

Efectos del Entrenamiento Físico sobre la Estructura del Miocardio de Ratas Albinas

B. DÍAZ RONDÓN Y E. DOVALE

*Dpto. de Biología Celular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Ciudad de la Habana, Cuba*

Recibido: 17 de marzo de 1981

ABSTRACT. Studies on the myocardial ultrastructure were carried out on two groups of rats. The control group consisted of sedentary animals while the experiment group received physical training consisting of swimming on alternative days during four months. Important differences were found between both groups of animals; specially in mitochondria, nuclei and intercalated discs with alterations in sedentary rat which were interpreted as degenerative signs related to ageing and sedentariness. These alterations were not observed in the training rats.

RESUMEN. Se realizó un estudio ultraestructural del miocardio de ratas de vida sedentaria (controles) y otras sometidas a entrenamiento físico por natación en días alternos durante 4 meses. Se encontraron diferencias marcadas entre ambos grupos de animales, especialmente a nivel de las mitocondrias, núcleos y discos intercalares. Las alteraciones observadas en las ratas controles se interpretan como degenerativas, propias de la edad y de la vida sedentaria; no presentándose con la ejercitación moderada.

INTRODUCCION

Una de las características más notable de la civilización del siglo XX como resultado del desarrollo tecnológico, la motorización y automatización es la falta de ejercicio físico, lo que repercute sobre la salud física y mental. En los últimos años se ha prestado una amplia y particular atención a los trastornos del sistema cardiovascular (*Raab y cols., 1960; Tipton y Scheuer, 1977*). Al respecto, la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos implicados en las enfermedades degenerativas cardíacas se ha visto facilitada por el análisis en conjunto de las variaciones estructurales, bioquímicas y humorales del corazón que provoca el entrenamiento físico y los cambios morfofuncionales que experimenta este órgano con el avance de la edad.

En trabajos anteriores (*Díaz, 1974*), estudiamos comparativamente las características intracelulares electrofisiológicas del miocardio de la rata con el desarrollo y las ocasionadas por el ejercicio físico crónico.

En esta oportunidad hacemos un análisis mediante la microscopia electrónica de las diferencias estructurales existentes entre los corazones de ratas de vida sedentaria y aquellas entrenadas por natación desde los 35 días de nacidas hasta la adultez, demostrando los efectos favorecedores, en este aspecto, del incremento de la actividad motora.

MATERIALES Y METODOS

Se escogieron al azar 15 ratas machos albinas con pesos entre 60 y 70 g (35 días de nacidas) repartidas en dos grupos iguales. Uno de ellos sometido a entrenamiento de natación (ratas entrenadas) a temperatura de 28°C sin llegar al agotamiento, en días alternos durante 4 meses. La programación se inició con 10 minutos de ejercicio, imponiéndoles en cada sesión una carga física aditiva de un 7.5% de su peso corporal e incrementando paulatinamente el tiempo en un minuto hasta llegar a nadar una hora.

Las ratas fueron sacrificadas 24 horas después del último día de entrenamiento. El estudio de los respectivos controles (ratas controles o de vida sedentaria) se llevó a cabo en el mismo período de tiempo. A ambos grupos se les realizó control del peso corporal y electrocardiograma una vez por semana como parámetros seguidores de la efectividad del entrenamiento.

Al animal previamente anestasiado con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal a dosis de 25 mg/kg, se le extrae el corazón tomándose pequeñas muestras de 3 mm de diámetro de la base y apex del ventrículo izquierdo; prefijándose con glutaraldehído al 3.2% en tampón fosfato durante 1 hora y posterior lavado en el mismo tampón durante una noche, pasándose a una solución de tetróxido de osmio al 2% en tampón fosfato. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico siendo finalmente incluidas en Epón 812 y polimerizándose en estufa a 60°C durante 48 horas (*Luft, 1961*).

Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo Ultratone III de la L.K.B. y examinados al microscopio electrónico H-S-7 Hitachi y BS-500 Tesla. El post contraste se realizó con Uranil Acetato saturado en alcohol metílico y posteriormente en Citrato de Plomo (*Reynold, 1963*).

Un total de 20 ratas se escogieron para el control del peso húmedo y seco de los corazones. El peso seco se obtuvo por desecación del tejido a 100°C.

RESULTADOS

Concluida la etapa del entrenamiento programado, tanto las ratas ejercitadas como las de vida sedentaria finalizaron con pesos corporales superiores a 430 g no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos al compararse los distintos chequeos periódicos controlados a lo largo del entrenamiento. Sin embargo, en las ratas entrenadas se obtiene el desarrollo de hipertrofia cardíaca, dada por incrementos significativos en el peso promedio húmedo y seco de los corazones, de 0.93 ± 0.04 a 1.377 ± 0.24 (d.s.) y de 0.209 ± 0.01 a 0.315 ± 0.06 g (d.s.) respectivamente, ambos para una $p > 0.001$. La frecuencia cardíaca fue de 363.7 ± 11.8 (d.s.) para las ratas controles y de 316.1 ± 10.8 (d.s.) para las entrenadas.

Datos estructurales. Se realizó un estudio cualitativo de las células miocárdicas en general concentrando nuestra atención especialmente a nivel de las mitocondrias, núcleos y discos intercalares, por ser estas estructuras las que mayores diferencias manifiestan al comparar los dos grupos de ratas estudiadas.

Aspecto de las mitocondrias. En las ratas entrenadas las mitocondrias conservan los patrones estructurales normales que han sido descritos para el miocardio de la rata (*Laguens y Gómez-Dumm, 1975*) con forma alargadas, dispuestas uniformemente en grupos alineados entre las miofibrillas, conservando intactas sus membranas externas e internas con sus crestas Fig. 1). En las de vida sedentaria se observa la presencia de un gran número de mitocondrias de formas y tamaños variables con tendencia a la pérdida de su distribución lineal, agrupadas en racimos; no mostrando una localización preferencial en las distintas partes del tejido cardíaco. Muchas de estas mitocondrias presentan aspecto edematoso y vacuolizaciones en su centro y en la periferia, a la vez que sus membranas, externas e internas, pueden aparecer fraccionadas con destrucción de la matriz mitocondrial. Algunas presentan en su interior estructuras concéntricas en anillos, similares a las descritas por otros autores, comparadas por su forma, con la disposición en anillos que toma la mielina del sistema nervioso (*Spiro, 1966; Sher y cols., 1967; Sacktor y Shimada, 1972; Melack y Leeson, 1975*) (Figs. 2 y 3). Las alteraciones

señaladas se presentan en el 80% de los cortes estudiados, alternando con zonas de completa conservación estructural (Fig. 4).



Fig. 1. Microfotografía electrónica tomada de un corte longitudinal de la base del ventrículo izquierdo de ratas sometidas a entrenamiento físico por natación. Observe las mitocondrias alineadas entre las miofibrillas de formas regulares con crestas abundantes y bien conservadas. 11,600 x.

Aspecto de los núcleos. El núcleo de las células miocárdicas de ratas ejercitadas muestran formas esféricas u ovoideas, con cromatina dispersa y en ocasiones desplazada hacia la envoltura nuclear. El nucléolo se observó con poca frecuencia.

En las ratas de vida sedentaria el núcleo tiende a adquirir una configuración lobulada o dentada, siendo el resto de las características similares a las descritas en las ratas ejercitadas (Fig. 5).

Aspecto de los datos intercalares. En los corazones de ratas entrenadas es posible observar los tres componentes ultraestructurales de los discos intercalares igual a los descritos por otros autores (*Ferrans y cols., 1973 y McNutt 1970*), tales como los nexus, desmosomas y fascia adhe-

rente, las cuales no presentan modificaciones de tipo conformacionales (Figs. 6 y 7).



Fig. 2. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo de rata control de vida sedentaria (430 g o más). Se aprecia una pérdida de la disposición lineal de las mitocondrias con respecto a las miofibrillas (compárase con la Fig. 1), así como vacuolizaciones, edema y destrucción de las crestas. Otro hallazgo fue la presencia de estructuras en forma de figuras de mielina (flecha). Algunas mitocondrias conservan su estructura característica (m). 24,000 x.

En las ratas de vida sedentaria algunos de los componentes de estas membranas de unión muestran las características siguientes: las membranas constitutivas del nexus pierden su configuración haciéndose irregulares y no bien delimitadas; mientras que a nivel de la fascia adherente y a ambos lados de las membranas de unión se reconocen zonas electrodensas sobre el citoplasma, a la vez que las ondulaciones de dichas membranas adquieren mayor profundidad. En ambas estructuras referidas se desarrolla una marcada dilatación del espacio intercelular con borramientos en ocasiones de la membrana plasmática (Figs. 8-10). Estas alteraciones se alternan con zonas de completa conservación tisular.

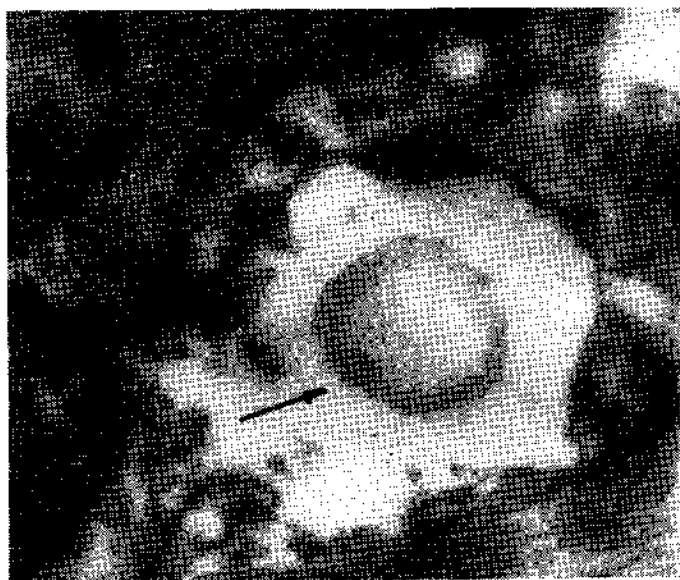


Fig. 3. Microfotografía del ventrículo izquierdo de rata control de vida sedentaria (430 g o más) con gran magnificación, donde se visualiza con mayor nitidez la destrucción de las membranas externas de una mitocondria y la desaparición de sus crestas. Hacia la periferia de la mitocondria se observa una formación estructural (señalada por la flecha) que bien pudiera corresponderse con fases de reagrupación y destrucción de la matriz mitocondrial.

DISCUSION

La ejercitación crónica razonadamente aplicada permite al organismo el reajuste de sus mecanismos adaptativos mediante cambios estructurales, bioquímicos y humorales que aseguran el incremento de la capacidad frente al sobre esfuerzo. Entre los cambios morfofuncionales que experimenta el corazón con el entrenamiento físico, resaltan los de su ultraestructura. De modo particular, las mitocondrias se caracterizan por su marcada susceptibilidad frente a los ejercicios (*Liere y Northup, 1957; Crews y Aldinger-Earl, 1967; Kleitke y cols., 1967; Tomanek, 1970 y Eding-*

ton y Cosmas, 1972). Con el entrenamiento en estera rodante aplicado paulatinamente, predominan las mitocondrias pequeñas, pero ocupando un área mayor, sin presentarse alteraciones en la fracción mitocondrial (Edington y Cosmas, 1972). Con ejercicios de natación se reportan aumentos de la relación masa de las miofibrillas/masa de las mitocondrias del miocardio de ratas (Kleitke y cols., 1967).

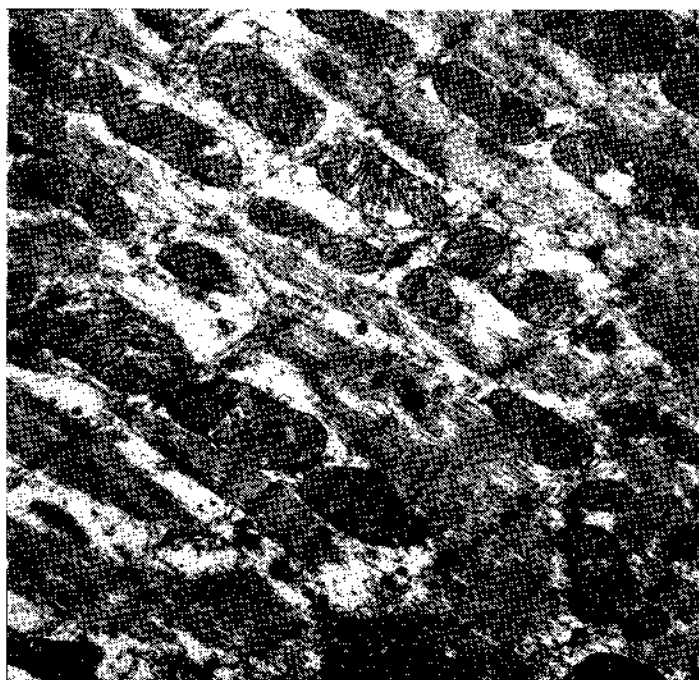


Fig. 4. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo de rata de vida sedentaria donde pueden observarse zonas de completa conservación estructural con algunas mitocondrias vacuoladas.



Fig. 5. Microfotografía de ventrículo izquierdo, mostrando el aspecto lobulado que tienden a tomar los núcleos de las células miocárdicas de ratas relativamente viejas y de vida sedentaria. Obsérvense las alteraciones mitocondriales. 50,000 x.

Nuestro estudio no morfométrico, nos impide rivalidar variaciones cuantitativas similares a las señaladas anteriormente, sin embargo, demuestra las diferencias ultraestructurales claramente establecidas entre las ratas controles y las entrenadas. En estas últimas, resalta la conservación estructural mitocondrial, con agrupaciones uniformes alineadas a lo largo de las miofibrillas conservando intactas sus membranas externas e internas con sus crestas. De igual modo, los discos intercalares mantienen configuración normal. Respecto a estas últimas estructuras, nues-

tros resultados difieren de los de Sohal y cols. (1968) quienes reportan en ratas entrenadas modificaciones de los discos intercalares, con ensanchamiento de los espacios intercelulares y aparición de vesículas, incrementándose con esto, el volumen y área de superficie intercalar.



Fig. 6. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo de ratas sometidas a entrenamiento físico por natación durante 4 meses. Observe la conservación de las características normales de la fascia adherente del disco intercalar y la distribución lineal de las mitocondrias, así como la conservación de sus crestas. 11,600 x.

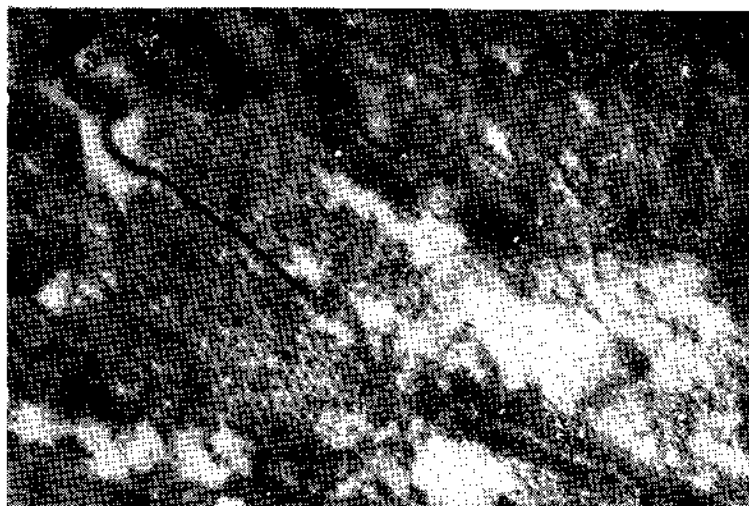


Fig. 7. Corte transversal de ventrículo izquierdo de ratas sometidas a entrenamiento físico donde se aprecian los tres elementos característicos del disco intercalar; desmosoma (1); nexus (2) y fascia adherente (3). 47,500 x.

La diferencia con nuestros resultados, arriba señalada, puede estar correlacionada con el tipo de entrenamiento empleado. Se acepta que el grado de respuesta morfofuncional del corazón a los ejercicios físicos depende de la programación empleada y del acondicionamiento previo del sujeto (Saltin y cols., 1969; Kilbom y cols., 1969; Raven y cols., 1970; Hartley y cols., 1972; y Banister y Griffiths, 1972). Estos autores ejercitan las ratas diariamente comenzando con 15 minutos e incrementando los tiempos de natación hasta 6 horas, llegando muchas de ellas a la fatiga. En las nuestras no hubo agotamiento y la adecuada adaptación funcional se controló mediante tres parámetros, expresión de la efectividad del entrenamiento físico: la hipertrofia cardíaca, la inalterabilidad del peso corporal y la disminución de la frecuencia cardíaca (Raab y cols., 1960; Díaz, 1974; González y Castellanos).



Fig. 8. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo de rata de vida sedentaria, en el cual se reconocen zonas electrodensas sobre el citoplasma a ambos lados de las membranas de unión (1). Obsérvese (en comparación con la Fig. 6) la mayor profundidad adquirida por las ondas y la dilatación del espacio intercelular que ellas delimitan (2). Nótese las alteraciones mitocondriales 16,000 x.

En nuestras ratas controles, las estructuras estudiadas presentan marcadas alteraciones. Las mitocondrias toman aspecto edematoso y vacuolado con roturas de sus membranas, agrupándose en racimos, presentando muchas de ellas capas concéntricas membranosas de disposición similar a la mielina. En sus discos intercalares, se desarrolla a nivel del nexus y de la fascia adherente una marcada dilatación del espacio intercelular con alteraciones de la conformación de las membranas constitutivas de ambos tipos de uniones.



Fig. 9. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo de rata de vida sedentaria donde se observa dilatación de la fascia adherente del disco intercalar (flecha). Nótese además las alteraciones mitocondriales 18,000 x.

Estas alteraciones en general, son similares a las descritas por otros autores en procesos considerados de tipo degenerativos, como los observados en ratas sometidas a dietas ricas en colesterol (Melack y Leeson, 1975) y en casos de miopatías familiares (Spiro y cols. 1966; Kawamura y James, 1971) en las cuales se describen, entre otras, modificaciones mitocondriales de tipo mielínica. De modo particular, Sacktor y Shimada, (1972) asocian la formación tipo mielínica de las mitocondrias a procesos degenerativos de la edad. Las variaciones encontradas en nuestros animales controles pudieran igualmente responder a manifestaciones inherentes al avance de la edad. Al respecto todas nuestras ratas fueron sacrificadas con pesos corporales superiores a 300 g y acor-

de a la evaluación del peso corporal (*Zeman e Innes, 1963*) de las modificaciones cardíacas (*Horwood y Beznak, 1971*) y de las características electrofisiológicas de las células miocárdicas de la rata (*Díaz, 1974*) puede considerarse que alcanzando los 300 g de peso corporal, las ratas han finalizado la etapa de máximo desarrollo, clasificándoseles como relativamente viejas (*Novikof, 1969*). Es interesante resaltar que las ratas jóvenes con pesos entre 180 y 300 g las mitocondrias no presentan alteraciones ultraestructurales (*Sahal y cols., 1968; Page y McCallister, 1973; Laguens y Gómez-Dumm, 1975*).

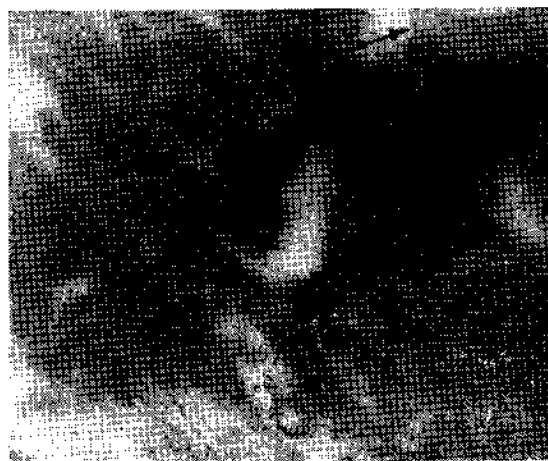


Fig. 10. Microfotografía a mayor magnificación de la fascia adherente del disco intercalar donde se muestran dilataciones en el trayecto ondulatorio que caracteriza a esta estructura (flechas). 60,000 x.

El hecho de que los corazones de ratas entrenadas hayan conservado la configuración normal de sus mitocondrias y de los discos intercalares, a pesar de ser relativamente viejas, nos permiten en este sentido, sugerir el aspecto beneficioso de la ejercitación crónica razonadamente aplicada. Raab y cols., (1960) señalan que la falta de ejercicios físicos incrementa el desarrollo de las enfermedades degenerativas del corazón. Por

Journal of the American College of Sports Medicine (1967) Tomarok (1970)

Edington y Cosmas, (1972) y Banister y Griffiths, (1972) y nuestras propias experiencias electrofisiológicas (Díaz, 1974) demuestran en distintas formas, la influencia facilitadora del entrenamiento físico para el mejoramiento de las condiciones fisiológicas cardíacas.

Por último, la conservación estructural del nexus en los corazones de ratas entrenadas —componente esencial en la transmisión de la onda de despolarización de una célula a la otra (Weidmann, 1951; Woodbury y Crill, 1961; McNutt, 1970; Spira, 1971 y Matter, 1973)— ha de poseer una significación fisiológica de importancia, pudiendo considerarse hipotéticamente, que su inalterabilidad ha de permitir, en unión del incremento del potencial de reposo, de la amplitud del potencial de acción, del aumento de la velocidad máxima de despolarización y del grosor de las fibras miocárdicas, ya demostrado (Díaz, 1974), el aseguramiento de la conducción excitatoria a lo largo de las paredes ventriculares hipertrofiadas de ratas entrenadas.

REFERENCIAS

- BANISTER E. W. AND GRIFFITHS J. Blood levels of adrenergic amines during exercise. *J. Appl. Physiol.* 33, 674, 1972.
- GREWS J. AND ALDINGER-EARL E. Effect of chronic exercise on myocardial function. *Am. Heart. J.* 74, 536, 1967.
- DÍAZ B. Potenciales de membranas miocárdicos. Variaciones con el desarrollo y el ejercicio. Tesis de Maestría, CENIC, La Habana, 1974.
- EDINGTON D. AND COSMAS A. C. Effect of maturation and training on mitochondrial size distribution in rat hearts. *J. Appl. Physiol.*, 33, 715, 1972.
- FERRANS V. J., ROBERTS W. C., SHUGOLL G. I., MASSUMI R. A. AND ALÍ N. Plasma membrane extensions in intercalated discs of human myocardium and their relationship to partial dissociation of the discs. *J. Mol. Cell Cardiol.* 5, 161, 1973.
- GONZÁLEZ M. Y CASTELLANOS P. (Comunicación personal) Instituto de Medicina Deportiva, Habana, Cuba.
- HARTLEY L. H., MASSON J. W., HOGAN R. P., JONES L. G., KOTCHEN T. A. MOUGEY F. E., WHERRY L. L. AND RICKETTS P. T. Multiple hormonal response to graded exercise in relation to physical training. *J. Appl. Physiol.*, 33, 607, 1972.
- HORWOOD D. M. AND BEZNAK M. Fluid and electrolyte shifts relating cardiac hypertrophy with normal growth. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 49, 951, 1971.
- KAWAMURA K. Y JAMES T. N. Comparative ultrastructure of cellular junction in working myocardium and the conduction system under normal pathological condition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 3, 31, 1971.

- KILBOM A., HARTKEY L. H., SALTIN B., BJURE J. AND ASTRAND I. Physical training in sedentary middle-aged men. I. Medical evaluation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 24, 315, 1969.
- KLEITKE B., SHULZE W., Y WOLLEMBERGER A. Alteraciones de las mitocondrias del miocardio de las ratas con estenosis de la aorta y ejercicio fisico. *Revista Referativa de Biología. Moscú* 10 (II), 10H436, 1967.
- LAGUENS R. P. AND GÓMEZ-DUMM C. L. Fine Structure myocardial mitochondria in rats after exercise for one-half to two hours. *Circulation Res.*, 21, 271, 1975.
- LIERE E. J. VAN AND NORTHUP D. W. Cardiac hipertrophy produced by exercise in albino and hipoxic rats. *J. Appl. Physiol.* 11, 91, 1957.
- LUFT J. M. Improvements in epoxy resin in embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409, 1961.
- MATTER A. A morphometric study on nexus of rat cardiac muscle. *J. Cell. Biol.*, 56, 690, 1973.
- McNUTT N. S. Ultrastructure of intercellular junctions in adult and developing cardiac muscle. *Am. J. Cardiol.*, 25, 169, 1970.
- MELACK H. AND LEESON T. S. Comparative electron microscope studies of the myocardium in adult rats fed on normal and cholesterol diets. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 7, 195, 1975.
- NOVIKOF I. I. Development of heart conducting system in embryo of white rat. "Ciencia y Técnica", 245, 1969.
- PAGE E. AND MCCALLISTER L. P. Studies on the intercalated disc of rat left ventricular cells. *J. Ultrastructure Res.*, 43, 388, 1973.
- RABB W., PAULA DE P., SILVA E., MARCHET H., KIMURA E. AND STERCHESKA Y. K. Cardiac adrenergic preponderance due of physical exercise and its patogenic implications. *Am. J. Cardiol.*, 3, 300, 1960.
- RAVEN P. B., CONNERS J. J. AND EVONUK B. Effets of exercise on plasma lactic dehydrogenase isozymes and catecholamine. *J. Appl. Physiol.* 29, 374, 1970.
- REYNOLD E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy *J. Cell. Biol.*, 17, 208, 1963.
- SALTIN E., HARTLEY L. H., KILBOM A. AND ASTRAND I. Physical training sedentary middle-aged and older men. II. Oxygen uptake, heart rate and blood lactate concentration at submaximal and maximal exercise. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 24, 323, 1969.
- SACKTOR B. AND SHIMADA Y. Degenerative changes in mitochondria of flight muscle from aging blowflies. *J. Cell. Biol.*, 52, 465, 1972.
- SHER J. H., RINALOUSKI A. B., ATHANASSIADES T. J. AND ARONSON S. M. Familial cen-

- tronuclear myopathy a clinical and pathological study. *Neurology.*, 17, 727, 1967.
- SOHAL R. S., SUM S. C., COLCOLOUGH H. L. AND BURCH G. E. Ultrastructural changes of the intercalated disc in exercised rat heart. *Lab. Invest.* 48, 49, 1968.
- SPIRA A. W. The nexus in the intercalated disc of canine heart. Quantitative data for an stimulation of its resistance *J. Ultrastructure, Res.* 34, 409, 1971.
- SPIRO A. J., SHY G. M., AND GONATAS N. K. Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy. *Arch. Neurol.*, 14, 1, 1966.
- TIFTON C. M. AND SCHEUER J. Symposium on experimental preparations to study the effects of training on the cardiovascular system. *Medicine and Science in Sports.*, 9, 246, 1977.
- TOMANEK R. Effects of aged and exercised an the extent of myocardial capillary bed. *Anat. Rec.*, 167, 55, 1970.
- WEIDMANN S. Effects of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. *J. Physiol.*, 115, 227, 1951.
- WOODBURY J. W. AND CRILL W. E. In Florey E. (ed). *Nervous Inhibition*, Pergamon, London, 1961.
- ZEMAN W. E INNES R. M. *Cragie's Neuroanatomy of rat.* 11:49, Academic Press, New York, 1963.