2006.

WEI, M.; ONG, L.; SMITH, M. T.; ROSS, F. B.; SCHMID, K.; HOEY, A. J.; BURSTOW, D.; BROWN, L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart, lung and circulation**, v. 12, p.4-50, 2003.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-53, 2004.

YANG, J.; YEH, H.; LIN, K. WANG, P. H. Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: Implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. **J. Molec. Cell. Card.** v. 46, p. 919–926, 2009.

ZHU, D.; KIM, Y.; STEFFES, M.W., et al. Glomerular distribution of type IV collagen in diabetes by high resolution quantitative immunochemistry. **Kidney Int.**, v.45, p.425-33, 1994.