

Camila Gimenes

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A
REMODELAÇÃO CARDÍACA E A ATIVIDADE OXIDATIVA EM
RATOS DIABÉTICOS**

Orientador: Prof. Adjunto Katashi Okoshi

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Angélica H. Fernandes



Botucatu – São Paulo
2012

Camila Gimenes

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A
REMODELAÇÃO CARDÍACA E A ATIVIDADE OXIDATIVA EM
RATOS DIABÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
“Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, para
obtenção de título de Doutor em Fisiopatologia em
Clínica Médica – Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Adjunto Katashi Okoshi

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Angélica H. Fernandes

Botucatu – São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Gimenes, Camila.

Influência do exercício físico sobre a remodelação cardíaca e a atividade oxidativa em ratos diabéticos / Camila Gimenes. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Katashi Okoshi

Co-orientador: Ana Angélica Henrique Fernandes

Capes: 40101100

1. Stress oxidativo. 2. Diabetes. 3. Coração – Doenças. 4. Exercícios físicos.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Experimental; Miocardiopatia diabética; Ratos; Remodelamento cardíaco; Treinamento físico.



Dedicatória

A Deus,

*que me levantou em todos os tombos, que me
fortificou em todas as minhas fraquezas, que
me mostrou que o maior dom do ser humano é ser
perseverante em todos momentos da vida.*

*Aos meus pais, Luci e José Luiz, pelo apoio,
encorajamento, amor e pelos ensinamentos que
formaram os alicerces de minha história.*



Agradecimentos

Ao Prof. Adjunto Dr. **Katashi Okoshi** pela excelente orientação e dedicação em todos os momentos. Agradeço pela imensa contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional, e pelos exemplos passados que pretendo seguir durante minha caminhada acadêmica.

À Prof^a. Dr^a. **Ana Angélica Henrique Fernandes** pela co-orientação.

À Prof^a. Adjunta Dr^a. **Marina Politi Okoshi**, por toda contribuição e ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. **Meliza Goi Roscani** e ao Prof. Dr. **João Hueb** pelas valiosas contribuições no exame de qualificação, importantes para a redação final da tese.

Ao meu irmão **Rodrigo Gimenes** pela ajuda fundamental na realização das técnicas laboratoriais.

Aos amigos e companheiros incansáveis **Camila M. Rosa, Dijon Campos e Gabriel N. Guirado**, que sempre colaboraram prontamente para realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório: **Fernanda, Dani Tomaz, Dani Guizoni, Camila Bonomo, Marcelo, Aline, Ana Paula, Silvio, Bruno, Ariane, Priscila, Ricardo, Luana**. Muito obrigada pelo apoio e colaboração na realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica: **José Carlos, Corina, Elenize, Camila, Mário, Rogério, De Lalla, Ângelo, José Aparecido, Sueli Clara, Denise, Vitor, Marta e Sandra**, por todo apoio prestado.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica: **Alexandre L. Loureiro, Ana Maria Mengue, Bruno José Fajiolli, Elisângela A. Silva, Laura A. Câmara, Mário A. Dallaqua, Renato B. Pereira** e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela atenção e profissionalismo.

Ao **CNPQ** e a **CAPES**, pelo suporte financeiro recebido durante a elaboração da pesquisa.

A toda minha família, que sempre me incentivou e torceu pela minha vitória.

A todos amigos que estiveram ao meu lado durante essa caminhada e que agora vibram com a minha conquista.



Sumário

Lista de abreviatura e siglas.....	iii
Resumo.....	1
Abstract.....	4
Introdução.....	7
Objetivo.....	12
Material e métodos.....	14
Resultado.....	27
Discussão.....	50
Conclusão.....	59
Referências bibliográficas.....	61

Lista de Abreviaturas e Siglas



AE:	diâmetro do átrio esquerdo
AGE:	produtos finais da glicação avançada
ANOVA:	análise de variância
AO:	diâmetro da aorta
BHT:	butilato hidroxitolueno
$[Ca^{+2}]_o$:	concentração extracelular de cálcio
$CaCl_2$:	cloreto de cálcio
CO_2 :	gás carbônico
CS:	grupo controle sedentário
CT:	grupo controle treinado
DDVE:	diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DM:	diabetes mellitus
DS	grupo diabético sedentário
DSVE:	diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
DT	grupo diabético treinado
+dT/dt:	derivada positiva máxima da tensão desenvolvida
-dT/dt:	derivada negativa máxima da tensão desenvolvida
E/A:	razão entre as ondas E e A
EDPP:	espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo
EDSIV:	espessura diastólica do septo interventricular
EDTA:	ácido etilenodiamino tetra-acético
EF:	exercício físico
ERO:	espécies reativas de oxigênio
Esp. Rel. VE:	espessura relativa do ventrículo esquerdo
FC:	frequência cardíaca

FCI:	fração de colágeno intersticial
FE:	fração de ejeção
Fe ²⁺ :	sulfato ferroso amoniacal
GF:	glicemia final
GI:	glicemia inicial
GSH:	glutathiona reduzida
GSH-Px:	glutathiona peroxidase
GSSG:	glutathiona oxidada
HDL:	lipoproteína de alta densidade
HOP VE:	concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
IMVE:	índice de massa do ventrículo esquerdo
KCl:	cloreto de potássio
LDL:	lipoproteína de baixa densidade
LOOH:	hidroperóxido de lipídio
Min:	minuto
MgSO ₄ :	sulfato de magnésio
MVE:	massa do ventrículo esquerdo
NaCl:	cloreto de sódio
NADPH ₂ :	metilenotetraidrofolato redutase
NaHCO ₃ :	bicarbonato de sódio
NBT:	nitroblue-tetrazólico
O ₂ ⁻ :	radical superóxido
O ₂ :	oxigênio

Onda A:	pico de velocidade do fluxo transmitral decorrente da contração atrial
Onda E:	pico de velocidade de fluxo transmitral na fase de enchimento inicial
PAS:	pressão arterial sistólica
PC:	peso corporal
PCF:	peso corporal final
PCI:	peso corporal inicial
PP30:	pós pausa de 30 segundos
SERCA-2a:	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
SOD:	superóxido dismutase
STZ:	estreptozotocina
TD:	tensão desenvolvida máxima
TDE:	tempo de desaceleração da onda E
Tei:	índice de performance miocárdica
TPT:	tempo para atingir o pico de tensão desenvolvida
TR:	tensão de repouso
TRIV:	tempo de relaxamento isovolumétrico
TRIVn:	TRIV normalizado pela frequência cardíaca
VD:	ventrículo direito
VE:	ventrículo esquerdo
VEPP:	velocidade de encurtamento da parede posterior
VLDL:	lipoproteína de densidade muito baixa
%Δ endo:	porcentagem de encurtamento endocárdico



Resumo

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio caracterizado por resposta secretória inadequada de insulina, que se manifesta pela utilização inapropriada de glicose pelos tecidos com consequente hiperglicemia. Além das alterações cardíacas e vasculares, o DM pode acarretar doença miocárdica não aterogênica, denominada miocardiopatia diabética. Um dos principais mecanismos desencadeadores de alterações miocárdicas é o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Na prevenção das complicações crônicas do DM, o exercício físico (EF) regular tem papel fundamental. Em estudos experimentais, ratos com DM induzido por estreptozotocina (STZ) e submetidos à EF têm apresentado melhora na homeostase miocárdica de glicose e da função cardíaca. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do EF sobre remodelação cardíaca, variáveis bioquímicas e atividade oxidativa em ratos diabéticos. Foram utilizados ratos Wistar divididos em quatro grupos: 1) controle sedentário (CS, n=14); 2) controle treinado (CT, n=13); 3) diabético sedentário (DS, n=19); e 4) diabético treinado (DT, n=18). O diabetes foi induzido por STZ e o protocolo de EF foi aplicado durante nove semanas. A avaliação estrutural e funcional *in vivo* do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada por ecocardiograma. O estudo funcional *in vitro* foi realizado pela avaliação do músculo papilar do VE. Para análise de variáveis anatômicas foram medidos os pesos úmidos e secos do VE, ventrículo direito, átrios e amostras de fígado e pulmão. Amostras do VE foram utilizadas para medidas do diâmetro dos miócitos, do colágeno miocárdico e da concentração de hidroxiprolina. O estresse oxidativo miocárdico foi avaliado pela dosagem de hidroperóxido de lipídio (LOOH), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPH-Px) e catalase. No soro dos animais foram dosados glicose, colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides. Ao final do experimento, o peso corporal (PC) foi estatisticamente menor e a glicemia maior nos animais diabéticos. O EF reduziu a glicemia nos diabéticos. O estudo ecocardiográfico mostrou aumento do diâmetro diastólico do VE e de sua massa, normalizados pelo PC, nos animais diabéticos e o EF não interferiu nesses índices. O diâmetro do átrio esquerdo foi maior nos diabéticos e o EF normalizou essa variável. A velocidade de encurtamento da parede posterior do VE foi menor nos animais diabéticos. Na análise do músculo papilar, ocorreu comprometimento contrátil e de relaxamento nos animais diabéticos, tanto na condição basal quanto nas manobras inotrópicas. O EF não causou diferenças nos índices funcionais. No estudo anatômico, os pesos do VE e do ventrículo direito foram menores nos

diabéticos. Os pesos do VE e dos átrios normalizados pelo PC foram maiores nos diabéticos. A relação peso úmido/seco do pulmão e átrios foram maiores no DS vs. CS e o EF foi capaz de normalizar essa relação nos átrios. A concentração de hidroxiprolina e o diâmetro dos miócitos não apresentaram diferença entre os grupos. As análises da atividade oxidativa no VE mostraram aumento do LOOH e diminuição da GPH-Px nos grupos CT e DS em relação ao grupo CS. Os valores de catalase e SOD mostraram-se menores nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. O EF foi benéfico em todas as variáveis do estresse oxidativo nos animais diabéticos. A análise bioquímica mostrou aumento do colesterol total nos grupos diabéticos e o EF causou redução dessa variável sem normalizá-la. Os valores de triglicérides foram maiores no grupo DT em relação ao CT. O HDL-colesterol foi menor no DS em relação ao CS e o EF foi capaz de normalizá-lo. Concluindo, no modelo experimental de diabetes mellitus em ratos ocorre remodelação cardíaca associada a alterações bioquímicas e aumento do estresse oxidativo, que são em parte atenuados ou normalizados pelo exercício físico.

Palavras-chave: estresse oxidativo, experimental, miocardiopatia diabética, ratos, remodelamento cardíaco, treinamento físico.



Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a disorder characterized by inadequate insulin secretory response, manifested by inappropriate use of glucose by tissues with consequent hyperglycemia. In addition to cardiac and vascular changes, DM can cause a non-atherogenic myocardial disease, named diabetic cardiomyopathy. One of the main mechanisms responsible for myocardial changes is the increased production of reactive oxygen species (ROS). Physical exercise (PE) plays an important role in preventing diabetes chronic complications. In experimental studies, rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes subjected to PE have shown improved myocardial glucose homeostasis and cardiac function. The aim of this study was to evaluate the influence of PE on cardiac remodeling, biochemical variables, and oxidative stress in diabetic rats. Wistar rats were divided into four groups: 1) sedentary control (SC, n=14); 2) trained control (TC, n=13); 3) sedentary diabetic (SD, n=19); and 4) trained diabetic (TD, n=18). Diabetes was induced by STZ and PE protocol was applied for nine weeks. The *in vivo* cardiac structures and left ventricular (LV) function were assessed by echocardiography. The *in vitro* myocardial function was evaluated in LV papillary muscle preparation. For anatomical variables analysis, wet and dry weights of LV, right ventricle, atria, and samples of liver and lung were measured. LV samples were used for myocytes diameter, myocardial collagen and hydroxyproline measurements. The myocardial oxidative stress was assessed by measuring lipid hydroperoxide (LOOH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPH-Px), and catalase. Serum glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides were measured. At the end of the experiment, body weight (BW) was lower and glycemia higher in diabetic animals. The PE reduced blood glucose in diabetic rats. Echocardiographic study showed an increase in LV diastolic diameter and mass, indexed by BW, in diabetic animals; PE did not affect these indices. Left atrial diameter was greater in diabetic groups and PE normalized this variable. LV posterior wall shortening velocity was lower in diabetic animals. Papillary muscle analysis showed contractile and relaxation impairment in diabetic animals at baseline and post-inotropic stimulation. PE did not cause differences in the functional indices. Anatomical study showed lower LV and right ventricle weights in diabetic groups. LV and atria weights, indexed by BW, were higher in diabetic groups. Lung and atria wet/dry weight ratios were higher in SD than SC, and PE was able to normalize this ratio in the atria. Hydroxyproline concentration and myocyte diameter did not differ between groups. Analyses of LV oxidative

activity showed increased LOOH and decreased GPH-Px in TC and SD groups compared to SC. SOD and catalase were lower in diabetics compared to respective controls. The PE in diabetic animals was beneficial for all oxidative stress parameters. Biochemical analysis showed increased total cholesterol in diabetic groups and PE attenuated this change. Triglycerides were higher in the TD group compared to TC. HDL-cholesterol was lower in SD compared to SC and PE was able to normalize it. In conclusion, the experimental model of diabetes mellitus in rats is associated with cardiac remodeling, biochemical changes, and increased oxidative stress, which are partially attenuated or normalized by physical exercise.

Key-words: oxidative stress, experimental, diabetic cardiomyopathy, rats, cardiac remodeling, physical training.



1. Introdução

Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio caracterizado por resposta secretória inadequada de insulina, que se manifesta pela utilização inapropriada de glicose pelos tecidos com conseqüente hiperglicemia. O DM constitui um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. A sua prevalência em indivíduos adultos é elevada, afetando a produtividade e causando alto custo no tratamento da doença bem como de suas complicações, além da ocorrência de invalidez e morte prematura (Organização Mundial de Saúde, 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, no ano 2000 a prevalência de DM estava estimada em 2,8% da população mundial, equivalente a 171 milhões de pessoas. Em 2010, a estimativa de prevalência, na faixa etária dos 20 aos 79 anos de idade, era de 6,4%, correspondendo a 285 milhões de pessoas. Nessa faixa etária, em 2030, espera-se que 7,7% da população mundial sejam diabéticos, representando cerca de 439 milhões de pessoas (Wild *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2010).

No Brasil foram realizados diversos estudos a fim de mostrar a prevalência de DM na população. Na cidade de Ribeirão Preto, SP, a prevalência era de 12,1% em indivíduos de 30 a 69 anos (Torquato *et al.*, 2003), e em São Carlos, SP, na faixa etária de 30 a 79 anos, foram encontradas prevalências de DM e tolerância diminuída à glicose de 16,6% e 6,2%, respectivamente (Bosi *et al.*, 2009). De acordo com dados do DATASUS, em 2009 a prevalência de DM era de 9,5% na população brasileira acima de 34 anos de idade (DATASUS, 2010).

Os distúrbios do metabolismo da glicose podem causar complicações que envolvem doenças vasculares e cardíacas, incluindo hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca, sendo que em 75% dos pacientes diabéticos o óbito decorre de algum evento cardiovascular (Kannel *et al.*, 1974; Giugliano *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1999; Peter *et al.*, 2009).

Dentre os diversos problemas cardíacos que podem ser causados pelo DM, o comprometimento miocárdico não relacionado à aterosclerose, denominada miocardiopatia diabética, é observado como forma única de doença cardíaca em aproximadamente 30% dos pacientes com DM insulino-dependente (Tesfamariam, 1994). Tais indivíduos apresentam, precocemente, anormalidade na função diastólica, seguida de disfunção sistólica do ventrículo esquerdo (Thompson *et al.*, 1995; Cosentino *et al.*, 1997). Muitos pesquisadores têm se dedicado ao estudo dos mecanismos responsáveis pela doença miocárdica do DM. Entre os prováveis fatores responsáveis pela miocardiopatia diabética podem ser citados o comprometimento da produção energética, causado pela diminuição da respiração mitocondrial e da atividade da enzima piruvato desidrogenase, alterações na homeostase de cálcio intracelular e alterações nas proteínas contráteis do miocárdio (Fein *et al.*, 1980; Pierce *et al.*, 1985; Norby *et al.*, 2002). Além disso, o diabetes pode induzir alterações cardíacas como fibrose intersticial, hipertrofia miocárdica, doença microvascular e disfunção autonômica (Codinach-Huix & Freixa-Pamias, 2002).

Um dos principais mecanismos desencadeadores de alterações miocárdicas supracitadas é o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) causado por alterações no metabolismo energético induzidas pelo DM. A instalação do estresse oxidativo é decorrente de desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (Halliwell & Whiteman, 2004).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. O hidroperóxido de lipídio (LOOH) é o produto primário da peroxidação lipídica e sua decomposição resulta em produtos de maior reatividade e toxicidade, como os radicais peroxila.

O sistema de defesa antioxidante, que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPH-Px), tem objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos aumentem e tornem-se irreparáveis (Green K *et al.*, 2004; Halliwell & Whiteman, 2004).

Evidências sugerem que o DM está associado à formação aumentada de ERO, em decorrência do aumento na produção mitocondrial do ânion superóxido, além de falhas no sistema antioxidante como reduções da GPH-Px, SOD e catalase (Baynes, 1991; Brownlee, 2001). Os quatro principais mecanismos responsáveis pelos danos oxidativos no DM são: glicação não enzimática de proteínas e lípidos, e auto-oxidação da glicose, com consequente formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs); aumento do fluxo através da via dos polióis; ativação de isoformas da proteína C quinase; e aumento do fluxo da via das hexosaminas (Wolff *et al.*, 1981; Wolff & Dean, 1987; Brownlee, 2001; Baynes, 2003).

O estilo de vida fisicamente ativo constitui importante fator na redução de uma série de distúrbios cardíacos. Estudos sugerem que o exercício físico (EF) é uma conduta não farmacológica importante no tratamento de diferentes doenças como DM, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca, pelos seus benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos (Blair & Connely, 1996; Wallberg-Hriksson *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2004).

Na prevenção das complicações crônicas do DM, a atividade física regular tem papel fundamental, assim como o controle glicêmico satisfatório, por meio de medicamento, dieta adequada e controle de peso corporal. O Diabetes Prevention Program mostrou redução de 58% na incidência de DM tipo 2 frente à modificação de hábitos alimentares e à prática de atividade física regular, influenciando nas estatísticas de mortalidade por essa causa (Knowler *et al.*, 2002).

Em estudos experimentais, ratos com DM induzido por estreptozotocina (STZ) e submetidos ao treinamento físico regular têm apresentado melhora na homeostase miocárdica de glicose e da função cardíaca (Paulson *et al.*, 1988; Broderick *et al.*, 2005). Além disso, o exercício físico atenua a inflamação e as alterações ultraestruturais da matriz extracelular e das mitocôndrias no miocárdio ventricular de animais diabéticos, associadas a aumento da defesa antioxidante endógena (Atalay *et al.*, 2004; Searls *et al.*, 2004). Assim como em humanos, o EF regular reduz a glicemia, pressão arterial, peso corporal, gordura corporal e mobiliza o tecido adiposo visceral e abdominal (Li *et al.*, 2003; Despres, 2005).

Os relatos da literatura referem-se a estudos que avaliaram isoladamente vários aspectos da miocardiopatia diabética, incluindo as repercussões do EF. No entanto, não é do nosso conhecimento estudos que avaliaram conjuntamente as funções *in vivo* e *in vitro* do ventrículo esquerdo, aspectos histológicos do miocárdio, bioquímicos e atividade oxidativa de ratos diabéticos submetidos ao treinamento físico.

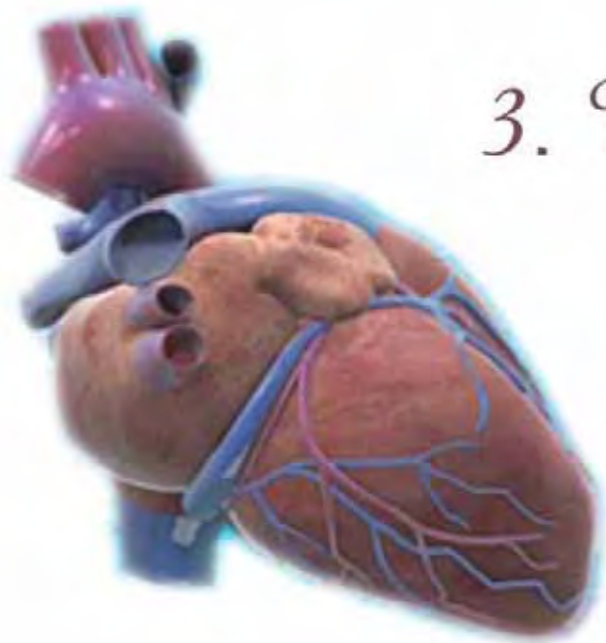
Diante do exposto, a hipótese deste estudo é que o EF atenua remodelação cardíaca, variáveis bioquímicas e atividade oxidativa de ratos com DM.



2. Objetiva

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do exercício físico sobre remodelação cardíaca, variáveis bioquímicas e atividade oxidativa em ratos diabéticos.

3. Material e Métodos



Animais e Constituição dos Grupos

Foram utilizados 80 ratos Wistar, machos, com peso corporal (PC) inicial de 337 ± 19 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (protocolo nº 712, 27/11/2008).

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Controle sedentário (CS, n=15): ratos que receberam ração comercial e água *ad libitum* e que não realizaram EF;
- Controle treinado (CT, n=15): ratos que receberam ração comercial e água *ad libitum* e realizaram EF;
- Diabético sedentário (DS, n=25): ratos diabéticos que receberam ração comercial e água *ad libitum* e não realizaram EF;
- Diabético treinado (DT, n=25): ratos diabéticos que receberam ração comercial e água *ad libitum* e realizaram EF.

A indução de DM foi realizada por meio da administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (*Sigma Chemicals Co.*), em dose única, na concentração de 50 mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato 0,1M pH 4,5 (Hebden et al., 1986; Ozdemir et al., 2005; Fernandes et al., 2010). Nos grupos controle foi injetado somente tampão citrato. As amostras de sangue foram retiradas, após 5 dias, por punção da cauda e a glicemia foi determinada através de glicosímetro *Advantage®*. Os animais que apresentaram concentração de glicose acima de 220 mg/dL foram considerados diabéticos (Babu & Srinivasan, 1999).

Os animais foram alojados em gaiolas (dois ratos por gaiola), sendo mantidos em ambiente com temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo controlados (ciclo de 12/12 horas claro/escuro invertido), com água e ração comercial oferecidos *ad libitum*.

Após confirmação do estado diabético, os ratos pertencentes aos grupos CT e DT iniciaram o EF em uma esteira rolante construída pelo CTEC (Centro Tecnológico e Engenharia Clínica – Núcleo de Botucatu – UNESP). A esteira foi montada com chapas de aço, inversor de frequência marca WEG, modelo CFW 08, contendo cinco baias individuais (Figuras 1 e 2).



Figura 1. Esteira rolante



Figura 2. Imagem das baias

Foi utilizado o protocolo de treinamento descrito por Tancrede *et al.* (1982), modificado por Costa *et al.* (2004) e adaptado diante das condições de nossos

animais diabéticos. A duração e a velocidade das sessões de treinamento físico foram:

- semana 1 – adaptação: 8 minutos (min), 8 m/min;
- semana 2: 10 min, 10 m/min;
- semana 3: 12 min, 10 m/min;
- semana 4: 13 min, 10m/min;
- semana 5: 14 min, 11m/min;
- semana 6: 15 min, 11 m/min;
- semana 7: 15 min, 11 m/min;
- semana 8: 17 min, 11 m/min;
- semana 9: 18 min, 11 m/min.

O treinamento foi aplicado uma vez ao dia e cinco dias por semana.

Os ratos dos grupos sedentários foram mantidos no mesmo ambiente que os animais treinados e eram posicionados na esteira desligada uma vez por semana. Dessa forma, todos os animais foram expostos às condições ambientais semelhantes.

Aferição da Pressão Arterial

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada no final do período experimental. Esse procedimento foi realizado na cauda do animal utilizando-se o método da pletismografia (Pfeffer *et al.*, 1971). Os ratos foram colocados em uma caixa de madeira à temperatura de 40° C por 5 min, com a finalidade de causar vasodilatação da artéria caudal. Para medida da PAS foi utilizado o esfigmomanômetro *Narco Bio-System*[®], modelo 709-0610 (*International Biomedical Inc.*, USA). O manguito foi posicionado em torno da cauda e conectado a um

transdutor de pressão (*Gould*, OH, USA). O registro das curvas de pressão arterial foi feito por um polígrafo (*Gould*, modelo RS 3200, OH, USA).

Estudo Ecocardiográfico

O ecocardiograma foi realizado no final do período experimental. Os ratos foram submetidos à anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do exame. Foi utilizado o equipamento modelo HDI-5000 da *Philips*, equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5-12 MHz. Para avaliar as medidas estruturais do coração foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal, eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares (de Simone *et al.*, 1992; Litwin *et al.*, 1995). As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas no modo-M foram registradas em impressora modelo UP-895 da *Sony Co.* Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro (*Mitutoyo*, Japan). As seguintes estruturas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV); diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula $[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio (Litwin *et al.*, 1995; de Paiva *et al.*, 2003). O índice de MVE (IMVE) foi calculado normalizando a MVE para o peso corporal. A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices:

1) porcentagem de encurtamento endocárdico ($\%\Delta \text{ endo}$) = $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$; 2) fração de ejeção (FE) = $[(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3]$; 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior do VE. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de desaceleração da onda E (TDE); 3) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV); e TRIV normalizado pela frequência cardíaca (TRIVn) = $TRIV/R-R^{0.5}$. O índice de performance miocárdica, que avalia conjuntamente as funções sistólica e diastólica do VE, foi calculado pela seguinte equação: $(TCI + TRIV) / TEJ$, onde TCI e TEJ indicam tempo de contração isovolumétrica e tempo de ejeção, respectivamente.

Estudo do Músculo Isolado

Este estudo foi realizado dentro de 48 horas após a realização do ecocardiograma, de acordo com os procedimentos rotineiramente realizados em nosso laboratório (Cicogna *et al.*, 2000; Cicogna *et al.*, 2001; Sugizaki *et al.*, 2005). Após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), o tórax foi aberto, o coração removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit, à temperatura de 28°C, previamente oxigenada (10 min) com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂). A composição da solução de Krebs-Henseleit, (Krebs & Henseleit, 1932) em milimoles por litro, é: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,52 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 25,88 NaHCO₃. Após dissecação do ventrículo direito e corte no septo interventricular, o VE foi dividido em duas partes, cada uma contendo o seu músculo papilar e, em seguida, dissecados numa placa de vidro contendo solução descrita acima. Os músculos papilares, após terem as suas extremidades presas aos anéis de aço inoxidável, foram transferidos para câmara de vidro contendo

solução de Krebs-Henseleit, constantemente oxigenada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 e mantida à temperatura de 28° C, graças ao uso de banho circulante. Os músculos papilares foram mantidos em posição vertical na câmara de vidro. O anel inferior foi ligado a fio de aço inoxidável de 0,31 mm de diâmetro, conectado a transdutor de força (Kyowa 120T-20B) e o superior conectado a fio de aço, semelhante ao anterior, preso à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica. Sobre essa extremidade havia um micrômetro que, controlando a extensão dos movimentos da alavanca, permitiu ajustar o comprimento do músculo na fase de relaxamento muscular. O estiramento inicial da fibra cardíaca foi realizado com carga de pequeno peso (pré-carga) suspensa na extremidade do braço curto da alavanca, acoplado ao transdutor de comprimento (Hewlett Packard, modelo 7 DCDT-050), medindo variações de comprimento durante as contrações musculares. Os músculos foram estimulados 12 vezes por min por meio de eletrodos de platina tipo agulha, acoplados a estimulador elétrico, programado para liberar estímulos em onda quadrada de 5 ms, com voltagem aproximadamente 10% maior que o mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. Os músculos papilares foram estudados em contrações isométricas registradas em um polígrafo através de um transdutor de força. Os índices de contração avaliados foram: tensão desenvolvida máxima (TD); derivada positiva máxima de tensão desenvolvida (+dT/dt); e tempo para atingir o pico de tensão desenvolvida (TPT). O relaxamento muscular foi avaliado pela derivada negativa máxima da tensão desenvolvida (-dT/dt).

O estudo funcional *in vitro* foi complementado por manobras que aumentam a contratilidade miocárdica, com a finalidade de avaliar a reserva contrátil. Após o período de estabilização, foi realizada a manobra de pós-pausa, a qual consiste em permitir que o músculo fique em repouso durante 30 segundos, e a primeira

contração após esse período foi analisada. Passados 5 min, foi trocada a solução nutriente de Krebs-Henseleit para outra com 0,625 mM de cálcio, estabilizada por 10 min e iniciada a elevação de cálcio para 2,5 mM e a contração registrada após 10 min. Após essa manobra, o músculo foi submetido a solução de 1,25 mM de cálcio, deixando estabilizar por 10 min antes de dar início a manobra com isoproterenol (agonista beta-adrenérgico) na concentrações de 10^{-6} M com 10 min de estabilização antes de ter a contração registrada.

Análise Histológica do Coração

Após a pesagem dos ventrículos direito e esquerdo, foram cortados fragmentos com 3 a 5 mm de espessura da parte central do VE. O material foi imerso em formalina 10% neutra e tamponada, durante 48 horas, a 4° C. Após esse período, o tecido foi lavado, desidratado e incluído em parafina. Cortes histológicos com 5 a 7 μ m de espessura foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, para quantificação do diâmetro dos miócitos, e à coloração por *picrosirius red* para quantificação do colágeno miocárdico.

A análise morfológica foi realizada utilizando-se uma câmara de vídeo acoplada ao microscópio *Leica*, com objetiva 40X, conectado ao computador equipado com um programa analisador de imagem (*Image-Pro Plus 3.0*, Media Cybernetics, Maryland, USA). Em secções transversas do VE, foram medidos os menores diâmetros transversos de, no mínimo, 50 fibras cardíacas em que o núcleo foi claramente identificável (Ahmet *et al.*, 2005).

Análise de Variáveis Anatômicas

O grau de hipertrofia ventricular foi avaliado pelos pesos dos ventrículos direito e esquerdo em valores absolutos e normalizados pelo peso corporal dos animais. Após a retirada do coração do tórax, os átrios foram separados e o pulmão e fragmento do fígado foram coletados para determinação da relação peso úmido/peso seco desses órgãos.

Quantificação de Hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um aminoácido presente exclusivamente no colágeno e, portanto, a determinação de sua concentração é utilizada para quantificar o colágeno miocárdico.

A concentração de hidroxiprolina foi mensurada em tecido miocárdico obtido da ponta do VE, de acordo com o método descrito por Switzer (1991), utilizando-se a técnica previamente descrita em outros trabalhos de nosso laboratório (Matsubara *et al.*, 2000; Epifanio *et al.*, 2005).

Inicialmente foram obtidas as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (diluição 60 µl HOP / 2940 µl HCl) e a solução branca (água destilada). Previamente à execução do processamento bioquímico, foi necessária a preparação dos seguintes reagentes químicos: tampão borato 0,2M (pH 8,7), tiosulfato de sódio 3,6M e o reagente de Ehrlich.

O processamento bioquímico para determinação da concentração de hidroxiprolina foi iniciado por secagem das soluções-padrão e das amostras no concentrador de amostras (*Speed Vac*). A hidrólise ácida foi realizada mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos das amostras, que foram aquecidas na

estufa à 100° C por 8 horas. A oxidação foi realizada após retirada e resfriamento dos tubos da estufa. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 min e colocadas novamente no concentrador de amostras (*Speed Vac*) por 3 horas. Retiradas as amostras, foi adicionado em cada uma, 1 ml de água destilada e tamponadas com solução tampão borato 0,2 M pH 8,7; após 20 minutos, a reação foi inibida com a solução tiossulfato de sódio 3,6 M e as amostras foram agitadas. Posteriormente, a solução foi saturada com KCl e colocada em banho-maria a 90° C. Os tubos foram resfriados e neles adicionados 2,5 ml de tolueno; em seguida, foram agitados por 5 min para a separação das fases água e tolueno. Foram retirados 1,5 ml de tolueno da solução e estes foram colocados em tubos de hemólise para serem acrescentados 0,6 ml de solução de Ehrlich. As amostras foram mantidas em repouso por 30 min a fim de se alcançar a estabilidade do cromógeno. A leitura foi realizada por espectrofotometria com filtro de 565 nm.

Obtenção de Amostras Séricas e Teciduais para Avaliações Bioquímicas

Após a anestesia dos ratos e antes da retirada do coração para estudo do músculo papilar, os animais foram decapitados e o sangue coletado. O soro foi separado por centrifugação a 4.000 rpm, por 15 min, e utilizado para determinação de glicose, triglicérides, colesterol total e HDL-colesterol. Após a obtenção do sangue e a retirada dos músculos papilares, o fígado, o pulmão e o coração foram imediatamente isolados e lavados em solução salina (0,9%) a 4° C. Logo em seguida foram pesadas amostras de VE (aproximadamente de 200 mg) e foram estocadas à -80° C. As amostras de tecido cardíaco foram homogeneizadas com auxílio de *Potter Elvehjem* com pistilo de teflon, em meio com tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm, por 10 min a -4° C, sendo o

sobrenadante utilizado para as determinações da concentração de hidroperóxido de lipídio e atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase).

Análise Bioquímica Sérica

Determinação da concentração de glicose

A glicose sanguínea, por ação da glicose-oxidase, é oxidada a ácido glicônico e forma peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado reage por ação da peroxidase com 4-aminoantepirina e com 1,4-diclorofenol. Por junção oxidativa forma-se aintipirilquinonimina, de cor vermelha. A intensidade de coloração é proporcional à concentração de glicose (Moura, 1982).

Determinação da concentração de triglicérides

Os triglicérides foram determinados através de sua hidrólise enzimática produzindo glicerol e ácidos graxos. Segundo Soloni (1971), o glicerol oxida-se com ácido periódico a formaldeído, o qual foi quantificado colorimetricamente como 3,5 diacetil-1,4 diidrolutidina.

Determinação da concentração do colesterol total

O colesterol foi determinado enzimaticamente pela colesterol oxidase com hidrólise enzimática prévia dos ésteres mediante uma lipase. A água oxigenada liberada na oxidação produz fenol oxidado e 4-aminofenazona, catalisada pela peroxidase, com formação de quinonimina vermelha (Moura, 1982).

Determinação da concentração de HDL-colesterol

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram precipitadas seletivamente pelo ácido fosfotungstico. No

sobrenadante, separado por centrifugação, encontram-se as lipoproteínas de alta densidade (HDL), onde se determinou o colesterol incorporado as mesmas (Lopes-Virella *et al.*, 1977).

Análise do Estresse oxidativo no miocárdico

Determinação de hidroperóxido de lipídio (LOOH)

Foi determinado através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol à temperatura ambiente. O Fe^{3+} formado reage com alaranjado de xilenol e forma cromógeno, cuja intensidade de coloração foi medida espectrofotometricamente (Jiang *et al.*, 1991). A concentração de hidroperóxido de lipídio foi expressa em nmol/mL.

Determinação da atividade de glutathiona peroxidase (GSH-Px – EC 1.11.1.9)

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura *et al.* (1974) na presença de peróxido de hidrogênio. A mistura de reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, NADPH_2 , azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona redutase. Através da oxidação do NADPH_2 a 340nm na presença da glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG), determinou-se a atividade da GSH-Px, expressa em U/mL.

Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Crouch *et al.* (1981), tendo como base a capacidade da enzima inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O_2^- do NBT para blue-formazana em temperatura

ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteínas totais.

Análise Estatística

Os dados numéricos são expostos como média $\pm$ desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 de acordo com a distribuição normal ou não normal. Para as comparações entre os grupos foi utilizada a técnica da análise de variância (ANOVA) complementados por cálculos ou testes recomendados para o esquema fatorial 2 X 2, de acordo com a distribuição probabilística (Zar, 1999). As comparações consideradas de interesse entre os quatro grupos foram: CS x DS; CS x CT; DS x DT; e DT x CT. Todas as conclusões estatísticas foram discutidas no nível de significância de 5% ($p < 0,05$).



4. Resultados

Neste estudo foram utilizados 80 ratos Wistar machos com PC inicial de 337 ± 19 g. O grupo CS era constituído de 15 animais, sendo que um foi a óbito. No grupo CT havia 15 animais no início do experimento, no entanto, dois não se adaptaram ao exercício na esteira e foram excluídos do estudo. O grupo DS era composto por 25 animais, sendo que quatro foram excluídos por não apresentarem elevação da glicemia com estreptozotocina e dois devido a óbito. Já no grupo DT, que contava com 25 ratos, três não apresentaram elevação da glicemia, dois morreram e dois não se adaptaram ao exercício na esteira. Portanto, o número final de animais em cada grupo experimental foi de 14 no CS, 13 no CT, 19 no DS e 18 no DT.

Peso Corporal, Glicemia e Pressão Arterial Sistólica

Os valores de PC e glicemia, iniciais e finais, assim como da pressão arterial sistólica dos quatro grupos experimentais, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Peso corporal, glicemia e pressão arterial sistólica dos animais

Variável	CS (n=13)	CT (n=12)	DS (n=12)	DT (n=16)
PCI (g)	327 ± 23	331 ± 13	336 ± 20	340 ± 20
PCF (g)	492 ± 28	467 ± 36	$390 \pm 60^*$	$356 \pm 50^{\#}$
GI (mg/dL)	109 ± 11	108 ± 14	103 ± 12	102 ± 12
GF (mg/dL)	127 ± 12	162 ± 27	$493 \pm 80^*$	$408 \pm 46^{\#\$}$
PAS (mmHg)	131 ± 18	126 ± 13	135 ± 18	140 ± 22

Valores expressos em média e desvio padrão. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; GI: glicemia inicial; GF: glicemia final; PAS: pressão arterial sistólica. *: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT; §: $p < 0,05$ vs. DS (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao PC inicial entre os grupos. O PC final apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo menor no grupo DS em relação ao CS, e menor no grupo DT em relação ao grupo CT (Gráfico 1).

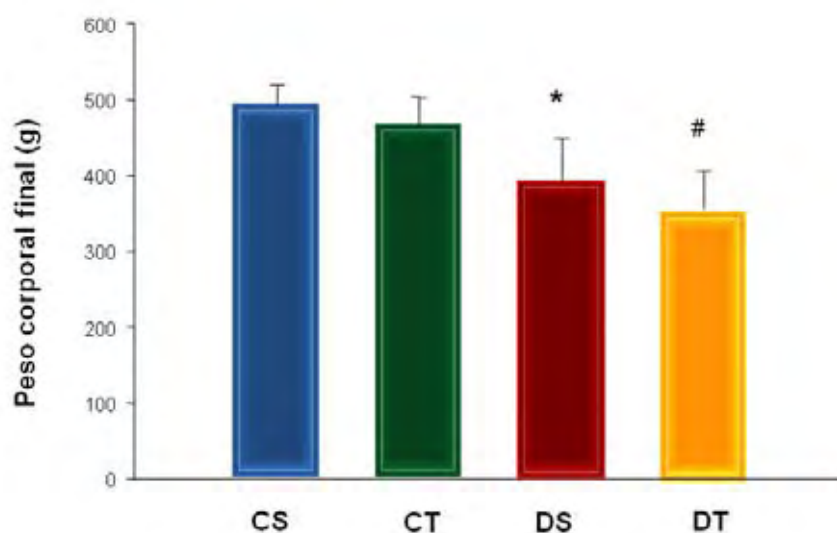


Gráfico 1: Peso corporal dos animais ao final do experimento. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT.

A glicemia inicial dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos. A glicemia final foi maior nos animais diabéticos em relação aos grupos controles, e o EF reduziu os valores de glicemia somente nos animais diabéticos (Gráfico 2).

A pressão arterial sistólica, medida ao final do período experimental, não foi estatisticamente diferente entre os grupos (Gráfico 3).

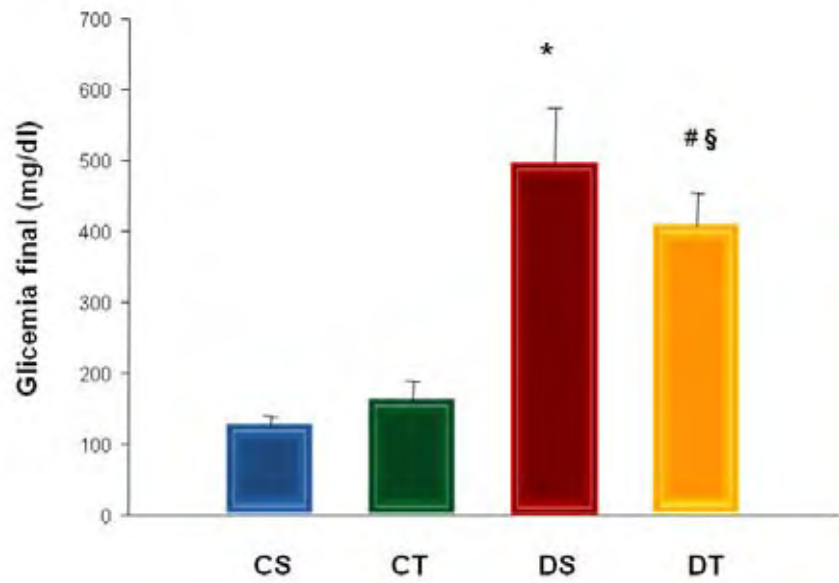


Gráfico 2: Glicemia dos animais ao final do experimento. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.*: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT; §: $p < 0,05$ vs. DS.

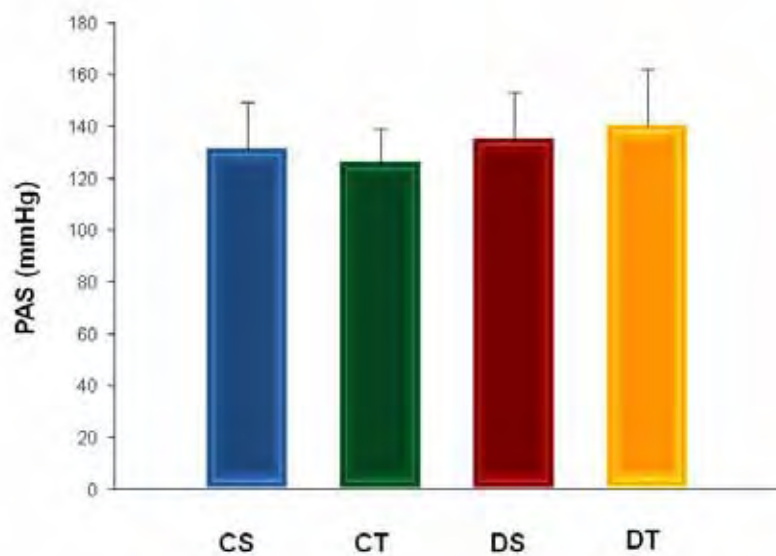


Gráfico 3: Pressão arterial sistêmica (PAS). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.

Avaliação Ecocardiográfica

A Tabela 2 apresenta as variáveis estruturais cardíacas obtidas por ecocardiograma. A FC não diferiu entre os grupos. Os grupos diabéticos não apresentaram diferença no DDVE em relação aos seus respectivos controles (Gráfico 4). No entanto, a normalização dos diâmetros para o PC mostrou aumento nos grupos diabéticos (Gráfico 5).

Tabela 2. Variáveis estruturais do coração obtidas por ecocardiograma ao final do período experimental

Variável	CS (n=14)	CT (n=14)	DS (n=12)	DT (n=20)
FC	276 ± 11	285 ± 21	290 ± 21	281 ± 20
DDVE	8,52 ± 0,32	8,13 ± 0,47*	8,47 ± 0,52	8,26 ± 0,33
DDVE/PC	17,4 (16,8 - 17,9)	17,5 (16,5 - 19,1)	23,2 (19,6 - 25,1)*	23,9 (22,2 - 24,8) [#]
DSVE	4,16 ± 0,52	3,97 ± 0,40	4,26 ± 0,59	4,15 ± 0,50
EDPP	1,41 ± 0,05	1,45 ± 0,07	1,49 ± 0,16	1,44 ± 0,15
EDSIV	1,44 ± 0,04	1,47 ± 0,07	1,51 ± 0,15	1,46 ± 0,13
ERVE	0,33 ± 0,02	0,36 ± 0,02*	0,35 ± 0,04	0,35 ± 0,04
AO	3,95 ± 0,18	3,82 ± 0,21	3,68 ± 0,24*	3,64 ± 0,24 [#]
AE	5,73 ± 0,49	5,67 ± 0,53	6,41 ± 0,54*	5,81 ± 0,50 [§]
AE/AO	1,45 ± 0,12	1,49 ± 0,12	1,74 ± 0,12*	1,60 ± 0,03 ^{#§}
AE/PC	11,9 (10,8 - 12,4)	11,9 (11,2 - 13,9)	17,4 (15,1 - 19,7)*	16,6 (15,2 - 18,1) [#]
MVE	0,89 (0,84 - 0,91)	0,85 (0,79 - 0,91)	0,86 (0,81 - 1,04)	0,88 (0,77 - 0,93)
IMVE	1,77 (1,74 - 1,90)	1,84 (1,70 - 2,03)	2,43 (2,10 - 2,75)*	2,38 (2,26 - 2,60) [#]

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; FC: frequência cardíaca (bpm); DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE) (mm); PC: peso corporal (kg); DSVE: diâmetro sistólico do VE (mm); EDPP: espessura diastólica da parede posterior (mm); EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular (mm); ERVE: espessura relativa da parede do VE (mm); AO: diâmetro da aorta (mm); AE: diâmetro do átrio esquerdo (mm); MVE: massa do VE (g); IMVE: índice de massa do VE (g/kg). *: p<0,05 vs. CS; #: p<0,05 vs. CT; §: p<0,05 vs. DS (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

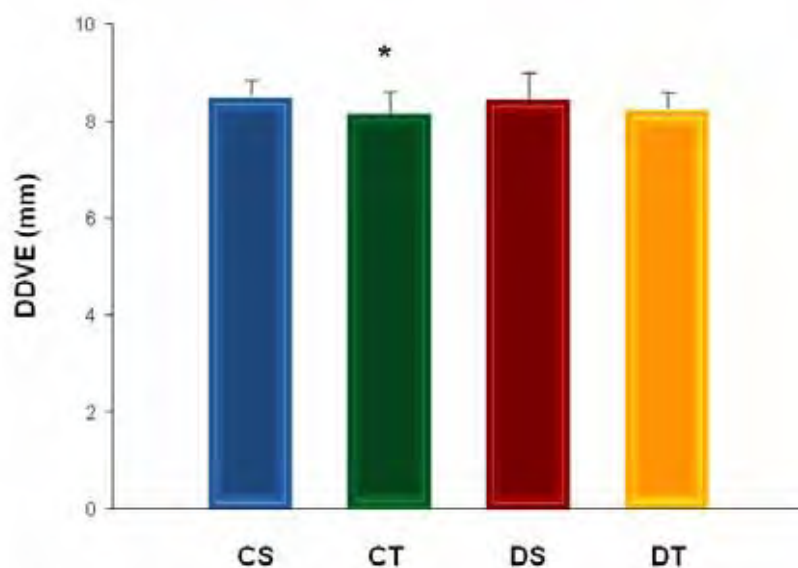


Gráfico 4: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.*: $p < 0,05$ vs. CS.

O EF reduziu o DDVE somente no grupo não diabético, acompanhado de elevação da ERVE. Não houve diferença na espessura diastólica das paredes do VE entre os grupos. O diâmetro da aorta mostrou-se menor nos grupos diabéticos. As variáveis AE, AE/AO, AE/PC mostram aumento do diâmetro do átrio esquerdo nos animais diabéticos e o EF foi capaz de reduzir esses valores nesses animais (Gráficos 6, 7 e 8).

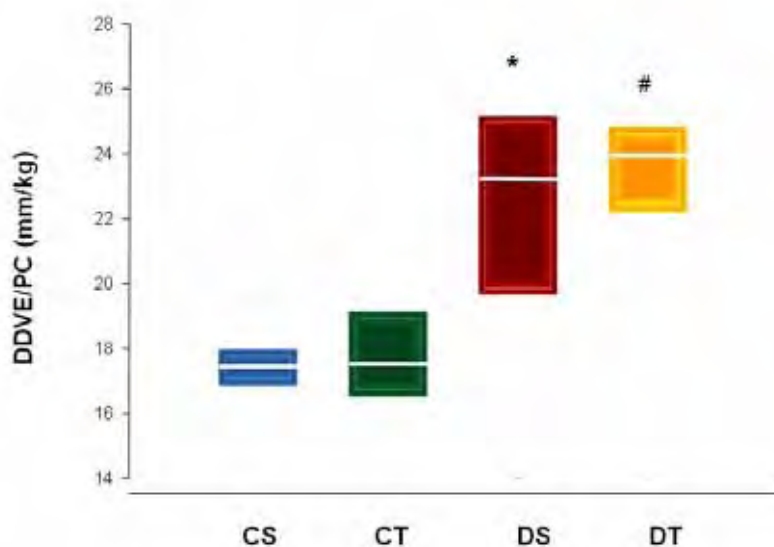


Gráfico 5: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal (DDVE/PC). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.*: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT.

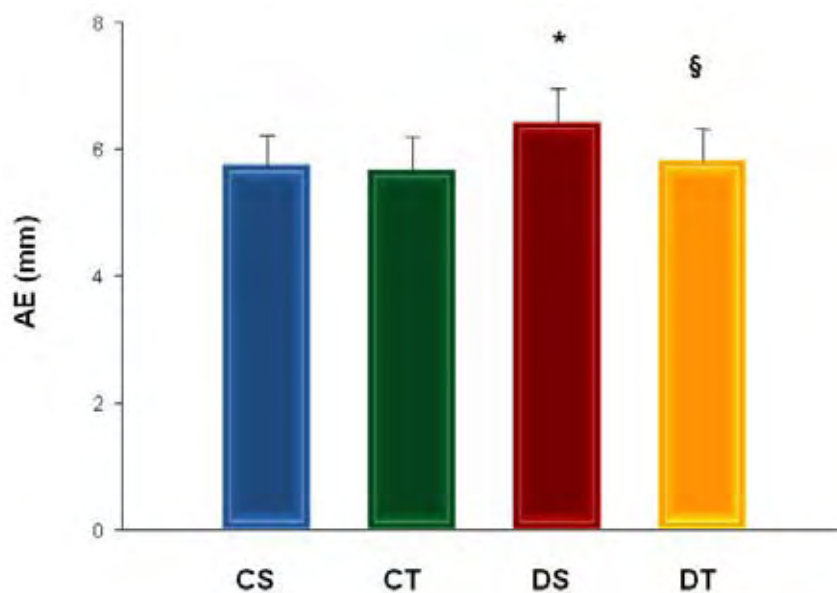


Gráfico 6: Diâmetro do átrio esquerdo (AE). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.*: $p < 0,05$ vs. CS; §: $p < 0,05$ vs. DS.

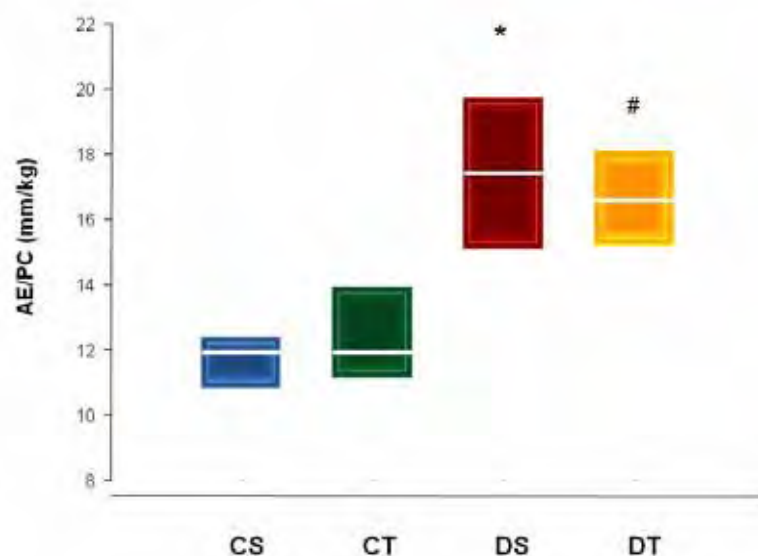


Gráfico 7: Diâmetro do átrio esquerdo normalizado pelo peso corporal (AE/PC). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.*: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT.

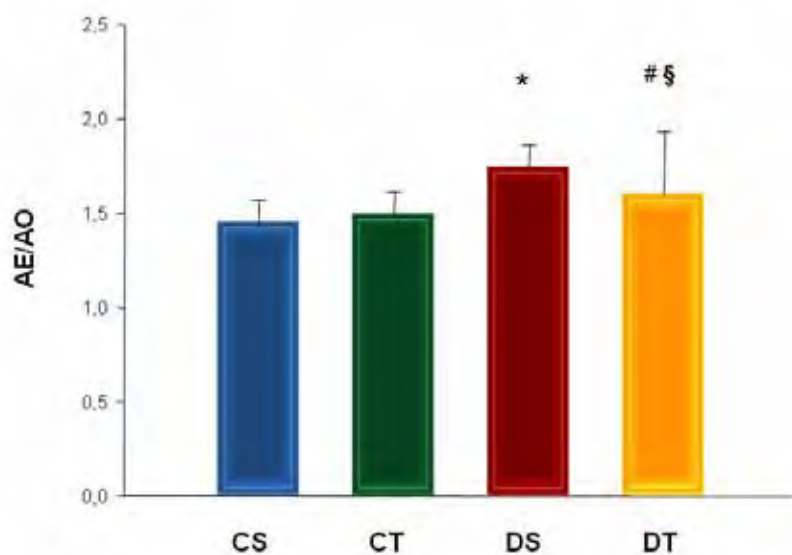


Gráfico 8: Diâmetro do átrio esquerdo/diâmetro da aorta (AE/AO). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.*: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT; §: $p < 0,05$ vs. DS.

A MVE não apresentou diferença entre os grupos, porém quando normalizada pelo PC (IMVE) os ratos diabéticos mostraram valores maiores em relação aos seus controles (Gráfico 9).

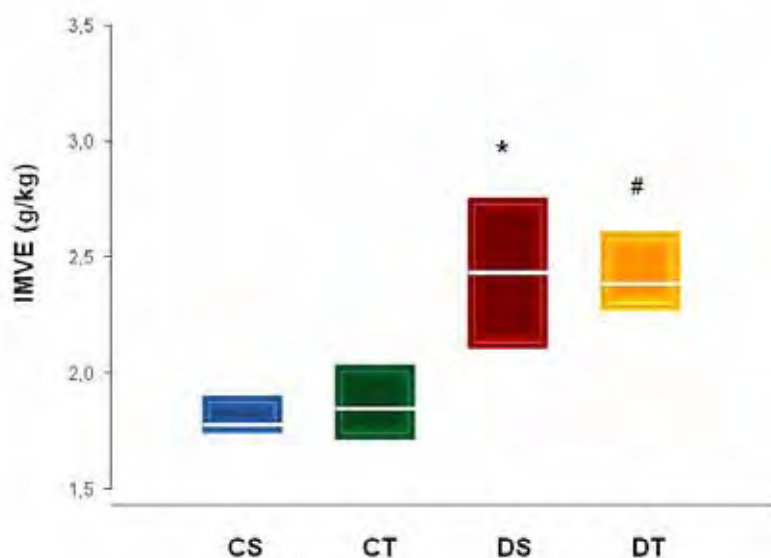


Gráfico 9: Índice de massa do ventrículo esquerdo (IMVE). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT.

Os resultados da avaliação funcional do VE por meio de ecocardiograma estão expostos na Tabela 3. Em relação à função sistólica, somente a variável VEPP mostrou-se menor nos grupos diabéticos, e o EF não interferiu nesse índice (Gráfico 10). Os índices $\% \Delta$ endo e FE não diferiram entre os grupos. Os índices de função diastólica não se mostraram diferentes entre os grupos, exceto o TRIV e o TRIVn que foram maiores no grupo DT em relação ao CT (Gráfico 11). O índice de performance miocárdica (Tei) também não diferiu entre os grupos.

Tabela 3. Variáveis funcionais do ventrículo esquerdo obtidas por ecocardiograma ao final do período experimental

Variável	CS (n=14)	CT (n=14)	DS (n=12)	DT (n=20)
%Δ endo	51,2 ± 5,14	51,3 ± 2,98	49,9 ± 4,55	49,8 ± 5,33
FE	0,88 ± 0,04	0,88 ± 0,02	0,87 ± 0,03	0,88 ± 0,04
VEPP	38,8 ± 4,02	39,4 ± 4,54	34,1 ± 2,85*	35,7 ± 4,52 [#]
E	88,1 ± 6,69	85,9 ± 3,13	85,3 ± 5,43	85,7 ± 7,21
A	58,3 ± 7,30	53,8 ± 9,26	65,2 ± 15,0	59,2 ± 8,61
E/A	1,53 ± 0,22	1,65 ± 0,32	1,35 ± 0,22	1,48 ± 0,24
TDE	47,4 ± 5,79	47,6 ± 6,70	44,7 ± 6,07	47,4 ± 8,71
TRIV	24,5 ± 3,01	25,4 ± 3,84	26,5 ± 3,58	28,3 ± 4,33 [#]
TRIVn	52,6 ± 6,64	55,2 ± 7,98	58,2 ± 7,68	61,0 ± 9,28 [#]
Tei	0,48 ± 0,06	0,52 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,58 ± 0,10

Valores expressos em média e desvio padrão. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; %Δ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico do VE; FE: fração de ejeção; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (mm/s); E: onda E do fluxo transmitral (cm/s); A: onda A do fluxo transmitral (cm/seg); E/A: razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral (ms); TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico (ms); TRIVn: TRIV normalizado pela frequência cardíaca (ms); Tei: índice de performance miocárdica (ms). *: p<0,05 vs. CS; #: p<0,05 vs. CT (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

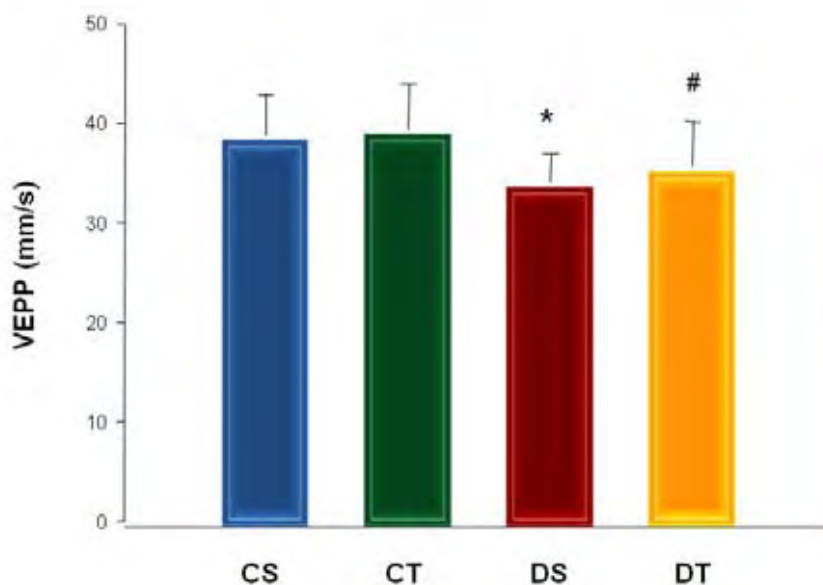


Gráfico 10: Velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo (VEPP). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: p<0,05 vs. CS; #: p<0,05 vs. CT.

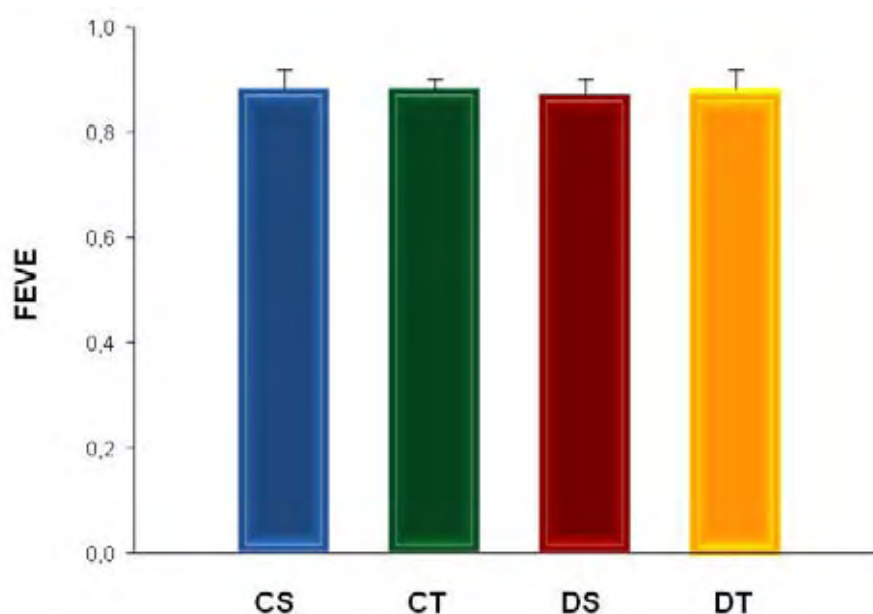


Gráfico 11: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.

Estudo funcional do músculo papilar

Os resultados obtidos do estudo funcional do músculo papilar nas condições basal e após manobras inotrópicas estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Na condição basal, o índice $+dT/dt$ foi menor nos grupos CT e DS em relação ao CS (Gráfico 12). As demais variáveis não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Gráficos 13, 14, 15 e 16). Entretanto, as manobras inotrópicas positivas permitiram mostrar comprometimento contrátil e de relaxamento nos animais diabéticos. Na manobra PP30 as variáveis TD, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ foram menores no grupo DS em relação ao CS. A elevação da concentração extracelular de cálcio para 2,5 mM causou aumento no TPT no grupo DS em relação ao CS,

mostrando alentecimento da velocidade de contração muscular. Após adição de isoproterenol, houve redução da $+dT/dt$ e $-dT/dt$ e elevação da TPT no DS em relação ao CS. O grupo DT também mostrou menor $-dT/dt$ em relação ao seu controle CT. O EF não mostrou diferença desses índices em relação aos animais diabéticos, no entanto, os valores não diferiram também dos animais exercitados não diabéticos, exceto a variável $-dT/dt$ descrita acima.

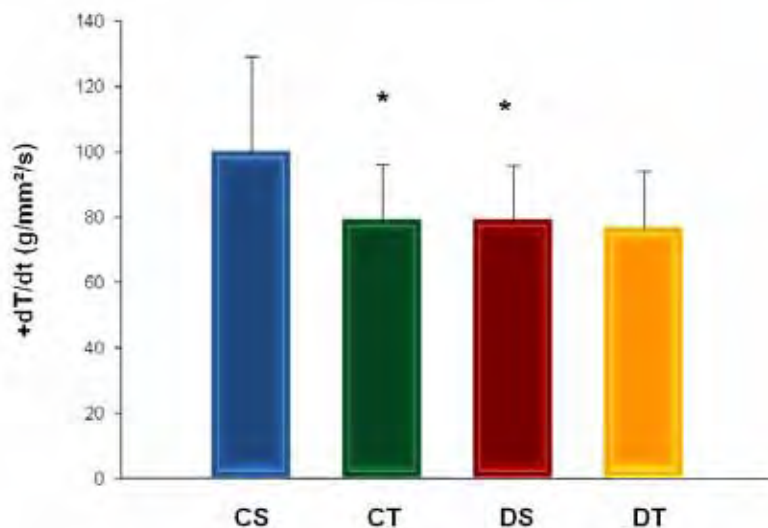


Gráfico 12: Velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida ($+dT/dt$). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS.

Tabela 4. Variáveis funcionais do músculo isolado obtidas em contrações isométricas na condição basal

Variável	CS (n=9)	CT (n=13)	DS (n=10)	DT (n=13)
TD (g/mm^2)	$8,57 \pm 2,13$	$7,13 \pm 1,82$	$7,35 \pm 1,13$	$7,23 \pm 1,53$
TPT (ms)	169 ± 15	175 ± 15	183 ± 16	176 ± 16
$+dT/dt$ ($g/mm^2/s$)	$99,9 \pm 29,1$	$78,6 \pm 17,0^*$	$78,9 \pm 16,9^*$	$76,6 \pm 17,4$
$-dT/dt$ ($g/mm^2/s$)	$32,2 (29,8-42,7)$	$29,8 (25,3-37,0)$	$27,1 (23,8-33,6)$	$28,2 (24,2-35,7)$
TR (g/mm^2)	$1,02 (0,81-1,09)$	$0,90 (0,66-1,04)$	$0,88 (0,75-0,97)$	$0,88 (0,70-0,97)$

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; TD: tensão desenvolvida máxima; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; $+dT/dt$: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; $-dT/dt$: velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso. *: $p < 0,05$ vs. CS (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

Tabela 5. Variáveis funcionais do músculo isolado obtidas em contrações isométricas sob manobras inotrópicas positivas

	Variável	CS (n=9)	CT (n=13)	DS (n=10)	DT (n=13)
PP30	TD	10,6 ± 2,37	8,68 ± 2,59	8,45 ± 1,56*	8,45 ± 1,96
	TPT	160 (160-180)	180 (170-193)	180 (17-190)	170 (170-193)
	+dT/dt	122 ± 33	94,4 ± 25,6*	90,8 ± 21,1*	88,8 ± 21,2
	-dT/dt	39,1 ± 12,2	34,1 ± 9,14	29,4 ± 6,88*	30,4 ± 7,14
	TR	0,98 (0,84-1,09)	0,91 (0,56-1,04)	0,89 (0,75-0,94)	0,89 (0,69-1,05)
[Ca²⁺]_o 2,5 mM	TD	8,97 (8,35-10,6)	8,80 (7,56-12,1)	7,73 (6,58-9,07)	8,97 (6,20-11,3)
	TPT	160 (160-180)	170 (170-180)	195 (170-200)*	170 (160-180)
	+dT/dt	119 ± 28	107 ± 36	90,3 ± 22,9	84,6 ± 37,2
	-dT/dt	36,2 (32,4-46,5)	38,3 (31,4-55,8)	32,0 (25,7-38,6)	24,6 (20,8-39,9)
	TR	0,89 ± 0,30	0,72 ± 0,34	0,68 ± 0,19	0,76 ± 0,35
Isso 10⁻⁶ M	TD	7,80 (7,08-9,86)	6,71 (5,53-9,48)	7,14 (5,95-8,46)	6,91 (6,45-8,81)
	TPT	149 ± 13	160 ± 17	167 ± 9*	167 ± 14
	+dT/dt	117 ± 26	99,5 ± 25,1	92,7 ± 22,1*	91,1 ± 17,7
	-dT/dt	58,1 ± 11,5	55,3 ± 13,6	44,4 ± 12,4*	44,3 ± 9,67 [#]
	TR	0,85 ± 0,32	0,60 ± 0,31	0,65 ± 0,18	0,73 ± 0,34

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; TD: tensão desenvolvida máxima (g/mm²); TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (ms); +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida (g/mm²/s); -dT/dt: velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida (g/mm²/s); TR: tensão de repouso (g/mm²). *: p<0,05 vs. CS; #: p<0,05 vs. CT (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

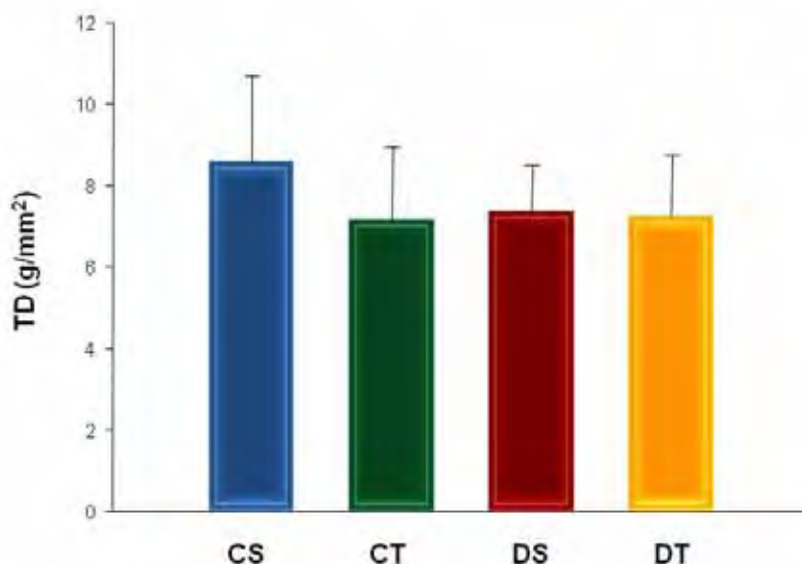


Gráfico 13: Tensão desenvolvida (TD). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.

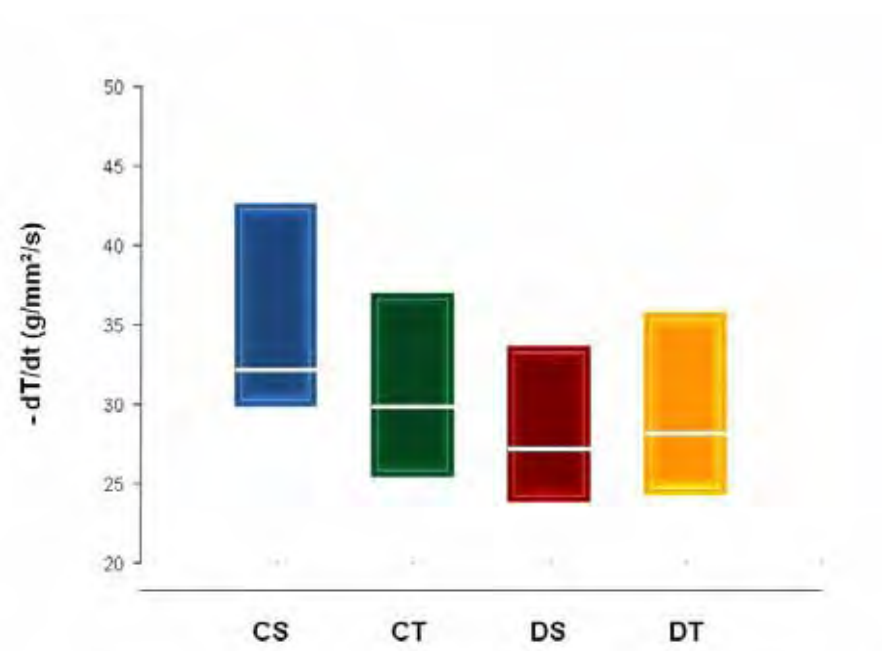


Gráfico 14: Velocidade máxima de queda da tensão desenvolvida ($-dT/dt$). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.

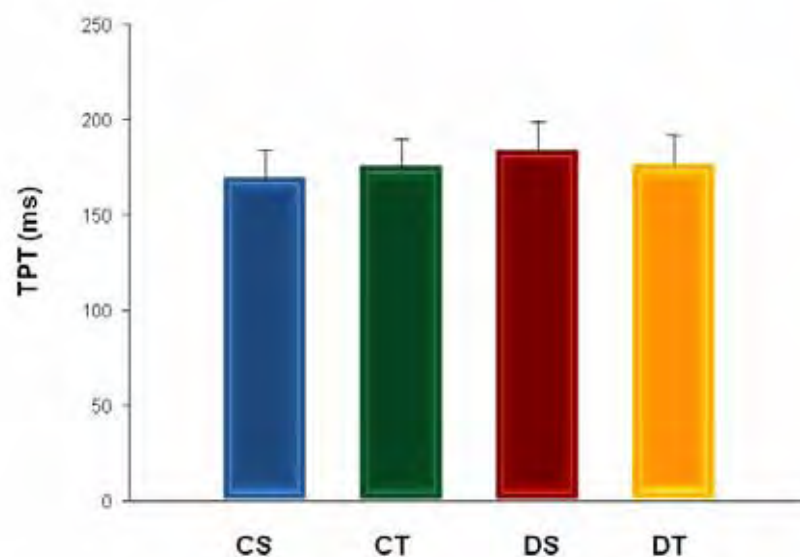


Gráfico 15: Tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.

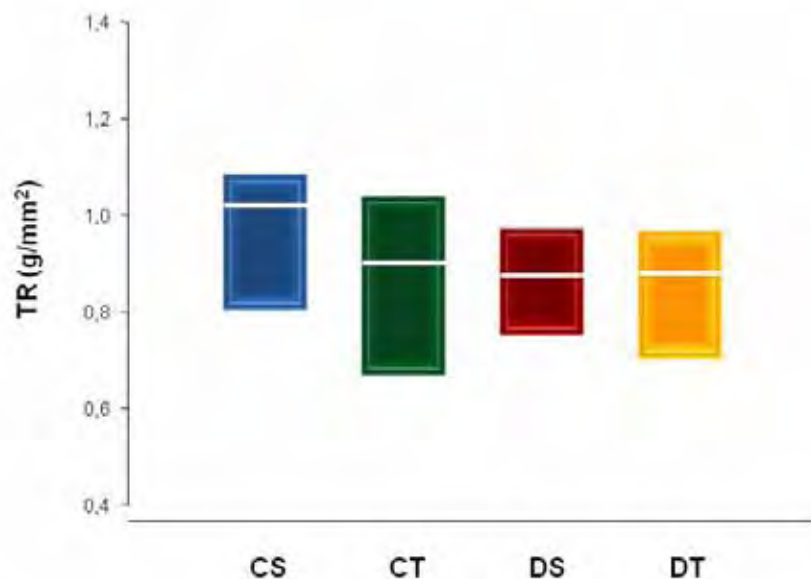


Gráfico 16: Tensão de repouso (TR), CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.

Variáveis Anatômicas

Na Tabela 6 são mostradas as variáveis anatômicas dos animais dos grupos estudados. As variáveis VE e VD mostraram-se menores nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. As variáveis VE e Átrios foram maiores quando normalizados para PC. O VD/PC não mostrou diferença entre os grupos. O peso dos átrios foi menor no grupo DT em relação ao CT e DS. A relação dos pesos úmido/seco do VE, VD e fígado não mostraram diferença entre os grupos. No entanto, essa relação dos átrios mostrou-se maior no grupo DS comparado ao CS e foi normalizada pelo EF. A relação peso úmido/seco do pulmão mostrou-se maior no grupo DS comparado ao CS, e o valor do grupo DT situou-se entre DS e CT, não havendo diferença estatística com esses grupos.

Tabela 6. Variáveis anatômicas dos animais

Variáveis	CS (n=13)	CT (n=12)	DS (n=12)	DT (n=16)
VE (g)	0,89 ± 0,07	0,86 ± 0,06	0,74 ± 0,12*	0,69 ± 0,10 [#]
VE/PC (g/kg)	1,84 ± 0,11	1,91 ± 0,17	2,10 ± 0,21*	2,18 ± 0,21 [#]
VD (g)	0,22 ± 0,07	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,02*	0,16 ± 0,04 [#]
VD/PC (g/kg)	0,45 ± 0,15	0,45 ± 0,06	0,51 ± 0,09	0,51 ± 0,12
Átrios (g)	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01 ^{#§}
Átrios/PC (g/kg)	0,20 ± 0,03	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,05*	0,26 ± 0,03 [#]
VE úmido/seco	3,94 (3,56-4,11)	3,60 (3,17-4,17)	4,06 (3,92-4,61)	3,70 (2,84-4,53)
VD úmido/seco	3,42 ± 0,65	3,60 ± 0,94	3,96 ± 1,02	3,50 ± 0,77
Átrios úmido/seco	4,48 (4,00-4,77)	4,52 (4,29-5,10)	4,87 (4,68-5,04)*	4,50 (4,14-4,76) [§]
Pulmão úmido/seco	4,55 ± 0,50	4,56 ± 0,35	4,94 ± 0,58*	4,70 ± 0,26
Fígado úmido/seco	3,06 (2,90-3,21)	3,02 (2,85-3,14)	3,16 (3,02-3,21)	2,97 (2,75-3,12)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; PC: peso corporal. *: p<0,05 vs. CS; #: p<0,05 vs. CT; §: p<0,05 vs. DS (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

Concentração de Hidroxiprolina, Fração Colágena Intersticial Miocárdica e Diâmetro dos Miócitos

A concentração de hidroxiprolina e a medida do diâmetro dos miócitos em amostras do VE dos animais não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em relação à fração de colágeno intersticial no miocárdio do VE, o grupo DT apresentou valores maiores em relação ao grupo CT (Tabela 7 e Gráficos 17-19).

Tabela 7. Concentração de hidroxiprolina, fração colágena intersticial no miocárdio e diâmetro dos miócitos

Variáveis	CS (n=8)	CT (n=8)	DS (n=8)	DT (n=8)
HOP VE (mg/g)	2,06 ± 0,50	1,96 ± 0,09	2,19 ± 0,40	2,29 ± 0,36
Miócito (diâmetro, µm)	12,7 ± 0,90	13,8 ± 1,62	13,1 ± 1,08	13,7 ± 0,69
FCI VE (%)	2,24 ± 0,40	2,56 ± 0,43	2,73 ± 0,65	3,26 ± 0,73 [#]

Valores expressos em média e desvio padrão. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; HOP VE: concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo; FCI: fração de colágeno intersticial. *: p<0,05 vs. CS; #: p<0,05 vs. CT; §: p<0,05 vs. DS (ANOVA, esquema fatorial 2x2).

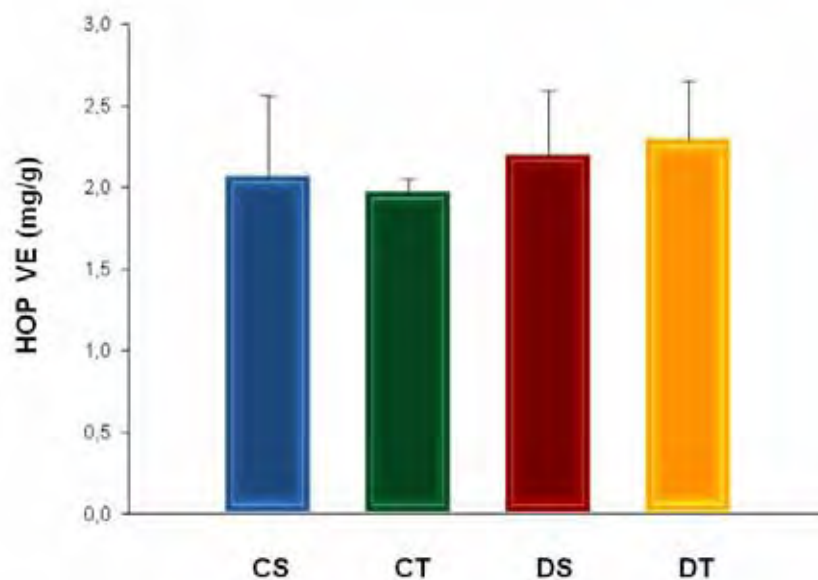


Gráfico 17: Concentração de hidroxiprolina no ventrículo esquerdo (HOP VE). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.

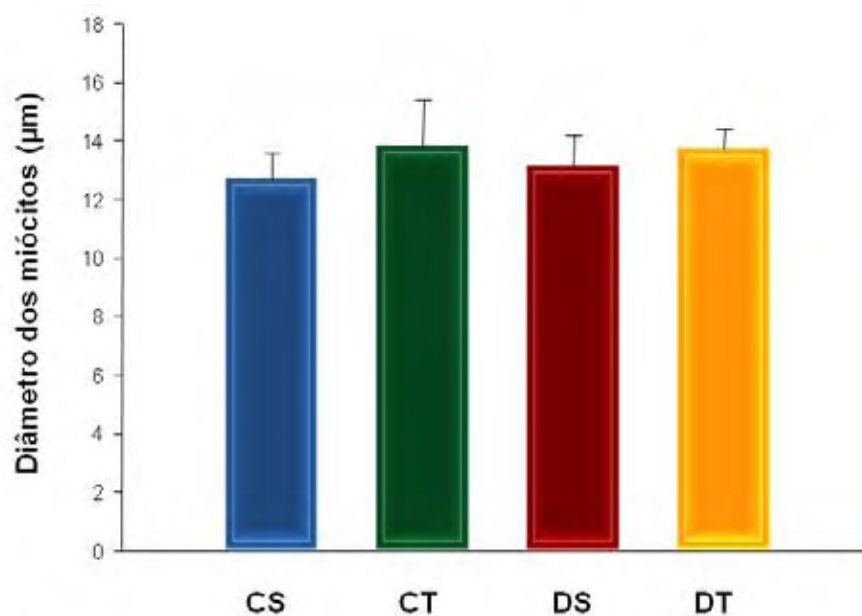


Gráfico 18: Diâmetro dos miócitos. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado.

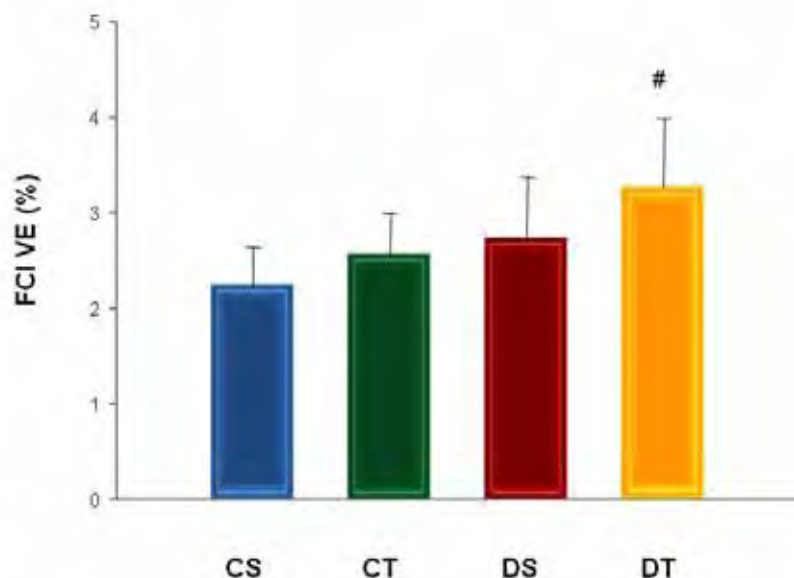


Gráfico 19: Fração de colágeno intersticial do ventrículo esquerdo (FCI VE). CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. #: $p < 0,05$ vs. CT.

Avaliação do Estresse Oxidativo

Os valores obtidos da avaliação do estresse oxidativo em amostras do tecido miocárdico do VE estão expostos na Tabela 8 e nos Gráficos 20-23.

Tabela 8. Avaliação do estresse oxidativo em amostras do tecido miocárdico do ventrículo esquerdo

Variáveis	CS (n=8)	CT (n=8)	DS (n=8)	DT (n=8)
LOOH	145 (140-156)	172 (168-182)*	295 (285-321)*	211 (177-229) [§]
GSH-Px	29,7 ± 1,67	25,5 ± 3,42*	17,4 ± 3,25*	23,1 ± 4,21 [§]
Catalase	125 ± 6,72	122 ± 11,7	80,7 ± 7,07*	107 ± 16,6 ^{#§}
SOD	25,8 ± 1,37	26,8 ± 2,16	14,0 ± 2,62*	16,1 ± 1,90 ^{#§}

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; LOOH: hidropéroxido de lipídio (nmol/g tecido); GSH-Px: glutathione peroxidase (nmol/mg tecido); catalase: $\mu\text{mol/g}$ tecido; SOD: superóxido dismutase (nmol/mg tecido). *: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT; [§]: $p < 0,05$ vs. DS (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

O hidroperóxido de lipídio apresentou-se maior nos grupos CT e DS em relação ao grupo CS e menor no grupo DT em relação ao DS e não diferindo do CT. A GSH-Px foi menor nos grupos CT e DS em relação ao CS e maior no grupo DT em relação ao DS e sem diferença com o CT. Os valores de catalase e SOD mostraram-se menores nos grupos diabéticos em relação aos seus respectivos controles. O EF foi benéfico nos animais diabéticos uma vez que aumentou os valores dessas variáveis.

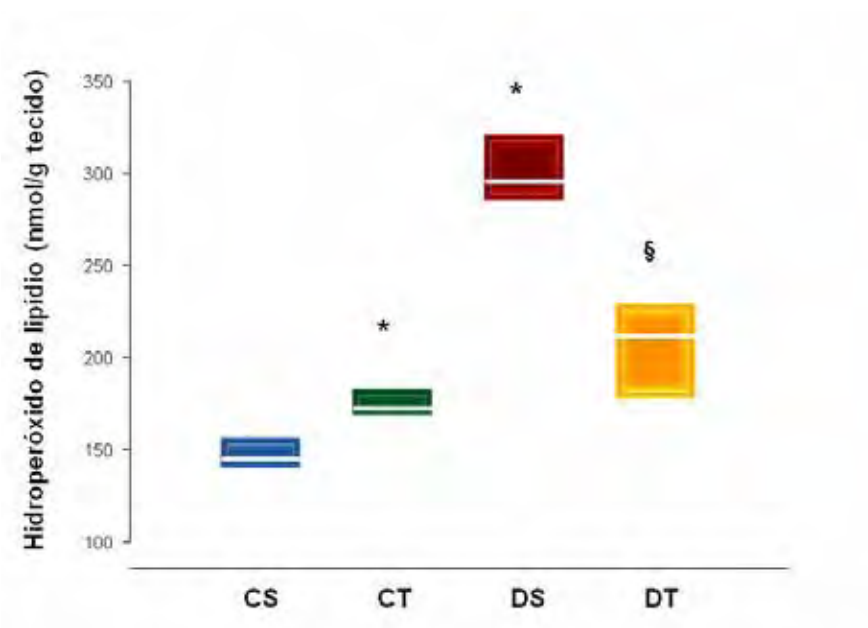


Gráfico 20: Hidroperóxido de lipídio em amostra miocárdica do ventrículo esquerdo. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS; §: $p < 0,05$ vs. DS.

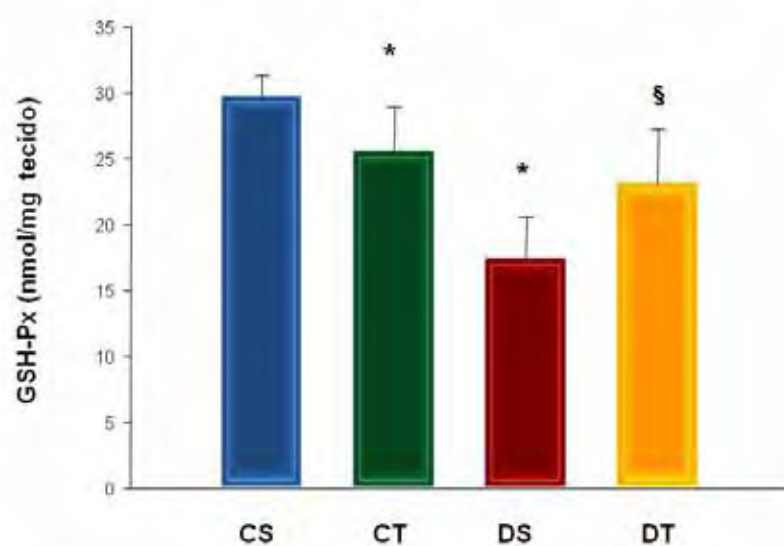


Gráfico 21: Glutationa peroxidase (GSH-Px) em amostra miocárdica do ventrículo esquerdo. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS; §: $p < 0,05$ vs. DS.

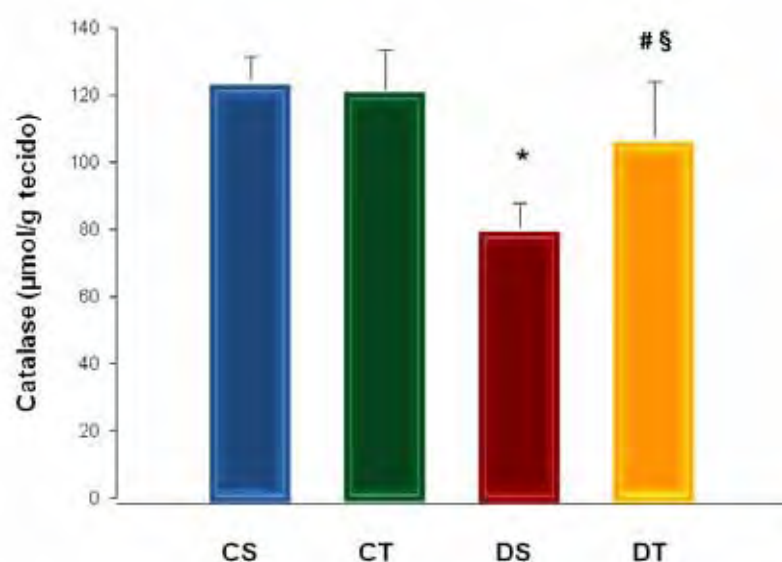


Gráfico 22: Catalase em amostra miocárdica do ventrículo esquerdo. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT; §: $p < 0,05$ vs. DS.

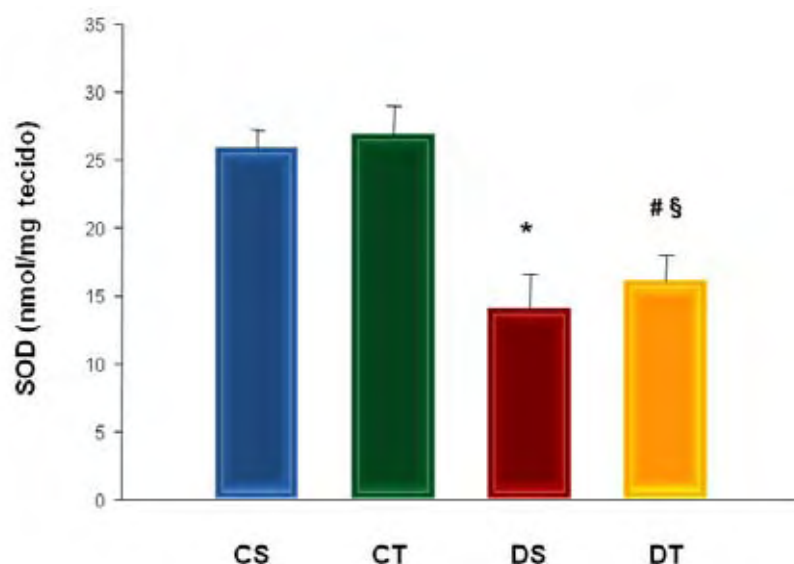


Gráfico 23: Superóxido dismutase (SOD) em amostra miocárdica do ventrículo esquerdo. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT; §: $p < 0,05$ vs. DS.

Análise Bioquímica Sérica

Os valores obtidos na análise bioquímica sérica dos animais estão apresentados na Tabela 9. O colesterol total apresentou-se aumentado nos grupos diabéticos em relação aos controles, e o EF causou redução dessa variável sem normalizá-la. Os valores de triglicérides foram maiores no grupo DT em relação ao CT e sem diferença em relação aos outros grupos. Em relação ao HDL-colesterol, o grupo DS mostrou-se menor em relação ao CS e o EF em ratos diabéticos foi capaz de normalizá-lo (Gráficos 24-26).

Tabela 9. Análise bioquímica no soro dos animais (mg/dl)

Variáveis	CS (n=8)	CT (n=8)	DS (n=8)	DT (n=8)
Col. total	90,5 (86,5-100)	98,0 (86,5-121)	188 (182-198)*	148 (136-165) ^{#§}
Triglicérides	107 ± 18	103 ± 15	138 ± 31	146 ± 58 [#]
HDL-col.	41,6 (37,8-49,0)	38,6 (37,1-45,3)	21,5 (20,8-24,5)*	40,8 (30,4-43,8) [§]

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado; Col.: colesterol. *: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT; §: $p < 0,05$ vs. DS (ANOVA, esquema fatorial 2X2).

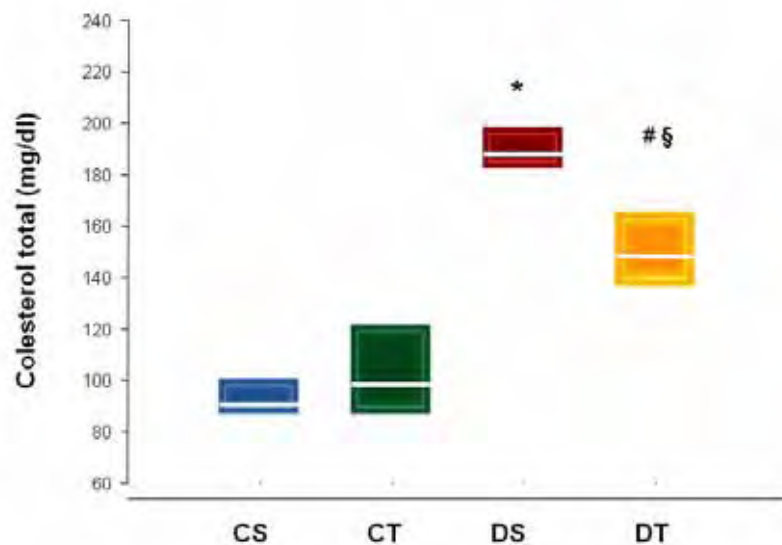


Gráfico 24: Colesterol total. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS; #: $p < 0,05$ vs. CT; §: $p < 0,05$ vs. DS.

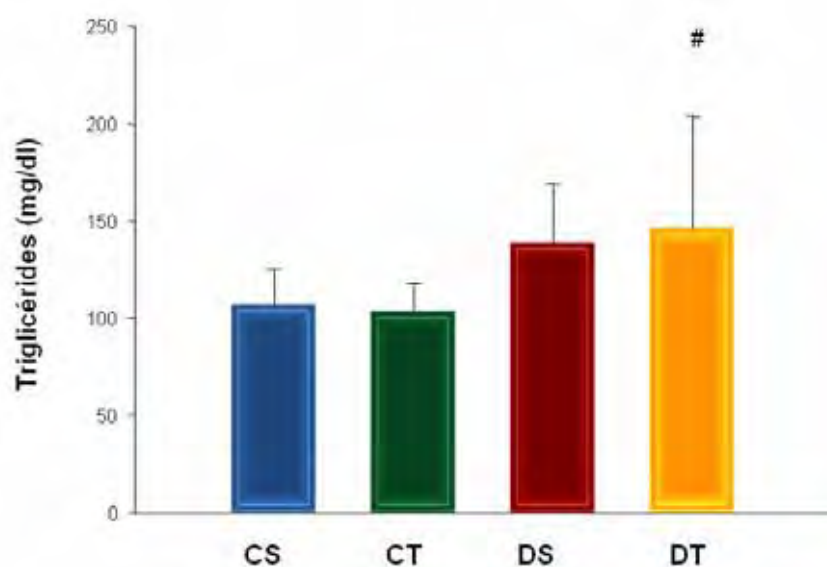


Gráfico 25: Triglicérides. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. #: $p < 0,05$ vs. CT.

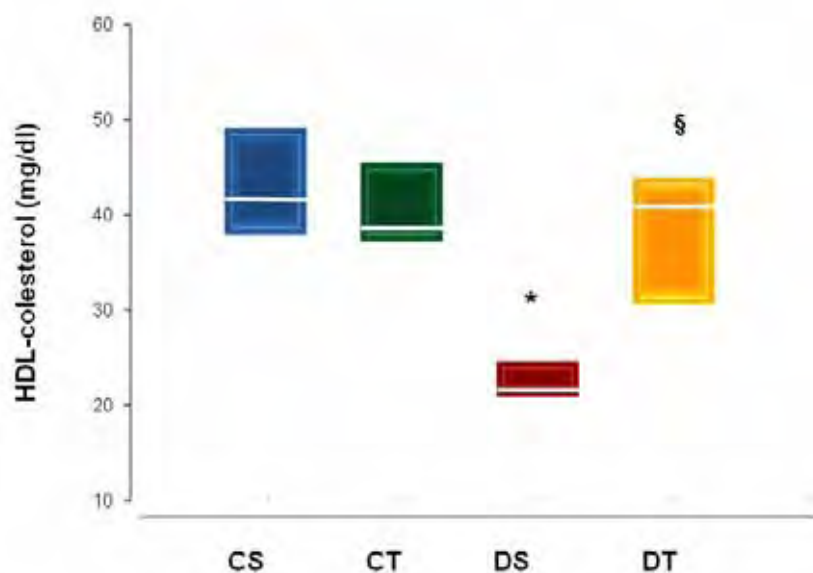


Gráfico 26: HDL-colesterol. CS: grupo controle sedentário; CT: grupo controle treinado; DS: grupo diabético sedentário; DT: grupo diabético treinado. *: $p < 0,05$ vs. CS; §: $p < 0,05$ vs. DS.



5. Discussão

Neste estudo avaliamos a influência do exercício físico na remodelação cardíaca e a atividade oxidativa de ratos Wistar diabéticos. A indução do estado diabético foi realizada por meio de administração do quimioterápico STZ. A aloxana e a STZ são duas substâncias comumente usadas na indução do diabetes tipo 1 em modelos experimentais por serem tóxicas às ilhotas de Langerhans que são células responsáveis pela síntese de insulina no pâncreas (Elliott *et al.*, 1997).

As características metabólicas da indução do DM por STZ incluem o desenvolvimento rápido de hiperglicemia profunda, modesta hipertrigliceridemia, cetose e redução acentuada nos níveis de insulina plasmática (Tahiliani & McNeill, 1986; Fang *et al.*, 2004). No modelo experimental de diabetes tipo 1 os efeitos da hiperglicemia são avaliados na ausência de hiperinsulinemia (Poornima *et al.*, 2006).

No presente trabalho foi utilizada esteira rolante, que é um método comum para investigar adaptações fisiológicas produzidas pelo exercício físico (Apple & Billadello, 1994; Locke *et al.*, 1995; Zhou & Dohm, 1997). A corrida em esteira ativa as respostas neuroendócrinas de estresse e faz o animal correr em velocidade constante durante o tempo programado (Arida *et al.*, 2004). O uso de esteira é geralmente selecionado por obter maiores respostas do metabolismo aeróbio do que a natação, caracterizada por relativa inatividade das patas traseiras (Kaplan *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2000). Segundo alguns autores, o exercício de intensidade controlada em esteira induz alguns dos maiores e mais consistentes efeitos do treinamento físico (Wisloff *et al.*, 2001; Kemi *et al.*, 2002).

Habitualmente, em trabalhos da literatura os protocolos de EF em esteira com ratos diabéticos têm duração de dez semanas (Tancrede *et al.*, 1982; De Angelis *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2004). Loganathan *et al.* (2007) realizaram duas semanas de adaptação antes da indução de DM e nove semanas de treinamento após indução

de DM. Silva *et al.* (2007) utilizaram protocolo de esteira com ratos normais e o treinamento foi de 12 semanas. No nosso estudo foi utilizado um protocolo de nove semanas após a indução de DM, sendo uma de adaptação e oito de exercício físico. Não foi possível realizar um protocolo mais longo, pois os animais diabéticos passaram a apresentar deterioração do estado geral.

Em relação à velocidade e ao tempo de realização do exercício com ratos diabéticos, Costa *et al.* (2004) aumentaram a duração e a velocidade progressivamente de 5 a 60 min e de 5 m/min a 20 m/min, 5 vezes/semana. Protocolo semelhante foi utilizado por Loganathan *et al.* (2007) no qual a duração foi de 5 a 50 min e a velocidade de 15 a 20 m/min. No nosso estudo, os ratos realizaram exercício que foi aumentado progressivamente, em relação à duração, de 8 a 18 min e velocidade de 8 a 11 m/min.

Sabe-se que os ratos são animais de hábito noturno, isto é, apresentam maior atividade física durante a noite. Para mimetizar essa condição, os animais foram mantidos em ciclo invertido de 12 horas logo após o desmame, e o EF foi realizado durante o período matutino em sala escura sob luz vermelha imperceptível aos ratos. Mesmo nessas condições, alguns animais não se adaptaram ao EF em esteira rolante e, por essa razão, foram excluídos do estudo. Os animais dos grupos sedentários também ficaram expostos ao mesmo ambiente dos animais exercitados.

No presente estudo, a mensuração inicial da glicemia e do peso corporal dos animais mostrou que os grupos CS, CT, DS e DT não apresentaram diferença estatisticamente significativa, evidenciando a homogeneidade entre os grupos. Conforme esperado para esse modelo experimental, os animais diabéticos apresentaram elevação da glicemia e perda de peso. O EF foi capaz de atenuar a elevação da glicemia. Isso acontece porque ocorrem adaptações fisiológicas e metabólicas, entre elas o aumento da captação de glicose, que parecem estar

associadas a efeitos benéficos ao sistema cardiovascular (Goodyer & Kahn, 1998; Ronsen *et al.*, 2002). Costa *et al.* (2004) também mostraram melhora dos níveis insulinêmicos e glicêmicos após o treinamento físico em ratos diabéticos por STZ. Luciano & Mello (1998) realizaram protocolo de natação em ratos diabéticos por quatro semanas e também encontraram redução da glicemia.

Em nosso estudo, a pressão arterial não apresentou diferença entre os grupos. Assim podemos descartar a influência da pressão arterial na remodelação cardíaca induzida por DM. Na literatura, há descrições de que o DM não altera a pressão arterial (Yamamoto, 1988; Wienen *et al.*, 2001), ou causa alterações, tanto redução (Tomlinson *et al.*, 1990) quanto elevação (Ramos, 1998). Essas alterações estariam relacionadas à volemia ou às diferentes técnicas de medida da pressão arterial (Kusaka *et al.*, 1987 e Yamamoto, 1988).

Através do ecocardiograma realizamos a análise *in vivo* das variáveis estruturais do coração, assim como dos parâmetros das funções sistólica e diastólica do VE. Observamos que o DDVE não diferiu entre os grupos. No entanto, os animais diabéticos apresentavam PC significativamente menor. Assim, a normalização do DDVE pelo PC mostrou dilatação desta cavidade. Sabe-se que a normalização das estruturas cardíacas para o PC pode acarretar erros de interpretação, uma vez que essas variáveis não são exatamente proporcionais (Moreira *et al.*, 2006). Em relação ao DDVE, como não havia diferença antes da normalização, a interpretação de dilatação nos animais diabéticos nos parece convincente. O EF reduziu o DDVE e aumentou a ERVE no grupo CT em relação ao CS e sem diferença nos animais diabéticos. Existem vários relatos da literatura mostrando que o DM acarreta dilatação das câmaras cardíacas (Joffe *et al.*, 1999; Akula *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011). Em relação à MVE e IMVE, discutiremos adiante os valores obtidos por

pesagem direta do VE, uma vez que os valores de MVE obtidos por ecocardiograma são estimados por cálculo a partir de medida das estruturas e, portanto, imprecisos.

A avaliação do átrio esquerdo mostra, consistentemente, que houve dilatação dessa câmara nos animais diabéticos. O EF normalizou ou atenuou essa variável, dependendo da variável utilizada, se diâmetro absoluto do AE ou normalizado pelo diâmetro da aorta, respectivamente. Frequentemente, a dilatação do AE é decorrente de aumento da pressão diastólica do VE, que pode ocorrer em consequência de alterações das funções diastólicas e/ou sistólica do VE. A medida da dimensão do AE tem merecido papel importante, principalmente na avaliação da função diastólica do VE (Nagueh *et al.*, 2009).

Ao ecocardiograma, somente o índice VEPP mostrou que os grupos diabéticos apresentavam comprometimento da função sistólica, e o EF não atenuou essa variável. Os índices de função diastólica não se alteraram no grupo diabético sedentário, no entanto, o EF causou aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico no grupo diabético treinado. Assim, a análise funcional do VE pelo ecocardiograma mostrou apenas discretas alterações causadas por DM e EF.

O estudo funcional do músculo isolado, em condições basal e após manobras inotrópicas positivas para verificação da reserva contrátil, mostrou comprometimento da contração e de relaxamento nos grupos diabéticos de pequena magnitude, e o EF não foi capaz de atenuar tais alterações.

A avaliação anatômica mostrou que o peso do VE foi menor nos grupos diabéticos, no entanto, ao normalizar pelo PC, o peso foi maior nesses grupos. Considerando a variável VE/PC, podemos inferir que o DM causou hipertrofia miocárdica, no entanto, esse resultado deve ser interpretado com cautela devido a não proporcionalidade exata dessas variáveis. Se considerarmos que o DDVE, a espessura do VE e o diâmetro dos miócitos não foram diferentes entre os grupos

diabéticos e não diabéticos, apesar da redução significativa do PC nos animais diabéticos, é possível afirmar que os ratos diabéticos apresentaram algum grau de hipertrofia miocárdica em relação aos controles não diabéticos. O EF não alterou o peso do VE. O modelo de DM causado por STZ (DM tipo 1), ao contrário do DM tipo 2, não se caracteriza por hipertrofia miocárdica significativa em decorrência de deficiência de insulina (Tarquini *et al.*, 2011).

O peso dos átrios foi semelhante no grupo DS em relação ao CS e aumentado quando normalizado pelo PC. Esse comportamento pode ser decorrente de alterações contrátil e de relaxamento do VE. Os dados em relação aos átrios corroboram os achados ecocardiográficos. O encontro da relação peso úmido/seco do pulmão maior no grupo DS em relação ao CS mostra congestão pulmonar no grupo diabético, e o EF foi benéfico atenuando essa variável no grupo DT. Os dados referentes a quantidade de líquido no pulmão também corroboram os achados dos estudos funcionais do VE *in vivo* e *in vitro*. A literatura apresenta vários estudos que mostram comprometimento das funções diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo em animais diabéticos (Al-Shafei *et al.*, 2002; Loganathan *et al.*, 2006). Loganathan *et al.* (2007) mostraram que o EF melhorou a função cardíaca em ratos diabéticos, apesar do acentuado estado catabólico dos animais. Cardiomiócitos isolados de ratos diabéticos apresentaram redução da fração de encurtamento e diminuição da velocidade de contração e de relaxamento, e o EF atenuou essas disfunções (Silva *et al.*, 2011).

O peso do VD foi menor nos grupos diabéticos e semelhante quando normalizados por PC. Esses achados também indicam que as alterações de função do VE e de congestão pulmonar observadas no grupo DS não foram de grande magnitude a ponto de causar repercussões para o lado direito do coração (Lima *et al.*, 2010).

Para avaliarmos o tecido colágeno miocárdico realizamos a determinação da concentração miocárdica de hidroxiprolina e medida da fração de colágeno intersticial. A hidroxiprolina é um aminoácido presente exclusivamente no tecido colágeno e a determinação de sua concentração no miocárdio, juntamente com a medida da fração de colágeno intersticial, são duas técnicas habitualmente utilizadas para quantificar o tecido colágeno miocárdico (Matsubara *et al.*, 2000). Nos nossos dados, não houve diferença nessas duas variáveis no grupo DS em relação ao CS. O grupo DT não diferiu do grupo DS, no entanto, inexplicavelmente apresentou elevação da fração de colágeno intersticial em relação ao grupo CT. A literatura dispõe de poucos estudos experimentais que avaliaram o colágeno intersticial no miocárdio de animais diabéticos e esses mostraram aumento que foi atenuado por EF (Searls *et al.*; 2004; Bollano *et al.*; 2007).

Na análise bioquímica sérica, as alterações observadas nos níveis de triglicérides, colesterol total e HDL-colesterol causadas por DM são consistentes com dados de literatura (Silva & Lima, 2002; Fernandes *et al.*, 2010). O EF foi benéfico em atenuar ou normalizar as duas últimas variáveis, respectivamente, nos animais diabéticos. Vários estudos têm mostrado o importante papel do EF na diminuição dos triglicérides e LDL-colesterol e no aumento do HDL-colesterol (Kannan, 1999; Leong & Wilding, 1999; Wheeler, 1999; Rigla *et al.*, 2000).

Em relação ao estresse oxidativo, o DM causou aumento do hidroperóxido de lipídio e redução na atividade das enzimas antioxidantes, e o EF foi capaz de atenuar ou normalizar essas variáveis. O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante endógena. Conhecimentos atuais indicam o papel do estresse oxidativo como determinante principal do início e progressão das complicações cardiovasculares associadas ao DM (Maritim *et al.*, 2003; Taniyama & Griendling, 2003). A exposição prolongada dos

tecidos vasculares à hiperglicemia causa anormalidades estruturais e funcionais, e pesquisas revelam que a capacidade antioxidante endógena está prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a remoção dos radicais livres de oxigênio (Santini *et al.*, 1997). Estudos experimentais têm relatado aumento do estresse oxidativo no coração de ratos diabéticos (Kaul *et al.*, 1995; Kaul *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2011).

O EF causa adaptações fisiológicas e metabólicas imediatas (agudas) e ao longo prazo (crônicas) para que o organismo possa atender a maior demanda energética, mantendo a sua homeostase (Felig & Wahren, 1975; Koivisto *et al.*, 1980; Ronsen *et al.*, 2002); e nesse processo ocorrem alterações metabólicas que são altamente benéficas no DM. A captação de glicose nos músculos exercitados aumenta sete a vinte vezes, em comparação aos níveis basais, proporcionalmente à intensidade e duração do exercício. Isso ocorre para satisfazer a demanda de oxigênio que durante o exercício aumenta cerca de 20 vezes. Os músculos esqueléticos utilizam suas próprias reservas de glicogênio e triglicérides, consomem os ácidos graxos derivados da mobilização de triglicérides do tecido adiposo e, se o exercício for de longa duração, há consumo de glicose liberada do fígado (American College of Sports Medicine & American Diabetes Association, 2000).

Sabe-se que o treinamento físico, em animais diabéticos, promove aumento da utilização de lipídios no metabolismo energético e da atividade das enzimas-chave na mobilização e oxidação de lipídios, podendo reduzir a concentração circulante desses substratos, em especial os ácidos graxos livres (Boden, 2002; Kraus *et al.*, 2002).

O estado diabético, causado por STZ, aumenta a produção de ERO que estimula uma cascata inflamatória causando tipicamente edema intersticial no músculo esquelético e infiltração linfocitária no coração. No entanto, o treinamento

físico pode atenuar a inflamação cardíaca por aumento da defesa antioxidante endógena, presumivelmente deprimida no DM (Atalay *et al.*, 2004).

Entre as alterações ultraestruturais observadas na miocardiopatia diabética podem ser citadas: desarranjo miofibrilar, edema e rompimento das mitocôndrias; e aumentos do citoplasma, das fibras colágenas e das invaginações da membrana nuclear. Estudos que analisaram o efeito do EF sobre alterações ultraestruturais miocárdicas de animais diabéticos também mostraram atenuação dessas alterações (Searls *et al.*, 2004; Weng *et al.*, 2007).

Alterações na expressão protéica da bomba SERCA-2a, da fosfolamban, dos receptores de rianodina e de β_1 , β_2 e β_3 -adrenérgicos foram observadas em corações de ratos diabéticos (Bidasee *et al.*, 2004; Bidasee *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2009; Lahaye *et al.*, 2010; Shao *et al.* 2011). O EF também mostrou-se benéfico em atenuar tais alterações induzidas por DM (Shao *et al.*, 2009; Lahaye *et al.*, 2010).

Embora os estudos mostrem a importância do EF na miocardiopatia diabética, os mecanismos de ação envolvidos nesse benefício não estão completamente elucidados. Estudos adicionais são necessários para melhor entendimento da fisiopatologia da miocardiopatia diabética e a influência do EF neste processo. Todavia, há evidências suficientes para recomendar o EF como medida não farmacológica no controle terapêutico de pacientes com DM.



6. Conclusão

Em modelo experimental de diabetes mellitus em ratos ocorre remodelação cardíaca associada a alterações bioquímicas e aumento do estresse oxidativo, que são em parte atenuados ou normalizados pelo exercício físico.



7. Referências Bibliográficas

Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* 2005;112:3115-21.

Akula A, Kota MK, Gopisetty SG, Chitrapu RV, Kalagara M, Kalagara S, *et al.* Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2003;48:429-35.

Al-Shafei AI, Wise RG, Gresham GA, Carpenter TA, Hall LD, Huang CL. Magnetic resonance imaging analysis of cardiac cycle events in diabetic rats: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Physiol* 2002;538:555-72.

American College of Sports Medicine; American Diabetes Association. Posicionamento oficial conjunto: Diabetes mellitus e exercício. *Rev Bras Med Esporte* 2000;6:16-22.

Apple, FS; Billadello, JJ. Expression of creatine kinase M and B mRNAs in treadmill trained rat skeletal muscle. *Life Sci* 1994;55:585-92.

Arida RM, Scorza CA, Silva AV, Scorza FA, Cavalheiro EP. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett* 2004;364:135-8.

Atalay M, Oksala NKJ, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, *et al.* Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* 2004;97:605-11.

Babu PS, Srinivasan K. Renal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats maintained on onion and capsaicin containing diets. *J Nutr Biochem* 1999;10:477-83.

Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.

Baynes JW. Chemical modification of proteins by lipids in diabetes. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1159-65.

Bidasee KR, Zhang Y, Shao CH, Wang M, Patel KP, Dincer UD, *et al.* Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Diabetes* 2004;53:463-73.

Bidasee KR, Zheng H, Shao CH, Parbhu SK, Rozanshi GJ, Patel KP. Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of beta-adrenoceptors. *J Appl Physiol* 2008;105:907-14.

Blair SN, Connely JC. How much physical activity should we do? The case for moderate amounts and intensities of physical activity. *Res Q Exerc Sport* 1996;67:193-205.

Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:545-9.

Bollano E, Omerovic E, Svensson H, Waagstein F, Fu M. Cardiac remodeling rather than disturbed myocardial energy metabolism is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Int J Cardiol* 2007;114:195-201.

Bosi PL, Carvalho AM, Contrera D, Casale G, Pereira MA, Gronner MF, *et al.* Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009;53:726-32.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

Broderick TL, Poirier P, Gillis M. Exercise training restores abnormal myocardial glucose utilization and cardiac function in diabetes. *Diab Metab Res Rev* 2005;21:44-50.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.

Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am J Hypertens* 2005;18:692-8.

Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci* 2000;320:244-8.

Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Matsubara L, Aragon F, Okoshi MP. The influence of temporal food restriction on the performance of isolated cardiac muscle. *Nutr Res* 2001;21:639-48.

Codinach-Huix P, Freixa-Pamias R. Diabetic cardiomyopathy: concept, heart function, and pathogenesis. *An Med Interna* 2002;19:313-20.

Cohn R, Roth K. Lipid and lipoprotein metabolism. In: *Biochemistry and disease, bridging basic science and clinical practice*. Baltimore: Williams & Wilkins;1996:181-263.

Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997;96:25-8.

Costa LP, Harthmann A, Arruda P, De Angelis K, Irigoyen MC. Treinamento físico melhora a disfunção quimiorreflexa em ratos diabéticos por estreptozotocina. *Rev Bras Educ Fís Esp* 2004;18:293-301.

Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM, Buse MG. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 1981;30:235-41.

DATASUS. Taxa de prevalência de diabete melito. In: Departamento de Informática do SUS, Ministério da Saúde; 2010.

De Angelis KLD, Oliveira AR, Dall'Ago P, Peixoto LRA, Gadonshi G, Lacchini S *et al.* Effects of exercise trainnig on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:635-41.

De Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Matsubara LS, Matsubara BB, Cicogna AC, *et al.* Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:2242-6.

De Simone G, Devereux RB, Camargo MJ, Volpe M, Wallerson DC, Atlas AS, *et al.* In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. *J Hypertens* 1992;10:725-32.

Despres JP. Our passive lifestyle, our toxic diet, and the therogenic/diabetogenic metabolic syndrome. Can we afford to be sedentary and unfit? *Circulation* 2005;112:453-5.

Elliott JI, Ewchand H, Altmann DM. Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking β cells. *Clin Exp Immunol* 1997;109:116-20.

Epifanio HB, Zornoff LAM, Matsubara BB, Paiva SAR, Inoue RMT, Matsubara LS. Remodelação miocárdica após infarto agudo do miocárdio experimental em ratos. Efeito do bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:10-4.

Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, Capasso JM, Sonnenblick EH. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res* 1980;47:922-33.

Felig P; Wahren J. Fuel homeostasis in exercise. *N Engl J Med* 1975;293:1078-84.

Fernandes AAH, Novelli ELB, Okoshi K, Okoshi MP, Di Muzio BP, Guimarães JFC, Fernandes A Jr. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomed & Pharmacother* 2010;64:214-9.

Giugliano D, Ceriello A, Paoglisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-65.

Goodyear LJ, Kahn BB. Exercise, glucose transport and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 1998;49:235-61.

Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004;53:110-8.

Gu K, Cowie CC, Harris ML. Diabetes and decline in heart disease mortality in U.S. adults. *JAMA* 1999;281:1291-7.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231-55.

Hebden RA, Gardiner SM, Bennett T, MacDonald IA. The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clin Sci (Lond)* 1986;70:111-7.

Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991;26:853-6.

Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, *et al.* Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent

diabetic rat: noninvasive assessment with doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:2111-9.

Kannan V. Diet, activity and diabetes. *J Assoc Phys India* 1999;47:761-3.

Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol* 1974;34:29-34.

Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol* 1994; 273:H1167-73.

Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Khaper N, Seneviratne C, Singal PK. Probucol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 1996;160-161:283-8.

Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Thomas TP, Hill M, Khaper N, Singal PK. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition* 1995;11:551-4.

Kemi OJ, Loennechen JP, Wisløff, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2002;93:1301-9.

Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Diabetes prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393-403.

Koivisto VA, Soman V, Nadel E, Tamborlane WV, Felig P. Exercise and noninsulin: insulin binding, insulin mobilization and counter regulatory hormone secretion. *Fed Proc* 1980;39:1481-6.

Kraus WE, Houmard JA, Ducha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 2002;374:1483-92.

Krebs H, Henseleit K. Untersuchungen über die Harnstoff-bildung im Türkörper. *Hoppe Seylers Z. Physiol Chem* 1932;210:33-66.

Kusaka M, Kishi K, Sokabe H. Does so-called streptozocin hypertension exist in rats? *Hypertension* 1987;10:517-21.

Lahave SD, Gratas-Delamarche A, Malardé L, Vicent S, Morel SL, Delamarche P, et al. Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac β -adrenoceptors in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2010;9:72-80.

Leong KS, Wilding JP. Obesity and diabetes. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999;13:221-37.

Li A, Culver B, Ren J. Benefit and risk of exercise on myocardial function in diabetes. *Pharmacol Res* 2003;48:127-32.

Lim GJ, Kang HJ, Stewart KJ. Type 2 diabetes in Singapore: The role of exercise training for its prevention and management. *Singapore Med J* 2004;45:62-9.

Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, *et al.* Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Pathol* 2010;91:54-62.

Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* 1995;91:2642-54.

Liu J, Yeo HC, Övervik-Douk E, Hagen T, Doniger SJ, Chu DW. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 2000;89:21-8.

Locke M, Noble EG, Tanguary RM, Field MR. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol* 1995;C1387-94.

Loganathan R, Bilgen M, Al-Hafez, Alenezy MD, Smirnova IV. Cardiac dysfunction in the diabetic rat: quantitative evaluation using high resolution magnetic resonance imaging. *Cardiovasc Diabetol* 2006;5:7-14.

Loganathan R, Bilgen M, Al-Hafez, Zhero SV, Alenezy MD, Smirnova IV. Exercise training improves cardiac performance in diabetes: in vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. *J Appl Physiol* 2007;102: 665-72.

Lopes JP, Oliveira SM, Fortunato JS. Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications. *Acta Med Port* 2008;21:293-302.

Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977;23:882-4.

Luciano E, Mello MAR. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. *Rev Paul Educ Fís* 1998;12:202-9.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24-38.

Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:1534-9.

Mendes OC. Tolerância ao esforço físico e função cardíaca em diferentes períodos pós-indução de estenose aórtica em ratos. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, 2008.

Moreira VO, Castro AV, Yaegaschi MY, Cicogna AC, Okoshi MP, Pereira CA, *et al.* Echocardiographic criteria for the definition of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats. *Arq Bras Cardiol* 2006;86:432-8

Moura R. Técnicas de Laboratório. 2 ed. São Paulo: Atheneu Editora; 1982.

Nagueh SF, Appleton CP, Gillebert TC, Marino PN, Oh JK, Smiseth AO, *et al.* Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2009;22:107-33.

- Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1974;358:251-61.
- Norby FL, Wold LE, Duan J, Hintz KK, Ren J. IGF-1 attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:658-66.
- Ozdemir S, Ugur M, Gurdal H, Turan B. Treatment with AT(1) receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca(2+) transients and contractile function of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2005;435:166-74.
- Paulson DJ, Kopp SJ, Peace DG, Tow JP. Improved postischemic recovery of cardiac pump function in exercised trained diabetic rats. *J Appl Physiol* 1988;65:187-93.
- Peter R, Okoseime OE, Rees A, Owens DR. Postprandial glucose - a potential therapeutic target to reduce cardiovascular mortality. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:68-74.
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 1971;78:957-62.
- Pierce GN, Dhalla NS. Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats. *Can J Cardiol* 1985;1:48-54.
- Poornima IG, Parikh P, Shannon RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res* 2006;98:596-605.
- Ramos OL. Diabetes mellitus and hypertension. State of the art lecture. *Hypertension* 1988;11:114-8.
- Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, *et al.* High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens* 2006;24:549-61.
- Rigla M, Sánchez-Quesada JL, Ordóñez-Lianos J, Prat T, Caixàs A, Jorba O, *et al.* Effect of physical exercise on lipoprotein (a) and low-density lipoprotein modifications in type-1 and type-2 diabetic patients. *Metabolism* 2000;49:640-7.
- Ronsen O, Kjeldsen-Kragh J, Haug E, Bahr R, Pedersen BK. Recovery time affects immunoendocrine responses to a second bout of endurance exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:1612-20.
- Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, *et al.* Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997;46:1853-8.
- Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978;90:37-43.
- Searls YM, Smirnova IV, Fegley BR, Stehno-Bittel L. Exercise attenuates diabetes-induced ultrastructural changes in rat cardiac tissue. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:1863-70.

Shao CH, Capek HL, Patel KP, Wang M, Tang K, DeSouza C, *et al.* Carbonylation contributes to SERCA2a activity loss and diastolic dysfunction in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetes* 2011;60:947-59.

Shao CH, Wehrens XH, Wyatt TA, Parbhu S, Rozanski GJ, Patel KP, *et al.* Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol* 2009;106:1280-92.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87:4-14.

Silva CA, Lima WC. Efeito benéfico do exercício físico no controle metabólico do Diabetes Mellitus tipo 2 à curto prazo. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2002;46:550-6.

Silva MF, Pelúzio Mdo C, Amorim PR, Lavorato VN, Santos NP, Bozi LH, *et al.* Swimming training attenuates contractile dysfunction in diabetic rat cardiomyocytes. *Arq Bras Cardiol* 2011;97:33-9.

Soloni FG. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 1971;17:529-34.

Sugizaki MM, Carvalho RF, Aragon FF, Padovani CR, Okoshi K, Okoshi MP, *et al.* Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to morphological damage in normotensive middle-aged rats. *J Biomed Sci* 2005;12:641-9.

Switzer B. Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem* 1991;2:229-321.

Tancrede G, Rousseau-Mignerot S, Nadeau A. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes* 1982;31:406-9.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003;42:1075-108.

Tarquini R, Lazzeri C, Pala L, Rotella CM, Gensini FG. The diabetic cardiomyopathy. *Acta Diabetol* 2011;48:173-81.

Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1994;16:383-91.

Tomlinson KC, Gardiner SM, Bennett T. Central effects of angiotensins I and II in conscious streptozotocin-treated rats. *Am J Physiol* 1990;258:R1147-56.

Thompson K, Godin DV. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutr Res* 1995;15:1377-410.

Torquato MT, Montenegro Junior RM, Viana LA, Souza RA, Lanna CM, Lucas JC, *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med J* 2003;121:224-30.

Wallberg-Heriksson H, Rincon J, Zierath JR. Exercise in the management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Med* 1998;25:25-35.

- Wang J, Wang H, Hao P, Xue L, Wei S, Zhang Y, *et al.* Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Mol Med* 2011;17:172-9.
- Wellner M, Dechend R, Park JK, Shaqdarsuren E, Al-Saadi N, Kirsch T, *et al.* Cardiac gene expression profile in rats with terminal heart failure and cachexia. *Physiol Genomics* 2005;20:256-67.
- Weng Y, Shen F, Li J, Shen Y, Zhang X. Expression changes of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in myocardium of streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007;115:455-60.
- West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 2000;17:171-80.
- Wheeler ML. Nutrition management and physical activity as treatments for diabetes. *Primary Care* 1999;26:857-68.
- Wienen W, Richard S, Champeroux P, Audeval-Gerard C. Comparative antihypertensive and renoprotective effects of telmisartan and lisinopril after long-term treatment in hypertensive diabetic rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2001;2:31-6.
- 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* 2004;27:1047-53.
- Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity controlled treadmill in rats: VO_2 max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1301-10.
- Wolff SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987;245:243-50.
- Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 1991;10:339-52.
- Yamamoto J. Blood pressure and metabolic effects of streptozotocin in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 1988;10:1065-83.
- Zar J. *Bioestatistical Analysis*. Prentice-Hall Press. 4 ed. New Jersey, NJ, USA; 1999.
- Zhou Q, Dohm GL. Treadmill running increases phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Biochem and Biophys Res Commun* 1997;236:647-50.