



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Departamento de Fisiologia e Biofísica**  
**Instituto de Ciências Biológicas**

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Fisiologia e Farmacologia

**SINALIZAÇÃO DE  $Ca^{2+}$  EM CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS DE  
RATOS COM ALTA CAPACIDADE AERÓBICA INTRÍNSECA**

Aluno: Thales Nicolau Prímola Gomes  
Orientador: Dr. Jader dos Santos Cruz  
Co-orientador: Dr. Antonio José Natali

---

Tese apresentada ao  
Departamento de Fisiologia  
e Biofísica do Instituto de  
Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de  
Minas Gerais para obtenção  
do título de Doutor em  
Ciências Biológicas

Outubro de 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# SINALIZAÇÃO DE $Ca^{2+}$ EM CARDIOMIÓCITOS ISOLADOS DE RATOS COM ALTA CAPACIDADE AERÓBICA INTRÍNSECA

THALES NICOLAU PRIMOLA GOMES

Tese de Doutorado defendida e aprovada no dia 07 de outubro de 2009, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. EDUARDO ANTÔNIO CONDE GARCIA  
UFS



PROFA. DRA. EDILAMAR MENEZES DE OLIVEIRA  
USP



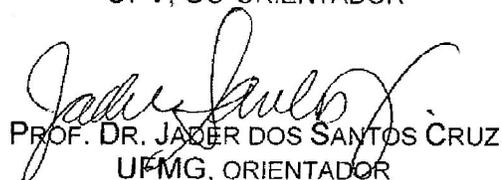
PROF. DR. CHRISTOPHER KUSHMERICK  
UFMG



PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA LEITE  
UFMG



PROF. DR. ANTÔNIO JOSÉ NATALI  
UFV, CO-ORIENTADOR



PROF. DR. JADER DOS SANTOS CRUZ  
UFMG, ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 07 de outubro de 2009.

---

***Aos animais experimentais***

---

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu pai João, minha mãe Nair, meus irmãos Silas e Thaís e meus sobrinhos João Pedro, Bernardo e Maria Rita.

A Lethícia. “Todos, quem quer que sejamos, temos os nossos entes respiráveis. Se eles nos faltam, falta-nos o ar, e sufocamos. Então se morre. Morrer por falta de amor é horrível. É a asfixia da alma!”.

Ao Professor Cândido C. Coimbra, por me apoiar sempre e acreditar no potencial do modelo proposto para a seleção de ratos. Modelo este originário de uma de suas linhas de pesquisa. Obrigado pela paciência, companheirismo e pela orientação sempre correta e por permitir o uso do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo para a realização deste trabalho.

Ao Professor Antonio José Natali, pelo apoio e pelo convite inicial para o desenvolvimento deste trabalho. Exemplo de conduta a ser sempre seguido.

Ao Professor Jader S. Cruz, por permitir o uso do Laboratório de Membranas Excitáveis para a realização do trabalho.

À Professora Umeko Marubayashi, pelas agradáveis “prosas”, sempre cheias de conselhos, serenidade e muita música.

Ao Professor Nilo R.V. Lima, cuja orientação inicial durante o mestrado me proporcionou bases sólidas para alcançar meus objetivos científicos e profissionais.

À Professora Danusa D. Soares, pela amizade e pela orientação imprescindível na formulação e discussão do modelo experimental.

A Professora Sandra-Lauton Santos, com quem divido igualmente este trabalho. Obrigado pela amizade, convivência e ajuda valiosa em todos os experimentos.

Ao Professor Paulo R.S. Amorim, pela amizade, por ser responsável pelos meus primeiros contatos com o método científico durante a graduação e por me guiar no caminho correto na carreira docente.

Ao Professor Paulo Lanes Lobato, por me guiar sempre no caminho correto e por acreditar sempre no meu desempenho profissional. Agradeço também ao fato de que na chefia do Departamento de Educação Física da UFV me deu todas as condições e apoio para iniciar a carreira docente.

Aos alunos do Biotério Experimental, em especial Miguel A.C. Júnior, Judson F.Q. Júnior e Matheus O. Souza pela ajuda na coleta dos dados de contratilidade celular.

A aluna de iniciação científica voluntária Lúcia A. Campos, pela ajuda fundamental na coleta de dados.

Ao doutorando Luciano S.A. Capettini, com quem divido também a autoria deste trabalho. Obrigado pela amizade e pela ajuda na realização dos experimentos de expressão protéica.

A Professora Silvia Guatimosim, pela ajuda nos experimentos de microscopia confocal.

A Professora Virgínia S. Lemos, por permitir o uso do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular para os experimentos de expressão protéica.

Ao Professor Yeshwant S. Bakhle, por fazer a revisão final para reenvio do manuscrito publicado no Journal of Applied Physiology.

Aos amigos do LAMEX, em especial Hugo Duarte, Carolina Gioda e Ana Carolina.

Aos três grandes amigos: Cláudio, Heitor e Balthazar.

Ao grande amigo "Mestre" Simontom Silveira, por me mostrar os cursos dos rios: FEA, Oaska, Núcleo Alto das Cordilheiras, dentre outros...

Aos amigos do LAFISE, em especial Washington Pires, Juliana Guimarães, Samuel Wanner, Carolina Vimieiro, Christiano Moreira e Maria Aparecida.

Aos funcionários do biotério do ICB, pela competência no fornecimento e tratamento dos animais experimentais.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

A todos os companheiros do Departamento de Educação Física da UFV.

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios: 1) Laboratório de Membranas Excitáveis - Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 2) Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo e Laboratório de Fisiologia Cardiovascular - Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 3) Biotério de Biologia Experimental - Departamento de Educação Física do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. O trabalho foi realizado na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

*"... A verdadeira divisão humana é esta: luminosos e tenebrosos. Diminuir o número de tenebrosos, aumentar o dos luminosos, eis o fim. Eis porque gritamos: ensino, ciência! Ensinar a ler, é acender lume; toda a sílaba soletrada lança faíscas..."*

*Vitor Hugo*

**ÍNDICE**

<b>INTRODUÇÃO</b>	01
OBJETIVOS	10
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	12
ANIMAIS	13
PROTOCOLO DE MEDIDA DA CAPACIDADE AERÓBICA INTRÍNSECA	13
ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DE ANIMAIS COM ALTO DESEMPENHO	14
MEDIDA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO	14
ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS	15
MEDIDAS DE Ca <sup>2+</sup>	17
MEDIDA DA CONTRAÇÃO CELULAR	20
MEDIDA DA EXPRESSÃO PROTÉICA	22
ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
<b>RESULTADOS</b>	25
ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DE ANIMAIS COM ALTO DESEMPENHO	26
CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS DP E AD	26
MEDIDAS DA FLUORESCÊNCIA DE Ca <sup>2+</sup>	29
MEDIDA DA CONTRAÇÃO CELULAR	36
MEDIDA DA EXPRESSÃO PROTÉICA	38
<b>DISCUSSÃO</b>	40
<b>CONCLUSÕES</b>	51
<b>REFERÊNCIAS</b>	54
<b>ANEXOS</b>	65
ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA	66
ANEXO 2 - ARTIGO	68

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

FIGURA 1 – HISTOGRAMA DA FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES PROGRESSIVOS ATÉ A FADIGA.	27
TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS DP E AD.	28
FIGURA 2 – FIGURAS REPRESENTATIVAS DE SPARKS ESPONTÂNEAS DE $Ca^{2+}$ EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS DE DESEMPENHO PADRÃO (DP) E ALTO DESEMPENHO (AD).	30
FIGURA 3 – HISTOGRAMAS DAS CARACTERÍSTICAS DAS SPARKS DE $Ca^{2+}$ EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS DE DESEMPENHO PADRÃO (DP) E ALTO DESEMPENHO (AD).	31
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS SPARKS ESPONTÂNEAS DE $Ca^{2+}$ EM CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES DE RATOS DP E AD.	32
FIGURA 4 – TRAÇADOS REPRESENTATIVOS DAS IMAGENS DE FLUORESCÊNCIA PARA O TRANSIENTE DE $[Ca^{2+}]_i$ EM CARDIOMIÓCITOS DE RATOS DE DESEMPENHO PADRÃO (DP) E ALTO DESEMPENHO (AD).	34
FIGURA 5 – CORRELAÇÃO ENTRE O TEMPO TOTAL DE EXERCÍCIO ATÉ A FADIGA (TTF EM MIN) E A AMPLITUDE MÁXIMA DO TRANSIENTE DE $[Ca^{2+}]_i$ (F/F <sub>0</sub> ).	35
FIGURA 6 – REGISTROS REPRESENTATIVOS DA CONTRAÇÃO CELULAR EM CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES DE RATOS DP (DESEMPENHO PADRÃO) E AD (ALTO DESEMPENHO).	37
TABELA 3 – CONTRAÇÃO CELULAR EM CARDIOMIÓCITOS VENTRICULARES DE RATOS DP E AP.	38
FIGURA 7- IMAGENS REPRESENTATIVAS DE WESTERN BLOT PARA PROTEÍNAS REGULATÓRIAS DE $Ca^{2+}$ .	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	-	Acoplamento excitação-contração.
AD	-	Alto desempenho.
AMP	-	Adenosina monofosfato.
Ca <sup>2+</sup>	-	Cálcio.
CaCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de cálcio.
CaMKII	-	Proteína cinase II dependente da via Ca <sup>2+</sup> /calmodulina.
pCaMKII <sup>Thr287</sup>	-	Proteína cinase II dependente da via Ca <sup>2+</sup> /calmodulina, fosforilada no resíduo de treonina 287.
% c.c.r.	-	Percentual do comprimento celular de repouso.
CO <sub>2</sub>	-	Dióxido de carbono.
DHPR	-	Receptores de dihidropiridina.
DMEM	-	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i> .
DMSO	-	Dimetil-sulfóxido.
DP	-	Desempenho padrão.
ERK1/2	-	<i>Extracellular regulatory kinase 1/2</i> .
FDHM	-	Duração total da <i>spark</i> na metade da amplitude máxima.
FK506	-	Proteína de ligação FK506.
FKBP12.6	-	Proteína de ligação FK12.6.
Fluo-4 AM	-	Fluo-4 acetoximetil-éster.
FWHM	-	Largura total da <i>spark</i> na metade da amplitude máxima.
HCR	-	<i>High-capacity runners</i> .
HEPES	-	4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineethanesulfônico.
<i>I<sub>ca</sub></i>	-	Corrente de Ca <sup>2+</sup> .
<i>I<sub>max</sub></i>	-	Inclinação máxima da fase ascendente da <i>spark</i> .
KCl	-	Cloreto de potássio.
LCR	-	<i>Low-capacity runners</i> .
mAKAP	-	Proteína cinase A de ancoragem.
MgCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de magnésio.
NaCl	-	Cloreto de sódio.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	Fosfato de sódio dihidrogênio.

NCX	- Trocador de sódio-cálcio.
O <sub>2</sub>	- Oxigênio.
PKA	- Proteína cinase A .
PLB	- Fosfolamban.
pPLB <sup>Ser16</sup>	- Fosfolamban fosforilada no resíduo de Serina 16.
pPLB <sup>Thr17</sup>	- Fosfolamban fosforilada no resíduo de treonina 17.
PP1	- Fosfatase 1.
PP2A	- Fosfatase 2A.
RS	- Retículo sarcoplasmático.
RyR	- Receptores de rianodina.
RyR2	- Receptores de rianodina do tipo 2.
SERCA2a	- Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo sarcoplasmático.
Ser-16	- Serina 16.
$\tau$	- Tau. Constante de tempo de decaimento da <i>spark</i> ou do transiente de Ca <sup>2+</sup> .
Thr-17	- Treonina 17.
$T_{pico}$	- Tempo até o pico.
$T_{relax}$	- Tempo do pico de contração até o relaxamento total.
$T_{50\%}$	- Tempo do pico de contração até 50% do relaxamento total.
TTF	- Tempo total de exercício até a fadiga.
$VC_{max}$	- Velocidade máxima de contração.
$VR_{max}$	- Velocidade máxima de relaxamento.
VO <sub>2</sub>	- Consumo de oxigênio.
VO <sub>2max</sub>	- Consumo máximo de oxigênio.

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  e as propriedades contráteis de cardiomiócitos isolados de ratos com alta capacidade aeróbica intrínseca. Os ratos com desempenho padrão (DP) e alto desempenho (AD) foram selecionados por meio de um teste em esteira de exercício físico progressivo, de acordo com o tempo de exercício até a fadiga (TTF). O grupo DP incluiu ratos com um TTF entre 16,63 e 46,57 min e o grupo AD incluiu animais com um TTF maior que 46,57 min. Os cardiomiócitos ventriculares foram isolados dos corações dos ratos DP e AD para as medidas das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  e dos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Várias inerências foram observadas nas características morfológicas das *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente a diminuição da amplitude observada no grupo AD (AD = 0,435 vs. DP = 0,691  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ ; mediana;  $P \leq 0,05$ ). O pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  foi maior no grupo AD em relação ao grupo DP ( $5,54 \pm 0,31$  vs.  $4,18 \pm 0,12$   $\text{F}/\text{F}_0$ ;  $P \leq 0,05$ ) e foi correlacionado positivamente com o TTF atingido durante o teste físico ( $r = 0,81$ ). Após, experimentos de medida da contração celular foram realizados nos cardiomiócitos isolados. Foi encontrada uma maior amplitude de contração celular no grupo AD, quando comparado ao grupo DP ( $6,7 \pm 0,2$  vs.  $6,0 \pm 0,3$  % do comprimento celular de repouso;  $P \leq 0,05$ ). Para estudar alguns dos mecanismos moleculares das inerências observadas entre os ratos DP e AD, uma série de medidas de Western blot foram realizadas. Foram observados aumentos nas expressões protéicas da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase tipo 2a do retículo sarcoplasmático ( $1,30 \pm 0,07$  vs.  $1,74 \pm 0,18$  unidades arbitrárias;  $P \leq 0,05$ ) e

dos receptores de rianodina do tipo 2 ( $1,86 \pm 0,13$  vs.  $3,57 \pm 0,12$  unidades arbitrárias;  $P \leq 0,05$ ) nos ratos AD. Em resumo, nossos dados mostraram diferenças intrínsecas importantes nas propriedades dos cardiomiócitos que podem explicar parte das divergências observadas em ratos com alta capacidade aeróbica intrínseca para o exercício físico.

**Abstract**

The aim of the present study was to evaluate the  $\text{Ca}^{2+}$  handling and contractile properties of cardiomyocytes isolated from rats with high intrinsic aerobic exercise capacity. Standard-performance (SP) and high-performance (HP) rats were categorized with a treadmill progressive physical exercise test according to the exercise time to fatigue (TTF). The SP group included rats with TTF between 16.63 and 46.57 min, and the HP group included rats with TTF >46.57 min. Single ventricular cardiomyocytes were isolated from the hearts of SP and HP rats, and  $\text{Ca}^{2+}$  sparks and intracellular global  $\text{Ca}^{2+}$  transients were measured. Several inferences were observed in the morphological characteristics of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  sparks, specially the decrease in amplitude observed in the HP group (HP = 0.435 vs. SP = 0.691  $\Delta\text{F}/\text{F}_0$ ; median;  $P \leq 0.05$ ). The  $\text{Ca}^{2+}$  transient peak was increased in the HP group relative to the SP group ( $5.54 \pm 0.31$  vs.  $4.18 \pm 0.12$   $\text{F}/\text{F}_0$ ;  $P \leq 0.05$ ) and was positively correlated with the TTF attained during the progressive test ( $r = 0.81$ ). We also performed cell contraction measurements in isolated cardiomyocytes and found higher amplitude of contraction in the HP group compared with the SP group ( $6.7 \pm 0.2$  vs.  $6.0 \pm 0.3\%$  resting cell length;  $P \leq 0.05$ ). To reinforce the intrinsic differences between SP and HP rats, we performed Western blot measurements and observed increased expression of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase type 2a ( $1.30 \pm 0.07$  vs.  $1.74 \pm 0.18$  arbitrary units;  $P \leq 0.05$ ) and ryanodine receptor type 2 ( $1.86 \pm 0.13$  vs.  $3.57 \pm 0.12$  arbitrary units;  $P \leq 0.05$ ) in HP rats. In summary, our data showed important intrinsic differences in cardiomyocyte

properties that could explain some of the divergence observed in rats with high intrinsic aerobic exercise capacity.

---

***INTRODUÇÃO***

---

A disponibilidade de oxigênio ( $O_2$ ) para o metabolismo celular nos sistemas biológicos é fundamental na manutenção da homeostasia corporal e na prevenção de doenças (43, 45).

Trabalhos anteriores têm demonstrado que a disponibilidade de  $O_2$  para o metabolismo aeróbico está associada, em termos de mecanismos, às várias funções complexas, nos vários níveis de organização biológica (43). Por exemplo, a concentração de  $O_2$  na atmosfera terrestre está temporalmente correlacionada ao processo de surgimento da membrana plasmática e, conseqüentemente, da compartimentalização celular (1). Outro fator que pode ser correlacionado à disponibilidade de  $O_2$  atmosférico é a mudança bem sucedida de hábitos aquáticos para terrestres por parte dos artrópodes e dos vertebrados (70). Atualmente é aceito que a capacidade de utilização de  $O_2$  (capacidade aeróbica) por parte de um organismo é fundamental não só para o desempenho físico, mas também está relacionada ao desencadeamento de diversas doenças, como a hipertensão arterial (43).

Resultados de estudos epidemiológicos demonstram que a diminuição e manutenção de baixos níveis de capacidade aeróbica são associadas à incidência de doenças cardiovasculares e maior probabilidade de mortalidade (10, 49). Recentemente, Wisloff e colaboradores mostraram que ratos com baixos níveis de capacidade aeróbica desenvolveram em longo prazo aumentos nos fatores de risco para as doenças cardiovasculares, como aumentos na pressão arterial (73). Além disso, a diminuição da capacidade aeróbica é relacionada à resistência à insulina induzida por uma dieta rica em gorduras (58) e a modificações deletérias do metabolismo lipídico muscular (66) em ratos. Por fim, quando comparada a outros fatores de risco, a

capacidade aeróbica é considerada um parâmetro adequado de predição de mortalidade para as doenças como as cardiovasculares (56). Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que ratos com maior capacidade aeróbica intrínseca apresentam maior tolerância ao estresse de contenção (4). Estes resultados corroboram a importância da capacidade aeróbica na manutenção da homeostasia corporal e na prevenção de doenças.

A capacidade aeróbica é uma variável complexa que envolve múltiplos sistemas fisiológicos que estão sob a influência de fatores genéticos e ambientais (33).

Em relação aos fatores genéticos, foi demonstrado que mais de 70% das variações observadas na capacidade aeróbica entre indivíduos são determinadas geneticamente (42). Posteriormente, foi demonstrado que as variações multifatoriais entre os genes que determinam a capacidade aeróbica irão se expressar em função do estado adaptativo em que o organismo se encontrar (12, 13). Assim, dois substratos genéticos contribuirão para as variações aleatórias observadas na capacidade aeróbica entre os indivíduos de uma população. Primeiro, e foco do presente estudo, existe um conjunto de genes que determinarão as variações na capacidade aeróbica quando não houver treinamento físico prévio (estado não treinado) (13, 42). Para descrever tal estado, o termo capacidade aeróbica intrínseca tem sido utilizado (69). Segundo, em complemento à capacidade aeróbica intrínseca, outro conjunto de genes provavelmente responderá às variações adaptativas na capacidade aeróbica em resposta à exposição ao exercício físico (12, 14).

A capacidade aeróbica é uma variável poligênica, que está expressa em relação a fatores específicos dentro dos sistemas biológicos (15). Um dos

índices clínicos mais utilizados para medir e expressar a capacidade aeróbica é a medida do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) por meio do desempenho alcançado durante um teste de esforço físico específico (50). Essa medida é um potente indicador da capacidade funcional dos sistemas corporais em transportar e utilizar oxigênio, principalmente a capacidade dos sistemas respiratório, cardiovascular e muscular (33). Essa capacidade será dada pelo produto do débito cardíaco pela extração periférica de oxigênio. Trabalhos anteriores (22, 36) mostraram que o principal fator determinante e limitante da capacidade aeróbica é a capacidade do coração de manter o fluxo sanguíneo adequado aos tecidos corporais, gerando um débito cardíaco específico, de acordo com as demandas energéticas, seja no repouso ou fora do repouso em cada intensidade de exercício físico (% do  $VO_{2max}$ ).

No coração, a principal resposta adaptativa que contribui para o maior débito cardíaco observado em ratos treinados (11) e em ratos com altos níveis de capacidade aeróbica intrínseca (36), é o aumento no volume de ejeção (27).

A função cardíaca tem sido estudada em ratos com diferentes níveis de capacidade aeróbica intrínseca (36). Neste modelo, os animais passaram por uma seleção artificial baseada na capacidade aeróbica intrínseca, sendo divididos em dois grupos: ratos com baixa capacidade para corrida (*LCR – Low-capacity runners*) e ratos com alta capacidade para corrida (*HCR – High-capacity runners*) (44). O processo de seleção artificial fez com que as linhagens LCR e HCR desenvolvessem, após onze gerações criadas, baixos e altos níveis de capacidade aeróbica intrínseca, respectivamente, perfazendo um total de 347 % de divergência nos níveis de capacidade para a corrida até a exaustão, em esteira rolante (73). Em relação à função cardíaca, no

experimento de coração isolado com 25 min de isquemia, os animais HCR apresentaram maior débito cardíaco e volume de ejeção, tanto em condições basais quanto na recuperação pós-isquemia (36). Os ratos LCR apresentaram aumentos na pressão arterial média ao longo do dia (73) e maior susceptibilidade para o desenvolvimento de taquiarritmias ventriculares em um modelo de oclusão arterial coronariana (52). Neste último estudo, os animais LCR também desenvolveram elevações no segmento ST do eletrocardiograma, o que pode ser associado à severidade da isquemia miocárdica causada pela oclusão. Em relação ao tônus autonômico, os animais HCR apresentaram ganhos nos tônus simpático e parassimpático. Em um trabalho subsequente (35) foi demonstrado, em condições de repouso e após uma sessão de exercício progressivo, que as vias de sinalização para hipertrofia cardíaca não diferiram em relação às divergências na capacidade aeróbica intrínseca, como por exemplo, as expressões da proteína ribossômica S6 e da proteína ERK1/2. Em um mapeamento genético mais aprofundado (17) foi demonstrado no músculo cardíaco que, dentre outros fatores, os animais HCR apresentaram maior expressão gênica dos receptores nicotínicos e colinérgicos. Neste estudo, destacaram-se diferenças importantes no metabolismo cardíaco, com os ratos LCR apresentando, em detrimento ao metabolismo lipídico, um aumento da expressão de genes associados ao metabolismo de carboidratos. Quando analisados em conjunto, os resultados dos estudos envolvendo ratos LCR/HCR apontam para o desenvolvimento da síndrome metabólica (66). Além disso, tais resultados corroboram o papel da capacidade contrátil do músculo cardíaco como um fator determinante da capacidade aeróbica intrínseca. No entanto, em relação ao miocárdio, os mecanismos celulares e moleculares

responsáveis pelas inerências observadas em animais que divergem quanto à capacidade aeróbica intrínseca, ainda não estão claros.

No nível celular, a capacidade contrátil da célula cardíaca está diretamente associada à homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$  (9). Durante o processo que vai da excitação elétrica do cardiomiócito até a contração do coração, fenômeno denominado de acoplamento excitação-contração (AEC), o  $\text{Ca}^{2+}$  é fundamental para a homeostasia cardíaca (9). O  $\text{Ca}^{2+}$  está envolvido tanto na excitabilidade dos cardiomiócitos, quanto na ativação final dos filamentos contráteis, causando a contração.

A despolarização do sarcolema durante o potencial de ação cardíaco faz com que haja um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula (26). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do cardiomiócito ocorre por meio da abertura de duas classes de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L e do tipo T (9). Tal movimentação de  $\text{Ca}^{2+}$  gera uma corrente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{ca}}$ ) (54), que nos cardiomiócitos de ratos representa principalmente a  $I_{\text{ca}}$  do tipo L (8). Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, também chamados de receptores de dihidropiridina (DHPR), estão expressos em sua maior parte nos túbulos transversos da membrana plasmática, com a sua porção intracelular voltada para o retículo sarcoplasmático (RS) (64). O espaço entre a membrana plasmática e a membrana do RS é chamado de subespaço (19). Estes arranjos funcionais de colocação e formação de microdomínios de  $\text{Ca}^{2+}$  são fundamentais para o processo de AEC (7). Na membrana do RS, formando também o subespaço, está a unidade liberadora de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta unidade compreende um grupo específico de receptores chamados de receptores de rianodina (RyR, do tipo 2 no cardiomiócito – RyR2). Tal arranjo funcional entre

os DHPR e os RyR2, juntamente com o subespaço entre eles formam o *Couplon*, complexo estrutural e funcional do AEC (19). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos DHPR para o subespaço estimula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS, processo conhecido como liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  (25). A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS para o citoplasma ocorre através dos RyR2 (57). Neste processo, o  $\text{Ca}^{2+}$  se ligará a dois locais específicos no RyR2, um de baixa afinidade onde se ligará rapidamente ativando o canal e outro de alta afinidade no qual se ligará mais lentamente desativando o canal (9).

A ativação dos RyR2 provoca aumentos transitórios na concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes eventos elementares, representados por aumentos transitórios de  $\text{Ca}^{2+}$ , podem variar desde eventos mais discretos, como, por exemplo, as *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , que ocorrem quando há a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  em apenas uma unidade liberadora de  $\text{Ca}^{2+}$  (20), até eventos menos discretos, como o transiente intracelular global de  $\text{Ca}^{2+}$  (9). Neste último, a ativação dos RyR2 pelo  $\text{Ca}^{2+}$  é suficiente para aumentar as concentrações deste íon fazendo-o variar de 100 nM na diástole para até um pico de 1  $\mu\text{M}$  na fase sistólica. O efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos RyR2 durante o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ativará os filamentos contráteis e conseqüentemente causará a contração celular.

Para que o músculo relaxe é necessário a dissociação do  $\text{Ca}^{2+}$  dos sítios de ligação com a troponina C e sua remoção do citoplasma (32). A remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol ocorre por meio de quatro processos que envolvem a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA2a) e do sarcolema, o trocador de sódio-cálcio (NCX) e a recaptção mitocondrial (9). A atividade da SERCA2a é o principal destes mecanismos (68), correspondendo por aproximadamente 92 % da recaptção total de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos de ratos (5). A atividade da SERCA2a é

regulada nos cardiomiócitos de ratos principalmente pelo inibidor endógeno fosfolamban (PLB), que, quando associada à SERCA2a, diminui o seu transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e a atividade de ATPase (9). Quando a PLB é fosforilada ocorre a sua dissociação da SERCA2a e, conseqüentemente, a remoção da inibição por duas vias principais. A primeira envolve a fosforilação pela proteína cinase A (PKA) de um resíduo de serina (Ser-16), por meio de uma via dependente de AMP cíclico (41). A segunda envolve a fosforilação de um resíduo de treonina (Thr-17) por uma proteína cinase II ativada pela via da  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) (6).

Vários estudos têm estabelecido relações de funcionalidade entre o mecanismo de AEC em cardiomiócitos e a capacidade aeróbica (34, 37, 71-73). Tanto nos trabalhos envolvendo aumentos da capacidade aeróbica por meio de treinamento físico (37-40, 72) quanto nos modelos de capacidade aeróbica intrínseca (34, 73), há o consenso de que a maior capacidade aeróbica está associada a ganhos relativos na cinética do  $\text{Ca}^{2+}$  e, conseqüentemente, na função dos cardiomiócitos.

Trabalhos anteriores mostraram que a amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  está aumentada quando ratos desenvolvem altos níveis de capacidade aeróbica intrínseca (34, 73). No entanto, entre os trabalhos usando modelos de treinamento físico não há consenso, uma vez que entre os trabalhos existentes há os que não encontraram diferenças entre animais treinados e sedentários (67), outros que mostraram aumento (37, 47) e mesmo diminuição (72). Em relação às inerências, foi demonstrado que o maior transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos ratos HCR está associado às diferenças no tempo relativo até o pico e no tempo até 50% de decaimento do transiente (34).

As inerências verificadas no transiente  $\text{Ca}^{2+}$  são associadas à maior capacidade contrátil nos cardiomiócitos dos animais com alta capacidade aeróbica intrínseca (34, 73). Foram observados ganhos nas funções sistólica (aumento na amplitude de contração celular e diminuição no tempo até o pico da contração) e diastólica (menor tempo até 50 % do relaxamento) nos ratos HCR (34, 73). Em relação às inerências nas variáveis morfológicas dos cardiomiócitos ventriculares isolados, foi observado maior comprimento celular nos dos ratos HCR (73).

Foi mostrado em cardiomiócitos de camundongos que o treinamento aeróbico intervalado, além de alterar o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e a contratilidade, aumenta a expressão da SERCA2a, da  $\text{pPLB}^{\text{Thr17}}$ , da  $\text{pCaMKII}\delta^{\text{Thr287}}$ , mas não modifica a expressão da PLB total e da  $\text{pPLB}^{\text{Ser16}}$  (37). Já em ratos, o mesmo treinamento físico provocou, além de aumentos na expressão protéica da SERCA2a, maior expressão da PLB total (72). Em relação aos RyR2, sua expressão não é modificada diretamente pelo treinamento físico (38). Dados anteriores mostram também que a seleção artificial não provoca modificações intrínsecas entre os ratos HCR e LCR na recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada pela SERCA2a (34).

Quando analisados em conjunto, os dados dos estudos prévios mostram que, pelo menos no modelo de seleção artificial, a capacidade aeróbica intrínseca é associada à função dos cardiomiócitos em ratos. No entanto, atualmente este modelo é considerado um modelo de síndrome metabólica (16) associado à prevalência de fatores de risco cardiovasculares (73). Se os traços inerentes à capacidade aeróbica emergem nos cardiomiócitos de ratos

com alta capacidade aeróbica intrínseca, que não passam por seleção artificial e não são utilizados como modelo de doença, permanece a ser respondido.

No presente trabalho foi testada a hipótese de que parte do alto desempenho observado em ratos com alta capacidade aeróbica é relacionado a um componente intrínseco, componente este associado ao controle do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em cardiomiócitos ventriculares.

### **OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral do trabalho foi estabelecer uma estratégia de seleção de ratos com alta capacidade aeróbica intrínseca, baseada na medida do tempo total de exercício até a fadiga (TTF), que fosse relacionada a inerências no controle do  $\text{Ca}^{2+}$  e na contração em cardiomiócitos isolados.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar em cardiomiócitos ventriculares isolados se a estratégia de seleção adotada estava relacionada a inerências:

- No transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- Nas *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- Na contração celular;
- Na expressão protéica da SERCA2a;
- Na expressão protéica do RyR2;
- Na expressão protéica da PLB;

- Na expressão protéica do NCX.

---

**MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar pesando  $250 \pm 3$  g no início do período experimental, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alojados em caixas coletivas (5/caixa) e mantidos sob um ciclo claro/escuro de 14/10h com ração e água *ad libitum*. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais – CETEA/UFMG (protocolo nº 015/08).

## **PROTOCOLO DE MEDIDA DA CAPACIDADE AERÓBICA INTRÍNSECA**

A medida da capacidade aeróbica intrínseca foi realizada por meio de um protocolo adaptado (15) e baseado no TTF (46). Uma semana antes dos testes os animais foram familiarizados com uma esteira rolante para roedores (Leticia Scientific Instruments, Spain), durante cinco dias consecutivos (5 min/dia; 5% de inclinação; 0,28 mA de estímulo elétrico) e com aumentos diários da velocidade da esteira (10, 10, 11, 13, 15 m/min). A intensidade e duração do exercício, durante a semana de adaptação, foram escolhidas de forma a não provocar qualquer adaptação referente ao treinamento dos animais (3). Os animais que não se adaptaram à esteira foram excluídos do estudo (menos de 10%). Durante a segunda semana cada animal realizou, em três dias alternados, três testes de exercício progressivo até a fadiga (velocidade inicial de 10 m/min; 5% de inclinação; 0,28 mA de estímulo elétrico). Durante os testes a velocidade da esteira foi aumentada em 1 m/min

a cada 3 min. O teste foi interrompido quando o animal entrou em fadiga. O momento da fadiga foi definido quando o rato não conseguia manter a corrida de acordo com a velocidade da esteira (61).

### ***ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DE ANIMAIS COM ALTO DESEMPENHO***

A estratégia de seleção utilizada no presente estudo foi baseada no TTF para cada rato. O melhor desempenho para cada rato entre os três dias foi considerado (15) e, a partir destes resultados, um histograma com a frequência de distribuição do TTF para a população estudada foi construído (Fig. 1). Baseado no histograma, dois grupos experimentais foram selecionados: ratos com Desempenho Padrão (DP) e ratos com Alto Desempenho (AD). Para ser incluído no grupo de DP, um animal tinha que ter um TTF que não fosse maior e nem menor que um desvio-padrão da média da população. Para ser incluído no grupo de AD, o animal necessitava ter um TTF que fosse maior que pelo menos um desvio-padrão da média da população. Caso contrário, os animais com TTF abaixo de um desvio-padrão da média da população foram excluídos do estudo. Tais critérios foram baseados em resultados anteriores do grupo de pesquisa de Koch e Britton utilizando animais da linhagem LCR e HCR (44, 73).

### ***MEDIDA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO***

Para validar os resultados do teste proposto e garantir sua utilização como um índice de capacidade aeróbica, em alguns testes o consumo de

oxigênio dos ratos foi medido ( $VO_2$ ). O  $VO_2$  ( $mLO_2.kg^{-1}.min^{-1}$ ) foi medido por meio de calorimetria indireta de circuito aberto (Columbus Instruments, USA). Antes de cada teste o sistema foi calibrado com uma mistura conhecida de gases (20.5%  $O_2$  e 0.5%  $CO_2$ ). O  $VO_2$  foi medido continuamente, a cada minuto, durante um período pré-teste (repouso entre 40 e 60 min) e durante o teste progressivo por meio de um sistema computadorizado (Oxymax Apparatus, Columbus Instruments, USA). O teste foi iniciado somente quando o  $VO_2$  se estabilizou por pelo menos 10 a 20 min em valores de repouso ( $10-20 mLO_2.kg^{-1}.min^{-1}$ ). O consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) no momento da fadiga foi utilizado como índice de capacidade aeróbica.

### ***ISOLAMENTO DOS CARDIOMIÓCITOS***

Entre dois e quatro dias após o terceiro teste de desempenho os ratos foram retirados do biotério, pesados e sacrificados por meio de guilhotina. Após o sacrifício, os corações foram rapidamente removidos e os cardiomiócitos dos ratos DP e AD isolados por meio de dissociação enzimática (55). Para a remoção cirúrgica do coração as cartilagens costocodrais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido para cima. Após a exposição da cavidade torácica, a veia cava inferior e superior, as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago e parte dos pulmões foram seccionados sucessivamente até a remoção em bloco do coração. Após a remoção, o coração foi colocado em um béquer resfriado contendo uma solução nutritiva livre de  $Ca^{2+}$  (em mM): 130 NaCl, 5,4 KCl, 0,5  $MgCl_2$ , 0,33  $NaH_2PO_4$ , 1 lactato, 3 piruvato, 22 glicose e 25 HEPES (pH 7,4). Depois de transferido para uma placa de *Petri*, o

restante dos tecidos pulmonar, vascular, da traquéia e do esôfago foi removido. Em seguida, a aorta ascendente foi seccionada com uma tesoura de microcirurgia na altura de sua segunda ramificação (tronco braquicefálico) e fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), acoplada a uma seringa de 1 mL contendo a mesma solução nutritora (59).

Após a canulação os corações foram submetidos à seguinte seqüência de eventos até a obtenção dos cardiomiócitos isolados:

- 1) Preparação em um sistema de *Langendorff* caseiro (37 °C), com controle manual da perfusão por meio de uma torneira;
- 2) Perfusão da solução nutritora durante aproximadamente 5 min.
- 3) Perfusão da solução nutritora (25 mL) acrescida de 1 mg/mL de colagenase do tipo II (Worthington, USA), 0,17 mg/mL de protease do tipo IX (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) e 0,05 mM de CaCl<sub>2</sub> durante aproximadamente 15-20 min.
- 4) O coração inteiro foi retirado da cânula e pesado em uma balança de precisão. Após, os ventrículos foram separados, pesados e cortados em pequenos pedaços.
- 5) Adição do tecido em um tubo contendo solução nutritora (6,25 mL) acrescida de 1 mg/mL de colagenase do tipo II (Worthington, USA), 10 mg/mL de albumina e 0,1 mM de CaCl<sub>2</sub>. Durante aproximadamente 3 a 5 min o tecido foi agitado levemente para facilitar o processo de dispersão mecânica. Logo após, o tecido foi centrifugado e o sobrenadante removido.

- 6) Ao conjunto de células remanescentes no fundo do tubo foi adicionada mais solução nutritora (6,25 mL) acrescida de 10 mg/mL de albumina e 0,252 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Novamente, durante 3 a 5 min a solução foi agitada levemente para facilitar o processo de dispersão mecânica. O tubo foi novamente centrifugado e o sobrenadante removido.
- 7) O evento anterior (item 6) foi repetido até a centrifugação. Para isso foi utilizada solução nutritora (6,25 mL) acrescida de 10 mg/mL de albumina e 0,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ .
- 8) Na última etapa do processo de dispersão o sobrenadante foi removido e o conjunto de células remanescentes dispersas e acondicionadas em 25 mL de meio DMEM modificado (Dulbecco's modified Eagle's médium, Sigma Chemicals Co. St Louis, MO, SA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil).

Durante os experimentos de microscopia confocal e contratilidade somente as células tolerantes ao  $\text{Ca}^{2+}$ , quiescentes e apresentando formato e estrias transversais bem definidas foram utilizadas. Os registros foram sempre feitos entre uma e seis horas após o isolamento e na temperatura ambiente (~ 25 °C). É importante ressaltar que nestes experimentos os animais foram sempre sacrificados entre dois e quatro dias após o último teste de desempenho até a fadiga.

### ***MEDIDAS DE $\text{Ca}^{2+}$***

Os cardiomiócitos isolados dos grupos DP e AD foram incubados com o indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ , permeável à membrana plasmática, Fluo-4 acetoximetil-ester (Fluo-4 AM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). O Fluo-4 AM (5  $\mu\text{M}$ ) foi preparado em uma solução de estoque a base de dimetil-sulfóxido (DMSO). As células foram incubadas durante 20 min à temperatura ambiente, lavadas e suspendidas em DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) para remover o excesso da sonda fluorescente (48). Quando esta sonda está ligada ao  $\text{Ca}^{2+}$  e é excitada com o comprimento de onda de 488 nm, emite um sinal de fluorescência medido a 510 nm, que se relaciona às variações de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmática. Tais variações foram expressas em relação à razão:  $F/F_0$ . Nas medidas das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $F_0$  representa a fluorescência basal de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos sem estímulo prévio. Já nas medidas dos transientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $F_0$  representa a média da fluorescência mínima medida entre as contrações celulares, na fase diastólica do transiente.

As imagens de microscopia confocal para as *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  e o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  foram feitas usando um microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha). Para a aquisição das imagens foi utilizada uma lente objetiva de imersão a óleo (63x). Os sinais de fluorescência foram obtidos por meio de varredura em linha (*Line Scan Mode*). A linha de varredura (512 *pixels*) foi posicionada aleatoriamente no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleos. A varredura foi feita por meio de um laser de argônio (488 nm). As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms, sendo utilizadas para a criação de imagens bidimensionais (tempo no eixo x e fluorescência no eixo y).

As *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  foram medidas nas células em condições quiescentes. As imagens bidimensionais adquiridas foram analisadas utilizando-se a interface gráfica *SparkMaster*, um programa para análise de *Sparks* que é inserido no software livre *ImageJ* (60). O *SparkMaster* é um programa automatizado que foi desenvolvido e adaptado a partir de algoritmos específicos para análises das *sparks* medidas por microscopia confocal (21). Neste tipo de análise, considerando-se as *sparks* como eventos discretos, o algoritmo identifica os sinais de fluorescência baseado nos seus desvios a partir do ruído de fundo da imagem original (*background noise*). Assim, a imagem original é filtrada, normalizada e a média e o desvio-padrão do plano de fundo são calculados. As regiões da imagem excedendo 1,5 x desvio-padrão a partir do plano de fundo são utilizadas para a construção de uma linha de base para a normalização da imagem total. Esta última imagem, normalizada, é utilizada para a detecção e análise das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , de forma que os eventos com áreas (em *pixel*) excedendo um limiar de detecção pré-estabelecido (2,0 x desvio-padrão acima da média) são considerados possíveis *sparks*. Novamente, a média e o desvio-padrão são calculados subtraindo-se as *sparks* em potencial. Após estes processos, as possíveis *sparks* são consideradas para análise se as áreas contendo valores acima do limiar de detecção pré-estabelecido contêm valores de pixel que excedem o seguinte critério: desvio-padrão x fator de limiar + média do *background*. O fator de limiar é escolhido pelo usuário, sendo que, baseado em resultados anteriores (60), o fator adotado no presente trabalho foi 3,8. A velocidade de varredura (*scanning speed*) e o tamanho do *pixel* (*pixel size*) foram 800 lps e 0,14  $\mu\text{m}$ , respectivamente. As variáveis analisadas a partir do *SparkMaster*

foram: amplitude da *spark* ( $\Delta F/F_0$ ); largura total da *spark* na metade da amplitude máxima (FWHM em  $\mu\text{m}$ ); duração total da *spark* na metade da amplitude máxima (FDHM em ms); largura total da *spark* ( $\mu\text{m}$ ); duração total da *spark* (ms); tempo até o pico da *spark* (ms); inclinação máxima da fase ascendente da *spark* ( $I_{\text{max}}$  em  $(\Delta F/F_0)/\text{s}$ ); constante de tempo de decaimento da *spark* ( $\tau$  em ms); frequência das *sparks* ( $\text{sparks} \times 100 \mu\text{m}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ). As siglas das variáveis estudadas, relativas às *sparks*, foram mantidas de acordo com a nomenclatura original do *SparkMaster* (60). Após a obtenção dos dados, histogramas de frequência foram construídos e os dados das distribuições das *sparks* comparados entre os grupos DP e AD.

Os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  foram evocados por meio de estimulação de campo. Os cardiomiócitos foram estimulados por um par de eletrodos de platina, com um pulso supra-limiar de 0,2 ms e 20 V (*Voltage square pulse*). As células foram estimuladas na frequência de 1 Hz para produzir condições estacionárias. As imagens obtidas foram processadas usando o software IDL 5.2 (Research Systems, Inc., Boulder, CO, EUA). Os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  foram expressos como  $F/F_0$ , onde  $F_0$  é a fluorescência basal de  $\text{Ca}^{2+}$  (28, 59). As variáveis analisadas e geradas pelo IDL são: amplitude do transiente ( $F/F_0$ ); tempo até o pico do transiente (ms); constante de tempo para o decaimento do transiente (ms).

### **MEDIDA DA CONTRAÇÃO CELULAR**

A contração celular foi avaliada por meio de um sistema de detecção de bordas (Contractility system, Ionoptix, EUA), baseado na medida de alterações

no comprimento dos cardiomiócitos, acoplado a um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, Japão). Os miócitos, mantidos no meio de cultura DMEM (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro e visualizados em um monitor com um aumento de 400x através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA). Este sistema estava acoplado a um microscópio invertido com uma lente de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, Japão). As células foram visualizadas utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com uma frequência de aquisição de 240 Hz. As bordas transversais (direita e esquerda) das células foram identificadas e marcadas com duas linhas virtuais geradas pelo programa de detecção de imagens. A definição das bordas foi ajustada através do contraste (preto e branco) gerado pela qualidade da imagem projetada das células.

O comprimento ( $\mu\text{m}$ ) e a largura ( $\mu\text{m}$ ) das células foram medidos a partir da imagem do cardiomiócito, com calibração para  $\mu\text{m}$ , usando-se uma régua. A partir destes valores o volume celular (pL) foi calculado de acordo com a seguinte equação (63):

$$\text{Volume (pL)} = (\text{comprimento}) \times (\text{largura}) \times (7,59 \times 10^{-3}) \quad (1)$$

Onde o comprimento e a largura são dados em  $\mu\text{m}$ . O valor constante de  $7,59 \times 10^{-3}$  é um fator de calibração dado em  $\text{pL}/\mu\text{m}^2$ .

Após, as células foram estimuladas externamente (1 Hz, 20 V, 5 ms) por meio de um par de eletrodos acoplados nos dois lados internos da câmara, utilizando-se um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix,

EUA). Os movimentos das bordas dos miócitos foram capturados pelo sistema de detecção e armazenados para análise posterior.

Os resultados gerados foram analisados por meio de um programa caseiro desenvolvido na plataforma MatLab<sup>®</sup>, como previamente descrito (62). As variáveis analisadas e geradas pelo programa são: amplitude de contração (variação percentual do comprimento celular em relação ao repouso, % encurtamento); tempo até o pico de contração (ms); velocidade máxima de contração ( $\mu\text{m/s}$ ); tempo total de relaxamento (ms); tempo até 50% do relaxamento (ms); velocidade máxima de relaxamento ( $\mu\text{m/s}$ ).

### ***MEDIDA DA EXPRESSÃO PROTÉICA***

A medida da expressão da SERCA2a, do RyR2, da PLB e do NCX foi feita por meio de *Western Blot* (18, 24). Os cardiomiócitos ventriculares foram homogeneizados, com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Marconi<sup>®</sup>, Brasil), a 4 °C em um tampão de lise (NaCl 150mM; Tris 50mM; EDTA.2Na 5mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM) acrescido de 0,1% de nonidet P40, 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de um coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast<sup>®</sup>, Sigma). Foram utilizados inibidores de fosfatases (NaF 20mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1mM) para a determinação das proteínas fosforiladas. Para cada experimento foram utilizadas células de uma preparação de cardiomiócitos de rato do grupo experimental avaliado, e estas células foram homogeneizadas em 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lise enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado e

armazenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry (51).

As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6.8, 3% glicerol, 1% SDS, 0.6%  $\beta$ -mercaptoetanol, azul de bromofenol). Para separação, foram aplicados 60  $\mu\text{g}$  de proteína em gel de SDS-PAGE. Para o gel de separação foi utilizado acrilamida-bisacrilamida na concentração de 7,5% e 4% no gel de concentração. Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore<sup>®</sup>, USA) com poros de 0,45 $\mu\text{m}$ . A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. Após este procedimento, a membrana foi lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% acrescido de 4% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a membrana foi incubada por uma noite em uma câmara fria (6-8 $^{\circ}\text{C}$ ) com o anticorpo primário específico. Os seguintes anticorpos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foram utilizados: anticorpo policlonal para a SERCA2a (1:2000), anticorpo monoclonal Ab para a PLB (1:5000), anticorpo monoclonal para o NCX (1:2000), anticorpo policlonal para o RyR2 (1:5000) e anticorpo policlonal para o GAPDH (1:2000). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0.3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:5000, anti-cabra IgG-HRP e anti-coelho IgG-HRP, ambos da Sigma, St.Louis, MO). Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas protéicas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (*kit* ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a

intensidade das mesmas, avaliadas por análise densitométrica através do software ImageJ. Foram utilizados o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BIORAD<sup>®</sup>, CA, USA). A expressão das proteínas estudadas foi normalizada pela expressão de GAPDH da mesma amostra.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para a escolha dos testes estatísticos foi feita previamente uma análise da normalidade de cada variável medida. As diferenças entre os grupos DP e AD em relação ao peso corporal, ao peso do coração, à razão entre o peso do coração e peso corporal, ao  $VO_{2max}$ , ao TTF, à densidade de proteínas, à razão PLB/SERCA2a e à constante de tempo foram analisadas por meio de teste *t* não pareado. As diferenças entre os parâmetros de contração celular, o transiente de  $Ca^{2+}$  e as *sparks* de  $Ca^{2+}$  foram medidas por meio do teste de *Mann-Whitney*. A relação entre o transiente de  $Ca^{2+}$  e o TTF foi verificada por meio de regressão linear. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média, exceto os parâmetros de distribuição das *sparks* de  $Ca^{2+}$ , que são apresentados como mediana. O nível de significância adotado foi de até 5 %.

---

**RESULTADOS**

---

## ***ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DE ANIMAIS COM ALTO DESEMPENHO***

Na primeira série de experimentos 180 ratos foram submetidos ao teste de exercício progressivo até fadiga para a medida da capacidade aeróbica intrínseca (Fig. 1). Na população estudada, a média do TTF foi  $31,6 \pm 0,02$  min, o que correspondeu à velocidade de 20 m/min na esteira (11<sup>o</sup> estágio do teste progressivo). O desvio-padrão para estes valores foi de 14,97 min.

Baseado no critério metodológico adotado, o grupo DP foi constituído pelos animais com o TTF entre 16,63 e 46,57 min. Isto correspondeu a 66,6% da população medida ( $n = 120$  de um total de 180 ratos). Por outro lado, os animais que correram mais de 46,57 min antes de atingirem a fadiga foram incluídos no grupo AD. Este grupo agregou 20 % da população estudada ( $n = 36$  de um total de 180 ratos). Como não foram objetivo do nosso estudo, os animais que obtiveram TTF menor que 16,63 min foram excluídos da amostra (13,4 %,  $n = 24$  de um total de 180 ratos). É importante ressaltar que esses critérios foram baseados nos resultados anteriores do grupo de Koch e Britton utilizando ratos LCR e HCR (44, 73).

## ***CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS DP E AD***

A tabela 1 apresenta as características gerais dos animais dos grupos DP e AD.

As médias do TTF são apresentadas para cada um dos grupos dentro de suas faixas de variação no histograma de desempenho (Fig. 1). Como demonstrado, os animais AD apresentaram maior TTF.

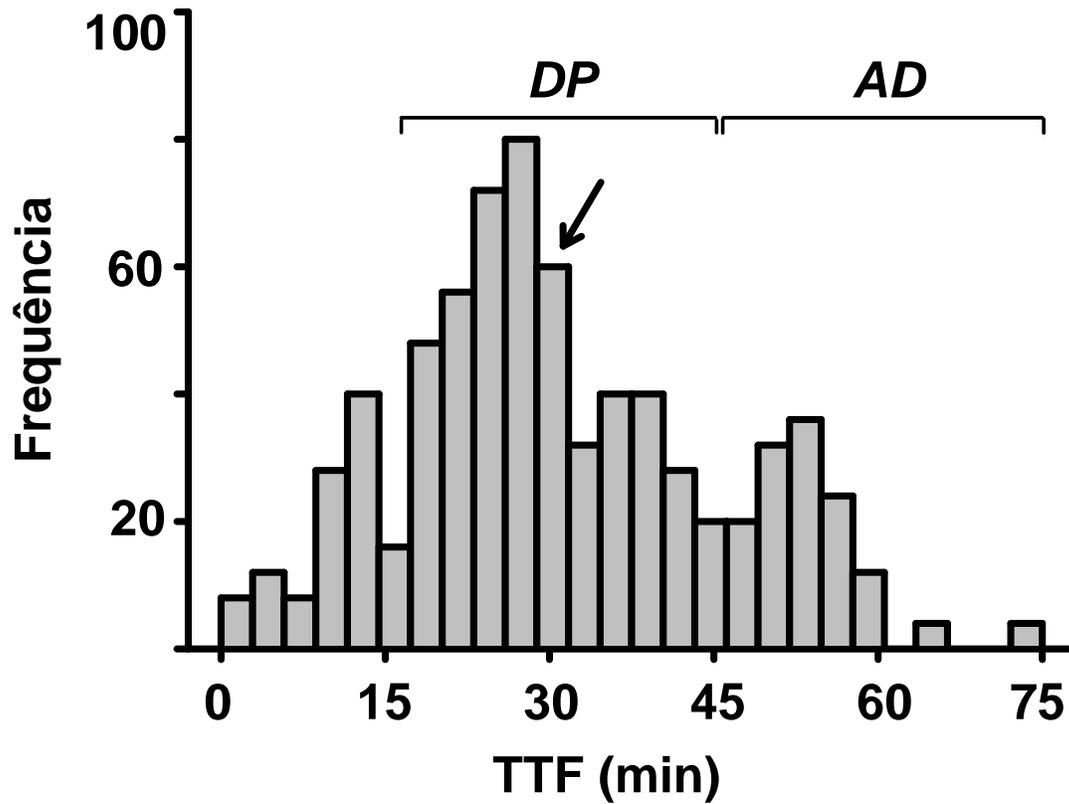


Figura 1 – Histograma da frequência de distribuição dos resultados dos testes progressivos de exercício até a fadiga. A frequência é mostrada em função do tempo total de exercício até a fadiga (TTF). N = 180 ratos. DP = Desempenho padrão (n= 120; 66,6%). AD = Alto desempenho (n= 36; 20,0%). A seta indica a média de TTF da população (n = 180;  $31,6 \pm 0,02$  min).

Tabela 1 – Características gerais dos animais dos grupos DP e AD.

<b>Variável</b>	<b>DP</b>	<b>AP</b>
<b>TTF (min)</b>	29,50 ± 0,00	54,58 ± 0,06*
<b>VO<sub>2max</sub> (mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	40,01 ± 0,42	56,72 ± 0,54*
<b>Peso corporal (g)</b>	324,7 ± 0,3	326,7 ± 0,6
<b>Peso do coração (mg)</b>	1.304,3 ± 0,6	1.367,4 ± 1,3
<b>P<sub>coração</sub>:P<sub>corporal</sub> (mg/g)</b>	4,0 ± 0,0	4,2 ± 0,1

DP = Desempenho padrão. AD = Alto desempenho. TTF = Tempo total de exercício até a fadiga (n = 120 e 36 ratos para os grupos DP e AD, respectivamente). VO<sub>2max</sub> = Consumo máximo de oxigênio (n = 6 e 6 ratos para os grupos DP e AD, respectivamente). P<sub>coração</sub>:P<sub>corporal</sub> = Razão entre o peso do coração e o peso corporal. Os dados para o peso corporal, peso do coração e o P<sub>coração</sub>:P<sub>corporal</sub> foram coletados do total de ratos utilizados nos experimentos de VO<sub>2max</sub> e transiente de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (n = 11 e 10 ratos para os grupos DP e AD, respectivamente). O asterisco (\*) indica diferença (P ≤ 0,05) em relação ao grupo DP. Os valores são mostrados como média ± erro-padrão da média.

Para confirmar se os animais selecionados como AD no teste proposto realmente apresentavam maior capacidade aeróbica que os denominados DP, em uma série específica de experimentos a medida direta do VO<sub>2max</sub> foi realizada. Como mostrado na tabela 1, os animais AD apresentaram maior capacidade aeróbica (VO<sub>2max</sub>) no momento da fadiga. É importante ressaltar que os animais não foram submetidos a nenhum tipo de treinamento prévio, sendo retirados diretamente de suas caixas no biotério e submetidos ao protocolo de seleção.

Em relação ao peso corporal, ao peso do coração e à razão entre o peso do coração e o peso corporal não foram observadas diferenças entre os grupos.

## **MEDIDAS DA FLUORESCÊNCIA DE $\text{Ca}^{2+}$**

Após a padronização e seleção dos dois grupos experimentais, uma série de experimentos com microscopia confocal foi realizada nos cardiomiócitos ventriculares isolados dos animais DP (n = 5 ratos e 83 células) e AD (n = 5 ratos e 71 células).

Para se estudar os eventos elementares associados à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos RyR2, as *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  foram medidas em células quiescentes. A figura 2 apresenta duas *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  típicas para o grupo DP (Fig. 2A) e para o grupo AD (Fig. 2B). A frequência das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  foi menor no grupo AD em relação ao DP (6,07 vs. 8,42 *sparks* x 100  $\mu\text{m}^{-1}$  x  $\text{s}^{-1}$ ;  $P \leq 0,05$ ). Por outro lado, a constante de tempo de decaimento das *sparks* foi maior nos animais AD em relação aos DP (36,0 vs. 16,4 ms;  $P \leq 0,05$ ). A tabela 2 e a figura 3 apresentam um resumo das características das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3) para os parâmetros estudados.

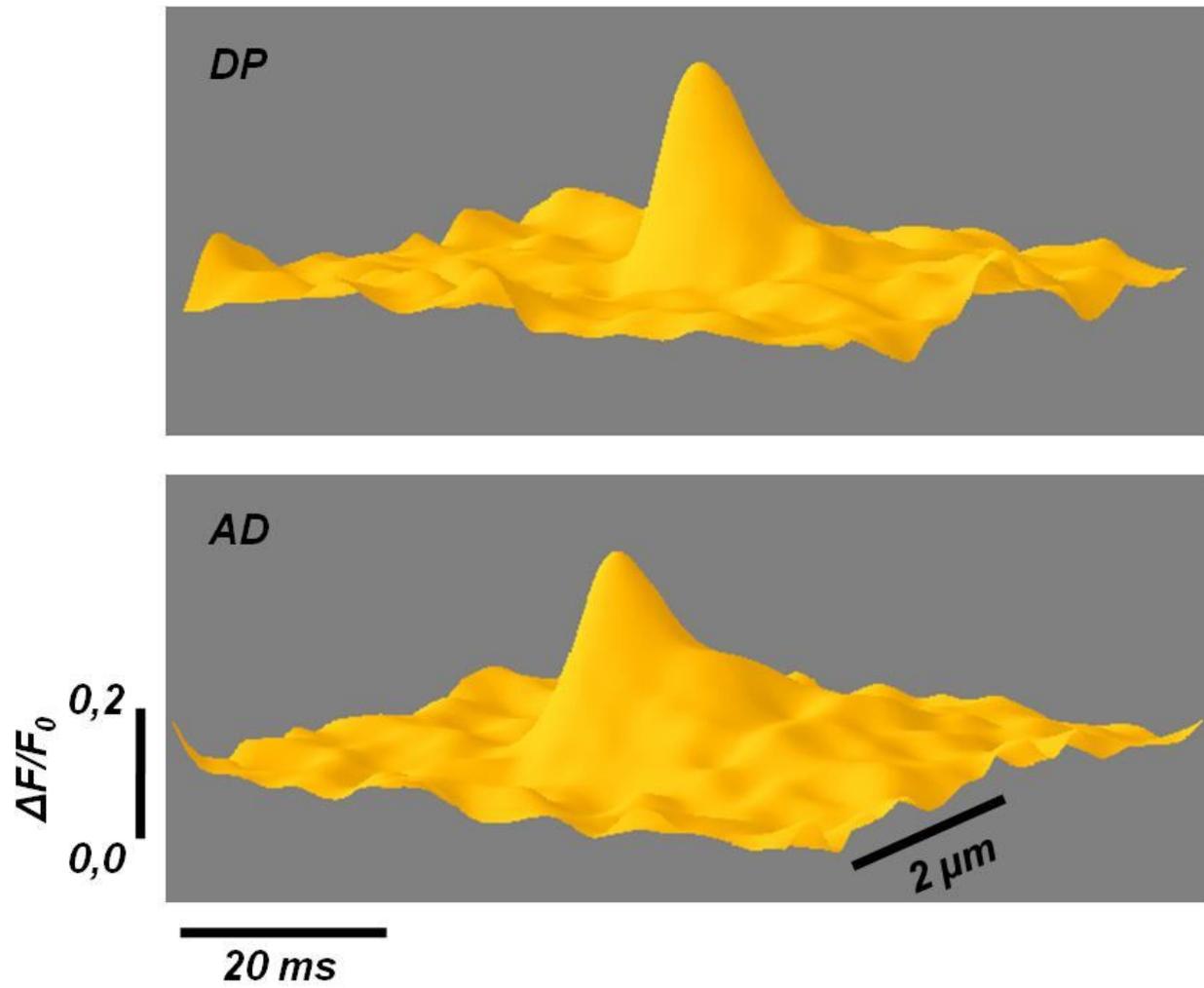


Figura 2 – Figuras representativas de *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos de ratos de desempenho padrão (DP) e alto desempenho (AD).

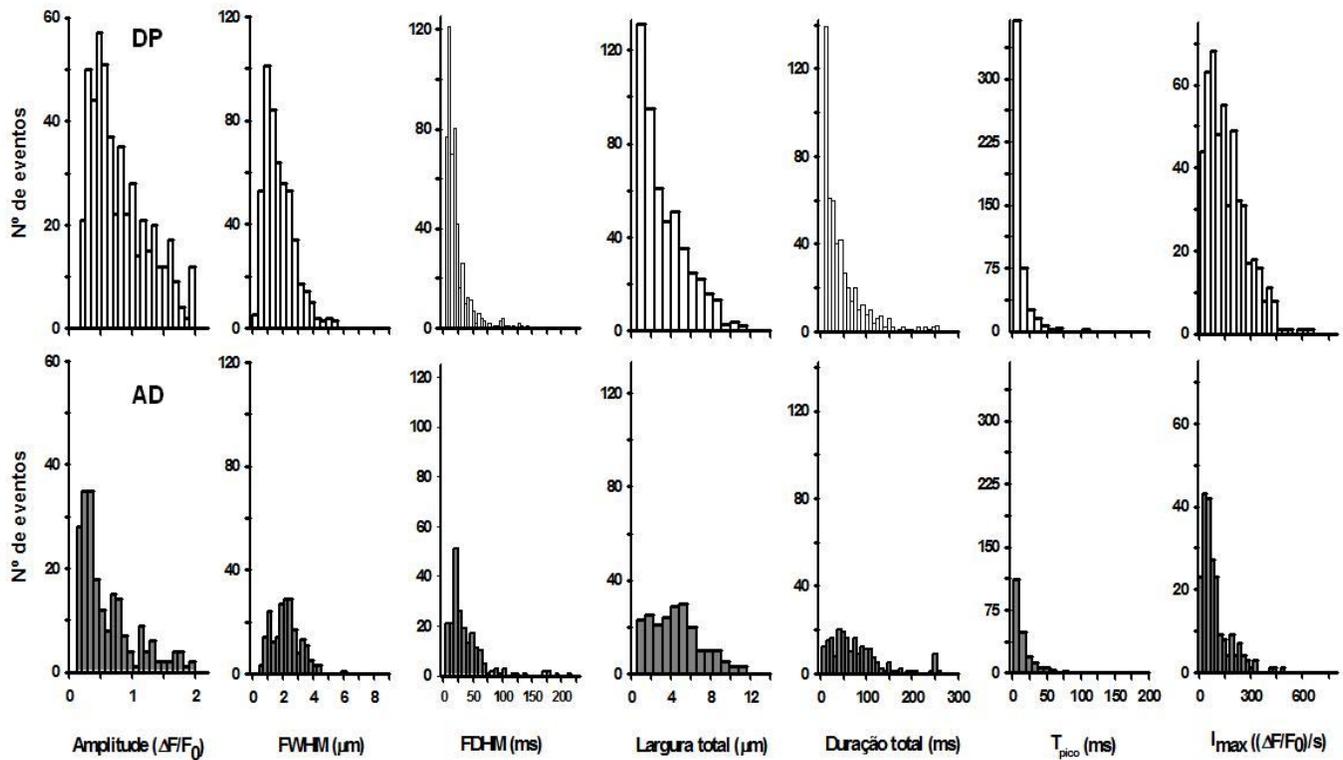


Figura 3 – Histogramas das características das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos de ratos de desempenho padrão (DP) e alto desempenho (AD). Amplitude = amplitude máxima da *spark* ( $\Delta F/F_0$ ); FWHM = largura total da *spark* na metade da amplitude máxima ( $\mu\text{m}$ ); FDHM = duração total da *spark* na metade da amplitude máxima (ms); Largura total = largura total da *spark* ( $\mu\text{m}$ ); Duração total = duração total da *spark* (ms);  $T_{\text{pico}}$  = tempo até o pico da *spark* (ms);  $I_{\text{max}}$  = inclinação máxima da fase ascendente da *spark* ( $(\Delta F/F_0)/\text{s}$ ).

Após as medidas das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , os transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  foram medidos nos cardiomiócitos dos animais DP (Fig. 4Aa) e AD (Fig. 4Ab). Como observado (Fig. 4B), a amplitude do transiente de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  foi 20 % maior nos cardiomiócitos dos animais AD em relação aos DP ( $5,54 \pm 0,31$  vs.  $4,18 \pm 0,12$ ;  $p \leq 0,05$ ). Não foram observadas diferenças no tempo até o pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  entre os grupos (HP,  $32,9 \pm 1,7$  ms vs. SP,  $30,9 \pm 2,5$  ms) (Fig. 4C).

Tabela 2 – Características das *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos ventriculares de ratos DP e AP.

<b>Variável</b>	<b>DP</b>	<b>AD</b>
<b>Amplitude (<math>\Delta F/F_0</math>)</b>	0,691	0,435*
<b>FWHM (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	1,54	2,1*
<b>FDHM (ms)</b>	15,0	27,0*
<b>Largura total (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	2,66	4,34*
<b>Duração total (ms)</b>	30,0	60,0*
<b><math>T_{\text{pico}}</math> (ms)</b>	7,5	10,0*
<b><math>I_{\text{max}}((\Delta F/F_0)/\text{s})</math></b>	140,8	68,34*
<b><math>\tau</math> (ms)</b>	16,4	36,0*

DP = desempenho padrão. AD = alto desempenho. Amplitude = amplitude da *spark*; FWHM = largura total da *spark* na metade da amplitude máxima; FDHM = duração total da *spark* na metade da amplitude máxima; Largura total = largura total da *spark*; Duração total = duração total da *spark*;  $T_{\text{pico}}$  = tempo até o pico da *spark*;  $I_{\text{max}}$  = inclinação máxima da fase ascendente da *spark*;  $\tau$  = constante de tempo de decaimento da *spark*. O asterisco (\*) indica diferença ( $P \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DP. Os valores são mostrados como mediana.

Para se estudar a cinética de recuperação do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  entre os grupos DP e AD, a fase de decaimento do transiente foi ajustada para uma função mono exponencial com a seguinte forma (59):

$$f(t) = A_0 + A * \exp \left[ \frac{-t}{\tau} \right] \quad (2)$$

Onde  $A_0$  é o componente independente de tempo,  $A$  é o componente de amplitude do decaimento,  $t$  é o tempo (em ms) e  $\tau$  (tau) representa a constante de tempo para o decaimento do transiente (em ms). A (Fig. 4D) apresenta análises exponenciais para o decaimento do transiente em uma célula

representativa do grupo DP (4Da;  $r^2 = 0.9982$ ) e outra do grupo AD (4Db;  $r^2 = 0.9957$ ). Quando analisados os resultados para a constante de tempo de decaimento do transiente, não houve diferenças entre os grupos DP ( $378.60 \pm 0.04$  ms) e AD ( $373.30 \pm 0.05$ ) (Fig. 4E).

O próximo passo na análise do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  foi verificar se houve correlação entre o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e o TTF no teste de exercício progressivo até a fadiga. Com esse propósito, a média da amplitude máxima do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  foi comparada com o TTF para cada rato (Fig. 5). Como observado, houve correlação positiva entre o pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e a capacidade aeróbica intrínseca ( $r = 0,81$ ).

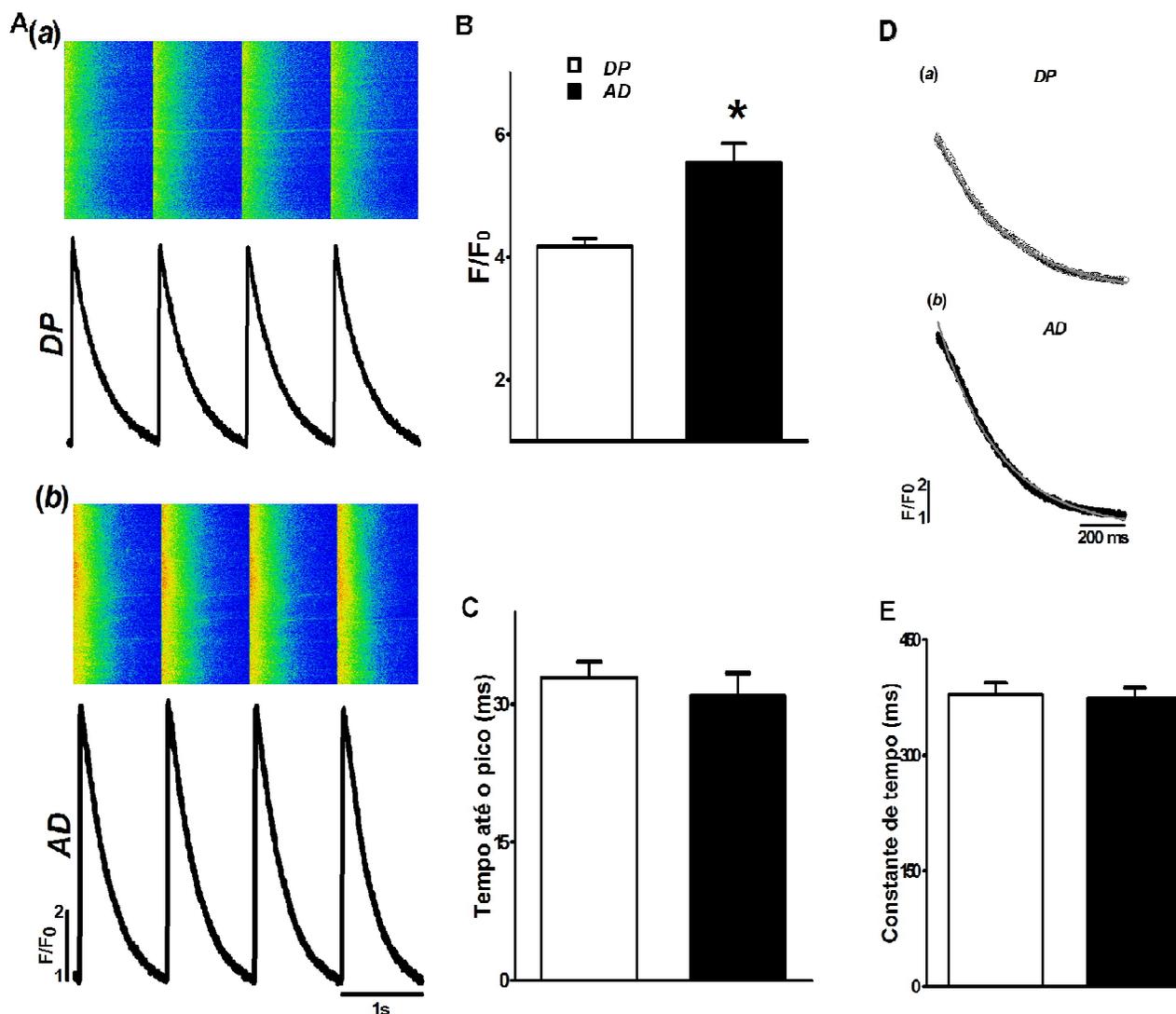


Figura 4 – A) Traçados representativos das imagens de fluorescência para o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos de ratos de desempenho padrão (DP; Aa) e alto desempenho (AD; Ab). O sinal é mostrado como taxa de intensidade de fluorescência ( $F/F_0$ ). A fluorescência ( $F$ ) foi normalizada em função da fluorescência mínima ( $F_0$ ) entre as contrações estimuladas a 1 Hz. B) Amplitude máxima do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos ratos DP ( $4,18 \pm 0,12$ ) e AD ( $5,54 \pm 0,31$ ). C) Tempo até o pico do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos ratos DP ( $30,89 \pm 2,50$  ms) e AD ( $32,89 \pm 1,71$  ms). D) Curvas representativas da análise exponencial para o decaimento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos ratos DP (a) e AD (b). As linhas sobrepostas representam o ajuste dos dados determinados por uma função monoexponencial:  $f(t)=A_0+A \cdot \exp(-t/\tau)$ . E) Constante de tempo para o decaimento do transiente nos ratos DP ( $378,60 \pm 0,04$  ms) e AD ( $373,30 \pm 0,05$ ). O asterisco (\*) indica diferença ( $P \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DP. DP = 5 ratos e 83 células. AD = 5 ratos e 71 células. Os dados são mostrados como média  $\pm$  erro-padrão da média.

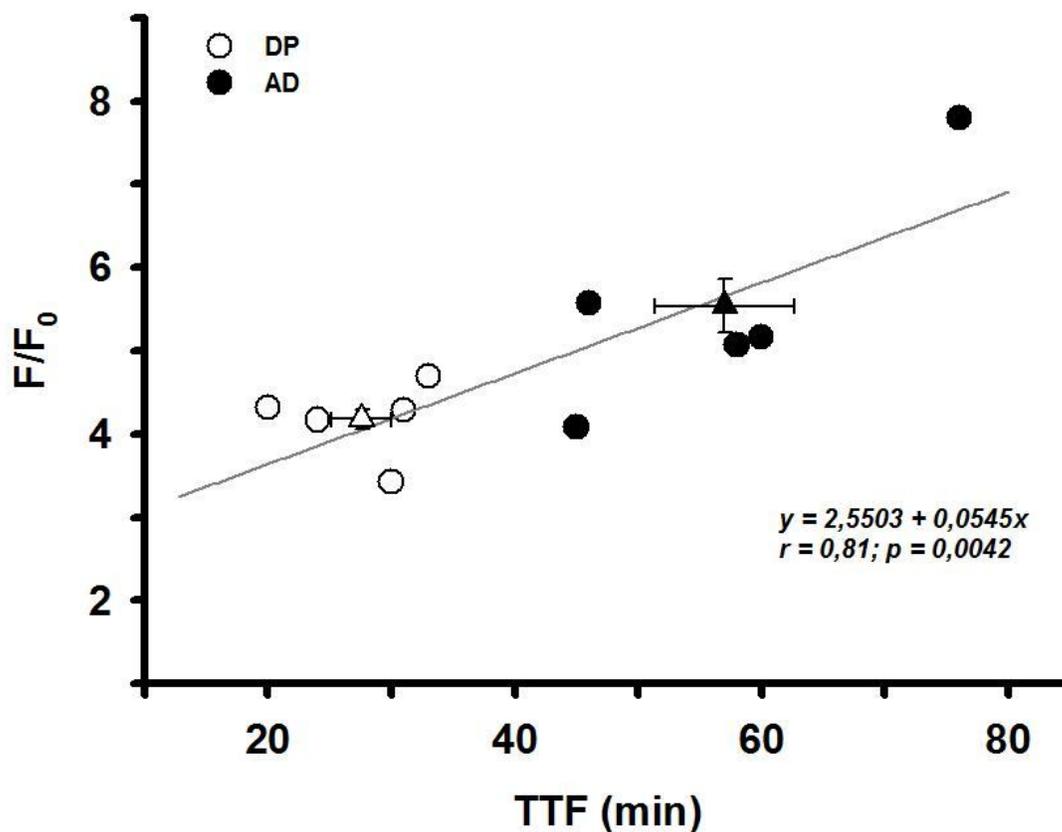


Figura 5 – Correlação entre o tempo total de exercício até a fadiga (TTF em min) e a amplitude máxima do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $F/F_0$ ). DP = Desempenho padrão ( $n = 5$  ratos e 83 células). AD = Alto desempenho ( $n = 5$  ratos e 71 células). Os triângulos abertos ( $\Delta$ ) e fechados ( $\blacktriangle$ ) representam as médias  $\pm$  erros-padrões das médias para os grupos DP e AD, respectivamente. Os círculos abertos ( $\circ$ ) e fechados ( $\bullet$ ) representam as médias das amplitudes das células para cada rato dos grupos DP e AD, respectivamente.

## **MEDIDA DA CONTRAÇÃO CELULAR**

Uma vez que foi observada uma maior amplitude para o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos dos animais AD, uma nova série de experimentos foi realizada para verificar se este aumento inerente estava associado a alterações na capacidade contrátil destas células.

A figura 6 apresenta dois traçados típicos de contrações para uma célula do grupo DP e outra do grupo AD. Quando comparado ao grupo DP (n = 4 ratos e 96 células), a amplitude de contração foi 12% maior nas células dos animais AD (n = 4 ratos e 108 células). Em relação à função sistólica, além da amplitude de contração, também foi observada maior velocidade máxima de contração (29%) nas células do grupo AD. Em relação à função diastólica, foi observado um menor tempo até 50% de relaxamento (-9%) e uma maior velocidade máxima de relaxamento (33%) nos cardiomiócitos do grupo AD. Cabe ressaltar que foi encontrado um valor de  $p = 0,059$  para o tempo total de relaxamento entre os grupos. Os resultados dos parâmetros de contração são apresentados na tabela 3.

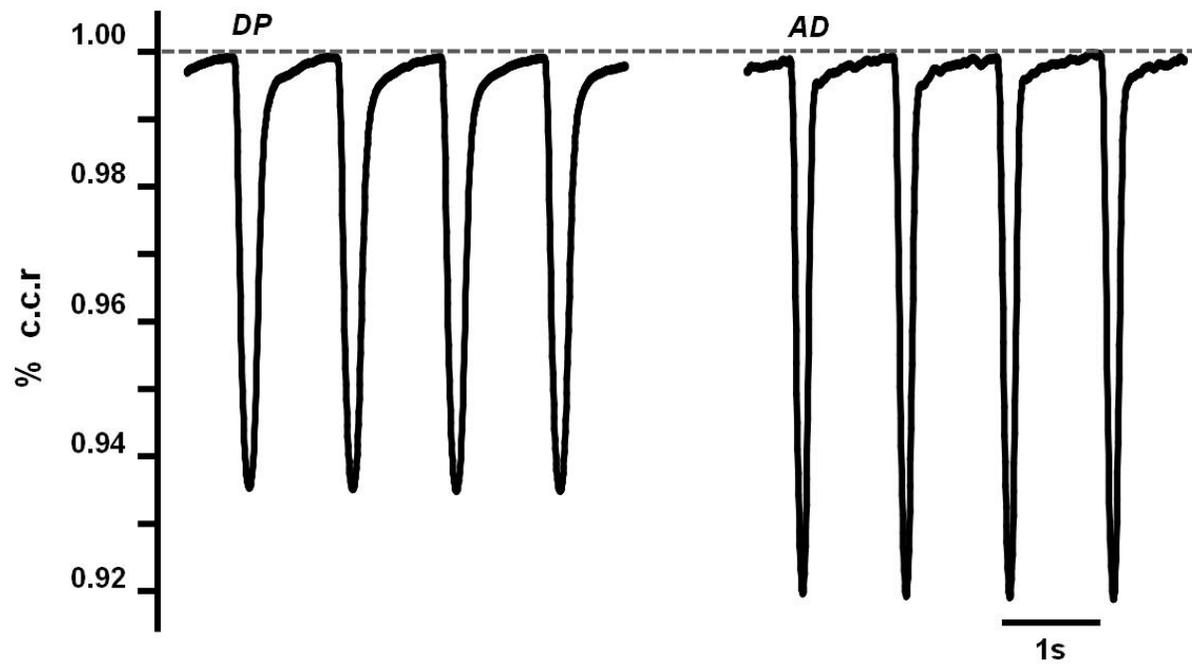


Figura 6 – Registros representativos da contração celular em cardiomiócitos ventriculares de ratos DP (desempenho padrão) e AD (alto desempenho). % c.c.r. = Amplitude de contração expressa como percentual do comprimento celular de repouso.

Tabela 3 – Contração celular em cardiomiócitos ventriculares de ratos DP e AP.

<i>Variável</i>	<i>DP</i>	<i>AD</i>
<b>Variáveis celulares</b>		
<b>Comprimento (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	157,9 $\pm$ 2,0	160,4 $\pm$ 1,9
<b>Largura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	21,6 $\pm$ 0,4	21,1 $\pm$ 0,4
<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	25,9 $\pm$ 0,6	25,5 $\pm$ 0,5
<b>Função sistólica</b>		
<b>Amplitude (% c.c.r.)</b>	6,0 $\pm$ 0,3	6,7 $\pm$ 0,2*
<b><math>T_{\text{pico}}</math> (ms)</b>	155,0 $\pm$ 4,0	149,0 $\pm$ 2,0
<b><math>VC_{\text{max}}</math> (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	87,0 $\pm$ 4,5	111,8 $\pm$ 5,3*
<b>Função diastólica</b>		
<b><math>T_{\text{relax}}</math> (ms)</b>	259,0 $\pm$ 10,0	236,0 $\pm$ 7,0
<b><math>T_{50\%}</math> (ms)</b>	90,0 $\pm$ 4,0	78,0 $\pm$ 2,0*
<b><math>VR_{\text{max}}</math> (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	69,8 $\pm$ 4,7	92,6 $\pm$ 5,8*

DP = Desempenho padrão (n = 96 células e 4 ratos). AD = Alto desempenho (n = 108 células e 4 ratos). Amplitude (% c.c.r.) = Amplitude de contração expressa como percentual do comprimento celular de repouso;  $T_{\text{pico}}$  = Tempo até o pico de contração;  $T_{\text{relax}}$  = Tempo do pico de contração até o relaxamento total;  $T_{50\%}$  = Tempo do pico de contração até 50% do relaxamento total;  $VC_{\text{max}}$  = Velocidade máxima de contração;  $VR_{\text{max}}$  = Velocidade máxima de relaxamento; Comprimento = Comprimento celular em repouso; Largura = largura celular em repouso; Volume = volume celular em repouso. O asterisco (\*) indica diferença ( $P \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DP. Os valores são mostrados como média  $\pm$  erro-padrão da média.

### **MEDIDA DA EXPRESSÃO PROTÉICA**

No intuito de verificar se as características intrínsecas dos animais DP e AD estavam associadas às proteínas que regulam a atividade do  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos, uma série de experimentos de expressão protéica foi realizada.

Como demonstrado na figura 7, os animais do grupo AD apresentaram maior expressão de SERCA2a e RyR2. Não foram observadas diferenças nas expressões do NCX e da PLB. Uma vez que houve aumento da SERCA2a sem modificações da PLB total, a razão entre as duas proteínas foi menor no grupo AD em relação ao DP (0,31  $\pm$  0,03 vs. 0,39  $\pm$  0,02;  $p \leq 0,05$ ).

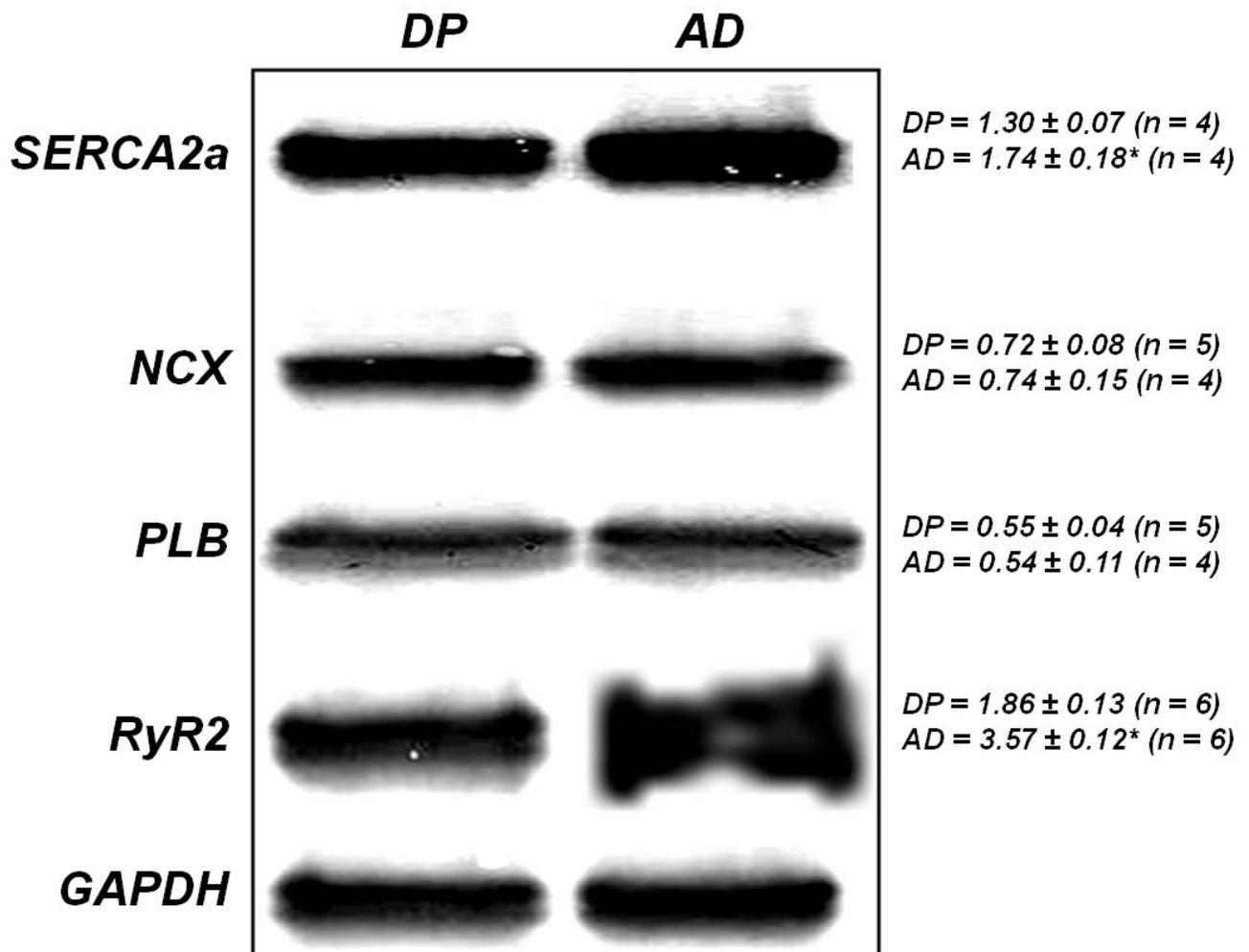


Figura 7- Imagens representativas de Western Blot para proteínas regulatórias de  $\text{Ca}^{2+}$ . SERCA2a =  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático; RyR2 = Receptores de rianodina do tipo 2 ; NCX = Trocador de sódio-cálcio; PLB = Fosfolamban. O asterisco (\*) indica diferença ( $P \leq 0,05$ ) em relação ao grupo DP. DP = Desempenho padrão. AD = Alto desempenho. Os dados são mostrados como média  $\pm$  erro-padrão da média.

---

***DISCUSSÃO***

---

O presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que, pelo menos em parte, o maior desempenho físico observado em ratos com alta capacidade aeróbica intrínseca está associado à função de cardiomiócitos ventriculares. Foi estabelecida uma estratégia de seleção que resultou na divisão de dois grupos experimentais: desempenho padrão e alto desempenho. Foi demonstrado que a estratégia de seleção estabelecida relacionou-se com a função de cardiomiócitos ventriculares isolados. Especificamente, os cardiomiócitos ventriculares isolados dos ratos com alta capacidade aeróbica intrínseca (alto desempenho) apresentaram inerências no controle do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como uma maior amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e uma maior amplitude de contração. Foram observadas também inerências nas *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$ , como uma menor amplitude das *sparks* no grupo de alto desempenho. Foi observada uma correlação positiva entre o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e a capacidade aeróbica intrínseca dos animais. A maior capacidade aeróbica intrínseca foi associada a maiores níveis de expressão protéica da SERCA2a e do RYR2. Em conjunto, esses resultados ajudam a explicar parte das divergências observadas em relação ao desempenho físico em ratos com alta capacidade aeróbica intrínseca.

A primeira série de experimentos realizada no presente estudo teve como finalidade estabelecer uma estratégia de seleção adequada para selecionar ratos com alta capacidade aeróbica intrínseca e associada à função de cardiomiócitos ventriculares.

As principais modificações na estratégia de seleção original (44) foram:

1. A utilização de ratos com desempenho padrão, ao invés de ratos com baixo desempenho;
2. O presente estudo não utilizou nenhum tipo de cruzamento direcionado para selecionar os animais;
3. A utilização de uma linhagem de ratos que não é um modelo de doença;
4. A da utilização de intervalos de 3 min, ao invés de intervalos de 2 min, entre os estágios do teste de exercício progressivo.

Como mostrado no histograma da população estudada, a frequência de ratos AD correspondeu a 20% da população. Os animais foram selecionados de acordo com o TTF e então comparados com os ratos que apresentaram desempenho padrão. Estudos anteriores com os fenótipos LCR e HCR mostraram que na décima primeira geração as duas linhagens divergiram em 347% na distância percorrida até a fadiga, o que correspondeu a um TTF de 14,3 e 41,6 min, respectivamente (44, 73). Quando comparados a estes resultados, o valor do TTF de 46,57 min ( $> 31,6 + 14,97$  min), proposto como critério atual para seleção dos animais AD, se aproxima destes prévios.

Corroborando com tais resultados, podemos observar também que, em relação ao desempenho superior, o  $VO_{2max}$  medido no momento da fadiga foi de  $56,72 \pm 0,54 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  e apresentou semelhanças com os estudos anteriores de seleção artificial que mediram após sete e quinze gerações valores de  $64,40 \pm 0,40$  e  $69,20 \pm 2,10 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , respectivamente (31, 34, 73). Estes valores são comumente encontrados em estados de treinamento caracterizados pela alta capacidade aeróbica (11, 50). No entanto, é importante

ênfatizar que o presente trabalho estudou somente os animais AD em relaçaõ aos DP, sendo excluídos os animais de baixo desempenho.

Os resultados dessa primeira sêrie experimental nos proporcionaram a determinaçaõ da distribuiçaõ de animais DP e AD na populaçaõ estudada. Além disso, e comprovado pela medida direta do  $VO_{2max}$ , os resultados mostraram que os animais selecionados por meio do protocolo proposto apresentaram alta capacidade aeróbica intrínseca.

Após a padronizaçaõ do método de seleçaõ dos ratos AD, uma segunda sêrie de experimentos foi realizada para se estudar a participaçaõ do  $Ca^{2+}$  intracelular na funçaõ dos cardiomiócitos ventriculares isolados dos ratos AD em comparaçaõ aos dos DP. Será que há inerências nesta funçaõ quando a capacidade aeróbica é levada em consideraçaõ? Será que há inerências na sinalizaçaõ de  $Ca^{2+}$  que podem explicar parte das divergências observadas na capacidade aeróbica intrínseca?

Nossos resultados mostraram que os cardiomiócitos isolados dos ratos AD apresentaram um maior transiente de  $Ca^{2+}$  quando comparados aos dos DP. Contrário a isso, a amplitude das *sparks* espontâneas de  $Ca^{2+}$  foi menor nos animais AD. Ainda em relaçaõ às *sparks*, os animais AD apresentaram diferenças significativas em todos os parâmetros analisados. Além disso, e em concordância com resultados anteriores (39), foi observada também uma correlaçãõ positiva entre a capacidade aeróbica intrínseca e o transiente de  $Ca^{2+}$ . Complementar a este quadro de divergências nos ratos AD, os cardiomiócitos destes animais apresentaram maior capacidade contrátil intrínseca, com ganhos nas funções sistólica e diastólica. Por fim, foram observadas maiores expressões da SERCA2a e do RyR2 no grupo AD.

Quando analisados em conjunto, estes resultados evidenciam que dentro do espectro biológico da capacidade aeróbica para o exercício físico, a função dos cardiomiócitos é importante e pode, pelo menos em parte, ser relacionada a um componente intrínseco associado à sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  (39).

A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol, através dos RyR2, é a principal fonte responsável pela geração do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos (25, 57). Os resultados do presente estudo estão de acordo com resultados anteriores, utilizando a linhagem HCR, que mostraram que os cardiomiócitos ventriculares destes animais têm uma maior amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  quando comparados aos da linhagem LCR (34). No entanto, no presente trabalho não foram observadas diferenças na cinética de liberação e recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  estimadas por meio do tempo gasto até o pico e da constante de tempo para o decaimento do transiente. Isso contrasta com os resultados anteriores que mostraram que o maior transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos dos ratos HCR estava está associado às diferenças no tempo gasto até o pico e no tempo gasto até 50% de decaimento do transiente (34). A razão para estas diferenças não pode ser diretamente respondida neste momento, mas devido à estratégia de seleção ser diferente entre os dois modelos, pode ser que isso tenha se refletido nestes parâmetros. O modelo de seleção original (44) provavelmente apresenta, devido às várias gerações de cruzamento e seleção, uma potência e sensibilidade maiores do que o atual.

Outros trabalhos também mediram o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  em cardiomiócitos isolados, no entanto, baseando-se em ganhos na capacidade aeróbica por meio de treinamento físico, ou seja, associando-o a parte do componente aeróbico que não é inerente. Entre eles não houve consenso

quanto à resposta do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  ao treinamento físico. Há trabalhos que não encontraram diferenças entre animais treinados e sedentários (67), outros que encontraram aumento (37, 47), bem como diminuição do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (72).

Após a confirmação de que os animais AD apresentam maior amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  uma pergunta se fez necessária: há inerências nos RyR2 que podem explicar essa maior amplitude? Para tal, foram medidas as *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  e a expressão dos RyR2 em ambos os grupos experimentais. Independente de vários trabalhos anteriores, envolvendo modelo de treinamento físico e capacidade aeróbica intrínseca, terem estudado o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , pouco ainda se sabe sobre os mecanismos inerentes aos RyR2 que podem explicar o maior transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos ventriculares de ratos alta capacidade aeróbica intrínseca.

Os resultados do presente trabalho mostraram que os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD apresentam maior expressão dos RyR2. Além disso, inerências importantes também foram observadas na morfologia das *Sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Provavelmente, a maior expressão dos RyR2 encontrada no grupo AD no presente estudo explica, em parte, o maior transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos cardiomiócitos destes animais. Até onde vai nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a investigar diretamente o papel dos RyR2 neste tipo de modelo experimental. Outro ponto importante é que no presente trabalho foi medida a expressão total dos RyR2 e, portanto, se a taxa de fosforilação dos RyR2 está modificada, principalmente no nível da  $\text{Ser}^{2809}$  permanece a ser respondido. Este sítio específico é um alvo de ativação destes receptores e

quando fosforilado aumenta a liberação fracional de  $\text{Ca}^{2+}$  num sistema de sinalização que envolve principalmente as vias de PKA e CaMKII (9). Trabalhos anteriores também mostram que a sensibilidade dos RyR2 ao  $\text{Ca}^{2+}$ , juntamente com a dos miofilamentos contráteis, pode ser aumentada pelo treinamento físico em ratos (72). Contrário a isso, resultados anteriores mostraram que o exercício crônico não afeta os principais sistemas regulatórios do  $\text{Ca}^{2+}$  no coração, incluindo os RyR2 (23).

Juntamente com a maior expressão protéica, a medida das *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  também mostrou inerências na atividade dos RyR2 no grupo AD em relação ao DP. Novamente, é importante ressaltar que nenhum trabalho anterior mediu diretamente esta variável em animais selecionados por meio da capacidade aeróbica intrínseca.

Contrário ao resultado do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , a amplitude das *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$  foi menor nos animais AD. Também foi observada uma menor frequência das *sparks* neste grupo. Esta resposta oposta da amplitude, além da menor frequência das *sparks*, foi observada anteriormente em um modelo de super expressão da proteína de ligação FK506 (FKBP12.6) (29). A FKBP12.6 está ancorada aos RyR2, formando um complexo estrutural macromolecular de regulação da atividade destes receptores. Outras proteínas associadas que podem se ligar a este complexo são a PKA, as fosfatases 1 (PP1) e 2A (PP2A) e a proteína cinase A de ancoragem (mAKAP) (9). Resultados anteriores com RyR2 incorporados em bicamada lipídica mostraram que a FK506 alterou a probabilidade de abertura destes canais na presença de *cis*[ $\text{Ca}^{2+}$ ] variando entre  $10^{-7}$  e  $10^{-3}$  M (2). Outros dados também mostraram que o acoplamento adequado entre os RyR2 é regulado pela

FKBP12.6, sendo fundamental para manter a atividade simultânea e coordenada de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a sístole e a diástole, formando um grupo de canais que abrem e fecham simultaneamente (53). Complementarmente a esses dados, resultados anteriores também mostraram que, além de aumentar a probabilidade de abertura, a FKBP12.6 promove um maior tempo de abertura dos RyR2 em estados de subcondutância (74). Isso pode ter relação com as inerências observadas nas características cinéticas e morfológicas das *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ , como as maiores duração e largura total nas células dos animais do grupo AD. Se a FKBP12.6 está modificada nos cardiomiócitos dos ratos AD, permanece a ser respondido. Contudo, devido à maior expressão de RyR2 observada nestes animais, a possibilidade de haver modificações nesta proteína regulatória emerge como um candidato potencial para explicar os mecanismos intrínsecos referentes a tais divergências.

Em relação ao treinamento físico, foi mostrado em experimentos envolvendo ligação específica (*<sup>3</sup>H-ryanodine binding*) que o exercício crônico não modificava o número de RyR2 ativados na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (23). Recentemente, foi demonstrado que o exercício crônico não altera as características das *sparks* espontâneas de  $\text{Ca}^{2+}$ , embora possa reverter alguns dos efeitos deletérios causados pela diabetes sobre os RyR2 em cardiomiócitos isolados (65). Neste estudo, os resultados mostrando que o exercício crônico não modifica a capacidade de ligação específica dos RyR2 (23), foram confirmados (65).

Juntamente com as inerências observadas na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , os resultados do presente estudo também mostraram que há inerências na recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$ . Foi observado aumento na expressão protéica da

SERCA2a nos cardiomiócitos do grupo AD. As alterações da SERCA2a não foram acompanhadas por modificações na PLB e no NCX. Não foram observadas diferenças na cinética de recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  entre os grupos, como mostrado pela constante de tempo de decaimento do transiente.

A remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico para o RS, em cardiomiócitos ventriculares de ratos, é mediada principalmente pela SERCA2a (9), que pode responder por até aproximadamente 92% da recaptção total (5). Resultados anteriores utilizando os animais LCR e HCR demonstraram que a recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada pela SERCA2a em cardiomiócitos ventriculares não foi diferente entre as duas linhagens (34). O presente trabalho vai de encontro aos resultados prévios, mostrando que a SERCA2a é um alvo de adaptações. Isto pode ocorrer quando ocorrerem ganhos na capacidade aeróbica, provocados por meio de treinamento aeróbico intervalado, tal como observado em camundongos (37) e em ratos (65, 72). Em adição à SERCA2a, foi demonstrado também que o treinamento aeróbico intervalado aumentou as expressões do NCX, da  $\text{pPLB}^{\text{Thr17}}$  e da  $\text{pCaMKII}^{\text{Thr287}}$ , mas não modificou a PLB total ou a  $\text{pPLB}^{\text{Ser16}}$  (37). Em relação aos nossos resultados, não foram observadas inerências nem na PLB, nem no NCX.

A alteração intrínseca de aumento da SERCA2a sem que houvesse alterações na PLB total, tal como foi encontrada no presente estudo, já havia sido observada em animais treinados (37, 72). A PLB é o principal regulador da atividade da ATPase sarcoendoplasmática e do transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ , ambos realizados pela SERCA2a, atuando como um inibidor endógeno da SERCA2a (9). A menor taxa PLB/SERCA2a observada no grupo AD pode ter aumentado a sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e a atividade enzimática ( $V_{\text{max}}$ ) da SERCA2a (37).

Embora não tenham sido observadas diferenças na constante de decaimento do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram observados ganhos significativos na função diastólica nos cardiomiócitos dos ratos AD. Em conjunto, estes resultados indicam que, pelo menos em parte, as divergências entre os grupos AD e DP observadas na recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser atribuídas à SERCA2a. Se a atividade da SERCA2a, se os níveis de fosforilação da PLB estão modificados ou se apresentam inerências nesse estado de divergência da capacidade aeróbica, isto permanece a ser respondido.

No nível contrátil, foi observado que associado às inerências, principalmente à maior amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD apresentaram divergências significativas tanto na função sistólica, quanto na diastólica.

As maiores amplitude de contração e de velocidade máxima de contração, observadas nas células dos animais AD, mostraram que as inerências existentes na cinética do  $\text{Ca}^{2+}$  podem estar associadas a uma maior atividade contrátil dos cardiomiócitos isolados. Além disso, divergências importantes foram observadas nas variáveis associadas ao relaxamento dos cardiomiócitos.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores demonstrando que os animais HCR apresentam ganhos significativos na capacidade contrátil dos cardiomiócitos ventriculares (17, 34, 73). Estes resultados também estão de acordo com os estudos que utilizaram animais submetidos ao treinamento físico (37-39, 71, 72).

Quando se analisa o coração como um todo, a principal adaptação do miocárdio para um maior débito cardíaco que se observa, tanto nos ratos com

alta capacidade aeróbica intrínseca (36), quanto nos treinados (11), é o aumento do volume de ejeção (27). Desta forma, é provável que juntamente com as inerências na sinalização de  $Ca^{2+}$ , os ganhos na função contrátil encontrados neste trabalho com relação aos animais AD, venham a contribuir para tal resposta. Por fim, é importante ressaltar que resultados anteriores mostraram, por meio de treinamento físico, que a função dos cardiomiócitos se correlaciona mais com a capacidade aeróbica do que o tamanho celular (39). Isso pode explicar as similaridades observadas na morfologia celular no presente estudo. Tais resultados estão de acordo com os encontrados nos ratos HCR, quando comparados aos LCR. Foi observado que a maior capacidade aeróbica intrínseca não estava associada a diferenças no comprimento e na maior largura dos cardiomiócitos destes animais (73).

-----  
**CONCLUSÕES**  
-----

- A estratégia de seleção adotada neste estudo apresentou relação com a função de cardiomiócitos ventriculares.
- Os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD apresentaram um maior transiente de  $Ca^{2+}$  em relação aos dos animais DP.
- Os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD, em relação aos dos animais DP, apresentaram diminuições na amplitude, na  $I_{max}$  e na frequência das *sparks* de  $Ca^{2+}$ . Inversamente, houve aumentos na FWHM, na FDHM, na largura total, na duração total, na constante de tempo e no  $T_{pico}$ .
- Os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD apresentaram ganhos na função contrátil, sistólica e diastólica, em relação aos dos animais DP.
- Os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD apresentaram maior expressão protéica da SERCA2a em relação aos dos animais DP.
- Os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD apresentaram maior expressão protéica do RyR2 em relação aos dos animais DP.
- Os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD não apresentaram diferenças na expressão protéica da PLB em relação aos dos animais DP.

- Os cardiomiócitos ventriculares dos animais AD não apresentaram diferenças na expressão protéica do NCX em relação aos dos animais DP.

---

**REFERÊNCIAS**

---

1. **Acquisti C, Kleffe J, and Collins S.** Oxygen content of transmembrane proteins over macroevolutionary time scales. *Nature* 445: 47-52, 2007.
2. **Ahern GP, Junankar PR, and Dulhunty AF.** Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506. *FEBS Lett* 352: 369-374, 1994.
3. **Baldwin KM, Cooke DA, and Cheadle WG.** Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs. *J Appl Physiol* 42: 267-272, 1977.
4. **Balthazar CH, Coimbra, C.C.** Aerobic performance is related to restraint tolerance in rats. *Experimental Biology*. The FASEB Journal, 2006, p. A1471.
5. **Bassani JW, Bassani RA, and Bers DM.** Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol* 476: 279-293, 1994.
6. **Bassani RA, Mattiazzi A, and Bers DM.** CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268: H703-712, 1995.
7. **Berridge MJ.** Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40: 405-412, 2006.
8. **Bers DM.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205, 2002.
9. **Bers DM.** *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. AH Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002.
10. **Blair SN, Kampert JB, Kohl HW, 3rd, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Jr., and Gibbons LW.** Influences of cardiorespiratory fitness

and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA* 276: 205-210, 1996.

11. **Blomqvist CG and Saltin B.** Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol* 45: 169-189, 1983.
12. **Bouchard C, An P, Rice T, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J, Perusse L, Leon AS, and Rao DC.** Familial aggregation of VO<sub>2</sub>max response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. *J Appl Physiol* 87: 1003-1008, 1999.
13. **Bouchard C, Lesage R, Lortie G, Simoneau JA, Hamel P, Boulay MR, Perusse L, Theriault G, and Leblanc C.** Aerobic performance in brothers, dizygotic and monozygotic twins. *Med Sci Sports Exerc* 18: 639-646, 1986.
14. **Bouchard C, Rankinen T, Chagnon YC, Rice T, Perusse L, Gagnon J, Borecki I, An P, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Province M, and Rao DC.** Genomic scan for maximal oxygen uptake and its response to training in the HERITAGE Family Study. *J Appl Physiol* 88: 551-559, 2000.
15. **Britton SL and Koch LG.** Animal genetic models for complex traits of physical capacity. *Exerc Sport Sci Rev* 29: 7-14, 2001.
16. **Buck BJ, Kerman IA, Burghardt PR, Koch LG, Britton SL, Akil H, and Watson SJ.** Upregulation of GAD65 mRNA in the medulla of the rat model of metabolic syndrome. *Neurosci Lett* 419: 178-183, 2007.
17. **Bye A, Langaas M, Hoydal MA, Kemi OJ, Heinrich G, Koch LG, Britton SL, Najjar SM, Ellingsen O, and Wisloff U.** Aerobic capacity-dependent differences in cardiac gene expression. *Physiol Genomics* 33: 100-109, 2008.

18. **Capettini LS, Cortes SF, Gomes MA, Silva GA, Pesquero JL, Lopes MJ, Teixeira MM, and Lemos VS.** Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2503-2511, 2008.
19. **Cheng H and Lederer WJ.** Calcium sparks. *Physiol Rev* 88: 1491-1545, 2008.
20. **Cheng H, Lederer WJ, and Cannell MB.** Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262: 740-744, 1993.
21. **Cheng H, Song LS, Shirokova N, Gonzalez A, Lakatta EG, Rios E, and Stern MD.** Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: theory and studies with an automatic detection method. *Biophys J* 76: 606-617, 1999.
22. **Costill DL, Thomason H, and Roberts E.** Fractional utilization of the aerobic capacity during distance running. *Med Sci Sports* 5: 248-252, 1973.
23. **Delgado J, Saborido A, Moran M, and Megias A.** Chronic and acute exercise do not alter Ca<sup>2+</sup> regulatory systems and ectonucleotidase activities in rat heart. *J Appl Physiol* 87: 152-160, 1999.
24. **Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, and Guatimosim S.** Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 52: 542-548, 2008.
25. **Fabiato A.** Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85: 247-289, 1985.

26. **Fabiato A and Fabiato F.** Dependence of the contractile activation of skinned cardiac cells on the sarcomere length. *Nature* 256: 54-56, 1975.
27. **Gledhill N, Cox D, and Jamnik R.** Endurance athletes' stroke volume does not plateau: major advantage is diastolic function. *Med Sci Sports Exerc* 26: 1116-1121, 1994.
28. **Gomez AM, Guatimosim S, Dilly KW, Vassort G, and Lederer WJ.** Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. *Circulation* 104: 688-693, 2001.
29. **Gomez AM, Schuster I, Fauconnier J, Prestle J, Hasenfuss G, and Richard S.** FKBP12.6 overexpression decreases Ca<sup>2+</sup> spark amplitude but enhances [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1987-1993, 2004.
30. **Gomez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, and Lederer WJ.** Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 276: 800-806, 1997.
31. **Gonzalez NC, Howlett RA, Henderson KK, Koch LG, Britton SL, Wagner HE, Favret F, and Wagner PD.** Systemic oxygen transport in rats artificially selected for running endurance. *Respir Physiol Neurobiol* 151: 141-150, 2006.
32. **Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Saleet Jafri M, Sobie EA, and Lederer WJ.** Local Ca<sup>(2+)</sup> signaling and EC coupling in heart: Ca<sup>(2+)</sup> sparks and the regulation of the [Ca<sup>(2+)</sup>]<sub>i</sub> transient. *J Mol Cell Cardiol* 34: 941-950, 2002.

33. **Henderson KK, Wagner H, Favret F, Britton SL, Koch LG, Wagner PD, and Gonzalez NC.** Determinants of maximal O<sub>2</sub> uptake in rats selectively bred for endurance running capacity. *J Appl Physiol* 93: 1265-1274, 2002.
34. **Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Britton SL, Koch LG, Smith GL, and Ellingsen O.** Nitric oxide synthase type-1 modulates cardiomyocyte contractility and calcium handling: association with low intrinsic aerobic capacity. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14: 319-325, 2007.
35. **Hunter CJ, Koch LG, Britton SL, and Boluyt MO.** Initial signaling response to acute exercise bout is similar in hearts of rats bred for divergent exercise capacities. *Front Biosci* 13: 347-355, 2008.
36. **Hussain SO, Barbato JC, Koch LG, Metting PJ, and Britton SL.** Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1787-1791, 2001.
37. **Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, and Wisloff U.** Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 43: 354-361, 2007.
38. **Kemi OJ, Ellingsen O, Smith GL, and Wisloff U.** Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. *Front Biosci* 13: 356-368, 2008.
39. **Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U, and Ellingsen O.** Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res* 67: 161-172, 2005.

40. **Kemi OJ, Haram PM, Wisloff U, and Ellingsen O.** Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *Circulation* 109: 2897-2904, 2004.
41. **Kirchberger MA, Tada M, and Katz AM.** Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 249: 6166-6173, 1974.
42. **Klissouras V.** Heritability of adaptive variation. *J Appl Physiol* 31: 338-344, 1971.
43. **Koch LG and Britton SL.** Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. *J Physiol* 586: 83-95, 2008.
44. **Koch LG and Britton SL.** Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics* 5: 45-52, 2001.
45. **Koch LG and Britton SL.** Evolution, atmospheric oxygen, and complex disease. *Physiol Genomics* 30: 205-208, 2007.
46. **Lacerda AC, Marubayashi U, Balthazar CH, Leite LH, and Coimbra CC.** Central nitric oxide inhibition modifies metabolic adjustments induced by exercise in rats. *Neurosci Lett* 410: 152-156, 2006.
47. **Laughlin MH, Schaefer ME, and Sturek M.** Effect of exercise training on intracellular free Ca<sup>2+</sup> transients in ventricular myocytes of rats. *J Appl Physiol* 73: 1441-1448, 1992.
48. **Lauton-Santos S, Guatimosim S, Castro CH, Oliveira FA, Almeida AP, Dias-Peixoto MF, Gomes MA, Pessoa P, Pesquero JL, Pesquero JB, Bader M, and Cruz JS.** Kinin B1 receptor participates in the control of cardiac function in mice. *Life Sci* 81: 814-822, 2007.

49. **Lee IM, Sesso HD, Oguma Y, and Paffenbarger RS, Jr.** Relative intensity of physical activity and risk of coronary heart disease. *Circulation* 107: 1110-1116, 2003.
50. **Levine BD.** .VO<sub>2</sub>max: what do we know, and what do we still need to know? *J Physiol* 586: 25-34, 2008.
51. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
52. **Lujan HL, Britton SL, Koch LG, and DiCarlo SE.** Reduced susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in rats selectively bred for high aerobic capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2933-2941, 2006.
53. **Marx SO, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Henrikson C, Ondrias K, and Marks AR.** Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors). *Circ Res* 88: 1151-1158, 2001.
54. **Mitra R and Morad M.** Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5340-5344, 1986.
55. **Mitra R and Morad M.** A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am J Physiol* 249: H1056-1060, 1985.
56. **Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, and Atwood JE.** Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med* 346: 793-801, 2002.
57. **Nayler WG, Daile P, Chipperfield D, and Gan K.** Effect of ryanodine on calcium in cardiac muscle. *Am J Physiol* 219: 1620-1626, 1970.
58. **Noland RC, Thyfault JP, Henes ST, Whitfield BR, Woodlief TL, Evans JR, Lust JA, Britton SL, Koch LG, Dudek RW, Dohm GL, Cortright RN, and**

- Lust RM.** Artificial selection for high-capacity endurance running is protective against high-fat diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E31-41, 2007.
59. **Oliveira FA, Guatimosim S, Castro CH, Galan DT, Lauton-Santos S, Ribeiro AM, Almeida AP, and Cruz JS.** Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H394-401, 2007.
60. **Picht E, Zima AV, Blatter LA, and Bers DM.** SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1073-1081, 2007.
61. **Rodrigues AG, Lima NR, Coimbra CC, and Marubayashi U.** Intracerebroventricular physostigmine facilitates heat loss mechanisms in running rats. *J Appl Physiol* 97: 333-338, 2004.
62. **Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA, Jr., Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, and Cruz JS.** Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol*, 2009.
63. **Satoh H, Delbridge LM, Blatter LA, and Bers DM.** Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys J* 70: 1494-1504, 1996.
64. **Scriven DR, Dan P, and Moore ED.** Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79: 2682-2691, 2000.

65. **Shao CH, Wehrens XH, Wyatt TA, Parbhu S, Rozanski GJ, Patel KP, and Bidasee KR.** Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol* 106: 1280-1292, 2009.
66. **Spargo FJ, McGee SL, Dzamko N, Watt MJ, Kemp BE, Britton SL, Koch LG, Hargreaves M, and Hawley JA.** Dysregulation of muscle lipid metabolism in rats selectively bred for low aerobic running capacity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E1631-1636, 2007.
67. **Stones R, Natali A, Billeter R, Harrison S, and White E.** Voluntary exercise-induced changes in beta2-adrenoceptor signalling in rat ventricular myocytes. *Exp Physiol* 93: 1065-1075, 2008.
68. **Tada M and Katz AM.** Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* 44: 401-423, 1982.
69. **Troxell ML, Britton SL, and Koch LG.** Selected contribution: Variation and heritability for the adaptational response to exercise in genetically heterogeneous rats. *J Appl Physiol* 94: 1674-1681, 2003.
70. **Ward P, Labandeira C, Laurin M, and Berner RA.** Confirmation of Romer's Gap as a low oxygen interval constraining the timing of initial arthropod and vertebrate terrestrialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16818-16822, 2006.
71. **Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, and Ellingsen O.** Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 54: 162-174, 2002.
72. **Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, and Ellingsen O.** Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac

myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res* 50: 495-508, 2001.

73. **Wisloff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, Fernstrom M, Rezaei K, Lee SJ, Koch LG, and Britton SL.** Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science* 307: 418-420, 2005.

74. **Xiao RP, Valdivia HH, Bogdanov K, Valdivia C, Lakatta EG, and Cheng H.** The immunophilin FK506-binding protein modulates Ca<sup>2+</sup> release channel closure in rat heart. *J Physiol* 500 ( Pt 2): 343-354, 1997.







UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 15/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Sinalização de Ca<sup>2+</sup> em cardiomiócitos de ratos de alto e baixo desempenho para o exercício físico**", que tem como responsável(is) **Jader dos Santos Cruz**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 04/2008**.

Este certificado expira-se em **9/ 04/ 2013**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 15/2008**, related to the project entitled "**Calcium handling in cardiomyocytes selected from rats of low-and high-capacity running**", under the supervisors of **Jader dos Santos Cruz**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 9, 2008**.

This certificate expires in **April 9, 2013**.

Belo Horizonte, 14 de Março de 2008.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
**Coordenador do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@brda.ufmg.br](mailto:cetea@brda.ufmg.br)



**Thales N. Prímola-Gomes, Lúcia A. Campos, Sandra Lauton-Santos, Cláudio H. Balthazar, Silvia Guatimosim, Luciano S. A. Capettini, Virgínia S. Lemos, Cândido C. Coimbra, Danusa D. Soares, Miguel A. Carneiro-Júnior, Judson F. Quintão-Júnior, Matheus O. Souza, Jader S. Cruz and Antonio J. Natali**  
*J Appl Physiol* 107:593-598, 2009. First published Jun 4, 2009; doi:10.1152/japphysiol.91218.2008

**You might find this additional information useful...**

---

This article cites 25 articles, 16 of which you can access free at:

<http://jap.physiology.org/cgi/content/full/107/2/593#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://jap.physiology.org/cgi/content/full/107/2/593>

Additional material and information about *Journal of Applied Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/jap>

---

This information is current as of September 14, 2009 .

## Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes

Thales N. Prímola-Gomes,<sup>1,4</sup> Lúcia A. Campos,<sup>2</sup> Sandra Lauton-Santos,<sup>2</sup> Cláudio H. Balthazar,<sup>1</sup> Silvia Guatimosim,<sup>1</sup> Luciano S. A. Capettini,<sup>1</sup> Virgínia S. Lemos,<sup>1</sup> Cândido C. Coimbra,<sup>1</sup> Danusa D. Soares,<sup>3</sup> Miguel A. Carneiro-Júnior,<sup>4</sup> Judson F. Quintão-Júnior,<sup>4</sup> Matheus O. Souza,<sup>4</sup> Jader S. Cruz,<sup>2</sup> and Antonio J. Natali<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Biophysics, <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, and <sup>3</sup>Department of Physical Education, Physical Education, Physiotherapy, and Occupational Therapy School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais; and <sup>4</sup>Department of Physical Education, Biological Sciences and Health Center, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Submitted 10 September 2008; accepted in final form 28 May 2009

**Prímola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, Lemos VS, Coimbra CC, Soares DD, Carneiro-Júnior MA, Quintão-Júnior JF, Souza MO, Cruz JS, Natali AJ.** Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *J Appl Physiol* 107: 593–598, 2009. First published June 4, 2009; doi:10.1152/jappphysiol.91218.2008.—The aim of the present study was to evaluate the Ca<sup>2+</sup> handling and contractility properties of cardiomyocytes isolated from rats with high intrinsic aerobic exercise capacity. Standard-performance (SP) and high-performance (HP) rats were categorized with a treadmill progressive exercise test according to the exercise time to fatigue (TTF). The SP group included rats with TTF between 16.63 and 46.57 min, and the HP group included rats with TTF >46.57 min. Isolated ventricular cardiomyocytes were dissociated from the hearts of SP and HP rats, and intracellular global Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) transients were measured. The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transient peak was increased in the HP group relative to the SP group (5.54 ± 0.31 vs. 4.18 ± 0.12 F/F<sub>0</sub>; *P* ≤ 0.05) and was positively correlated with the TTF attained during the progressive test (*r* = 0.81). We also performed contractility measurements in isolated cardiomyocytes and found higher amplitude of contraction in the HP group compared with the SP group (6.7 ± 0.2 vs. 6.0 ± 0.3% resting cell length; *P* ≤ 0.05). To reinforce the intrinsic differences between SP and HP rats, we performed Western blot experiments and observed increased expression of sarco-(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase type 2a (1.30 ± 0.07 vs. 1.74 ± 0.18 arbitrary units; *P* ≤ 0.05) and ryanodine receptor type 2 (1.86 ± 0.13 vs. 3.57 ± 0.12 arbitrary units; *P* ≤ 0.05) in HP rats. In summary, our data showed important intrinsic differences in cardiomyocyte properties that could explain some of the divergence observed in rats with high intrinsic aerobic exercise capacity.

intrinsic exercise aerobic capacity; confocal microscopy

AEROBIC EXERCISE CAPACITY is a complex trait that encompasses multiple physiological systems under the influence of genetic and environmental factors (9). Related to genetic influence, previous results have shown that more than 70% of aerobic exercise capacity is intrinsically determined (14). One important part of this heritability relies on the cardiac muscle activity (11). Despite the well-established benefits associated with improvements in aerobic exercise capacity in both healthy (25) and cardiovascular disease conditions (24), the intrinsic cardiac

cellular mechanisms related to these benefits are not completely understood.

Adequate cardiomyocyte contractile activity is directly correlated to Ca<sup>2+</sup> cycling (2). Previous reports in cardiomyocytes isolated from bred low-capacity runner (LCR) and high-capacity runner (HCR) rats showed that the amplitudes of intracellular global Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) transients are increased in the HCR rats (26). Differences were also observed in the relative time to peak and in the time to 50% decay of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients. In contrast, sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2a)-mediated Ca<sup>2+</sup> reuptake was not different between the two strains (10). The changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients were accompanied by increases in the amplitude of cell contraction and the time to 50% of relengthening in the HCR cardiomyocytes (26). Nevertheless, no differences between strains were observed for ventricular cell length and width (26). These previous results point to intrinsic differences in Ca<sup>2+</sup> control in cardiomyocytes of rats that diverge in aerobic exercise capacity. Whether such inherent traits emerge in rats selected by aerobic exercise capacity but not breeding remains to be elucidated.

The present study tested the hypothesis that intrinsic aerobic exercise capacity is related to inherent properties of Ca<sup>2+</sup> handling and contractility in cardiomyocytes isolated from the hearts of rats with high performance. The high-performance rats were selected by a graded exercise test until fatigue and compared with those with standard performance.

### METHODS

**Animals.** Male Wistar rats weighing 250 ± 3 g at the onset of the experimental period were housed five per cage under 14:10-h light-dark cycles and had free access to water and rat chow. All experiments were carried out according to the Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals at the Federal University of Minas Gerais (protocol no. 015/08).

**Exercise test protocol.** A protocol originally proposed by Koch and Britton (15) was adapted to measure exercise time to fatigue (17). Briefly, 1 wk before the exercise tests until fatigue, the rats were familiarized on a motor-driven treadmill (Leticia Scientific Instruments, Barcelona, Spain) by running 5 min for five consecutive days (5° slope) at incremental speeds (10, 10, 11, 13, 15 m/min). The treadmill electrical stimulus was set at 0.28 mA. The exercise intensity and duration were below the levels required to evoke training adaptation (1). Animals that were unable to adapt to the treadmill were excluded from the study (fewer than 10%). During the second week, every rat was evaluated every other day for running capacity until fatigue. All test trials were performed at a constant slope of 5° with a

Address for reprint requests and other correspondence: A. J. Natali, Av. Peter Henry Rolfs, Viçosa, Minas Gerais, 36570000, Brazil (e-mail: anatali@ufv.br).

starting speed of 10 m/min. Treadmill speed was increased by 1 m/min every 3 min and stopped when the rat attained fatigue. Fatigue was defined and the test was stopped when the rat could no longer keep pace with the treadmill speed (22).

**Animal selection.** The strategy of selection used in the present study was based on the exercise time to fatigue (TTF) for each rat. According to the best day in terms of exercise performance (4), a frequency histogram was constructed (Fig. 1) and two experimental groups were assigned: standard performance (SP) and high performance (HP). To be included in the SP group, an animal had to have a TTF that fell within one standard deviation of the population average. To be included in the HP group, the animal needed to have a TTF that was more than one standard deviation above the average. In contrast, animals with a TTF of more than one standard deviation below the average were excluded. These grouping parameters were based on the results of Koch and Britton's group with the LCR and HCR lines (15, 26).

**Oxygen consumption measurements.** Oxygen consumption at the point of fatigue was used as an index of aerobic capacity ( $\dot{V}O_{2max}$ ) and was measured by an open-flow indirect calorimeter (Columbus Instruments, Columbus, OH) calibrated before each use with a certified mixture of gases (20.5%  $O_2$  and 0.5%  $CO_2$ ).  $\dot{V}O_2$  ( $ml\ O_2 \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ ) was continuously recorded online every minute at rest and during exercise until fatigue by a computerized system (Oxymax Apparatus Columbus Instruments).

**Cardiomyocyte isolation.** Two days after the exercise test, the rats were weighed and killed by decapitation under resting conditions, and their hearts were quickly removed. Ventricular cardiomyocytes from the hearts of SP and HP rats were enzymatically isolated as previously described (21). Briefly, the hearts were mounted on a Langendorff system and perfused for ~5 min with  $Ca^{2+}$ -free solution containing (in mM) 130 NaCl, 5.4 KCl, 0.5  $MgCl_2$ , 0.33  $NaH_2PO_4$ , 1 lactate, 3 pyruvate, 22 glucose, and 25 HEPES (pH set at 7.4). Afterward, the hearts were perfused for 10–15 min with a solution containing 1 mg/ml collagenase type II (Worthington) and 0.17 mg/ml protease type IX (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). The digested heart was then removed from the cannula and weighed, and the ventricles were cut into small pieces. Single cells were isolated by mechanical titration and stored in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma Chemicals) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil). Only calcium-tolerant, quiescent, rod-shaped myocytes showing clear cross striations were studied. The isolated cardiac myocytes were used within 2–3 h after isolation. It is important to note that during cardiomyocyte maintenance in the presence of fetal bovine serum, we did not observe any signs of dedifferentiation. This is a condition characterized by a loss of rod shape and cross striations, causing the myocytes to spread out and become polygonal.

**Intracellular  $Ca^{2+}$  measurements.** Freshly isolated myocytes obtained from resting SP and HP hearts were loaded with 5  $\mu M$  fluo-4

AM (Molecular Probes, Eugene, OR; stock solution prepared in DMSO) for 20 min at room temperature and then washed with an extracellular solution that contained 1.8 mM  $Ca^{2+}$  to remove excess dye (18).  $[Ca^{2+}]_i$  transients were elicited by field stimulating myocytes through a pair of platinum electrodes with a 0.2-ms suprathreshold voltage square pulse. Cells were stimulated at 1 Hz to produce steady-state conditions. A Meta LSM 510 scanning system (Zeiss, Jena, Germany) with a  $\times 63$  oil-immersion objective was used for confocal fluorescence imaging. Fluo-4 was excited at 488 nm (argon laser), and emission intensity was measured at 510 nm. For recording  $Ca^{2+}$  transients, myocytes were scanned with a 512-pixel line positioned randomly along the longitudinal axis of the cell, although care was taken to avoid crossing the nuclei. Cells were scanned every 1.54 ms, and sequential scans were stacked to create two-dimensional images with time on the  $x$ -axis. Digital image processing was performed using routines custom written in the IDL programming language (Research Systems, Boulder, CO).  $Ca^{2+}$  levels are reported as  $F/F_0$ , where  $F_0$  is the minimal fluorescence intensity average measured between 1-Hz contractions at the diastolic phase of  $[Ca^{2+}]_i$  transients.

**Measurements of cell contractility.** Cell contractility was evaluated as previously described (19). Briefly, isolated cells were placed in a chamber with a glass coverslip base mounted on the stage of an inverted microscope (Nikon Eclipse TS100). The chamber was perfused with Tyrode solution at room temperature (23). Steady-state 1-Hz contractions were elicited via platinum bath electrodes (MyoPacer field stimulator; IonOptix, Milton, MA) with 5-ms-duration voltage pulses and an intensity of 20 V. Cells were visualized on a personal computer monitor with a NTSC camera (MyoCam; IonOptix) in partial scanning mode. This image was used to measure cell shortening (our index of contractility) in response to electrical stimulation using a video motion edge detector (IonWizard; IonOptix). The cell image was sampled at 240 Hz. Cell shortening was calculated from the output of the edge detector using an IonWizard analog-to-digital converter (IonOptix). Cell shortening contraction from stimulation (expressed as a percentage of resting cell length), maximal velocity of contraction and relaxation, time to peak of the contraction, and time to half-contraction and -relaxation were calculated as previously described (23).

**Western blot procedure.** Western blotting was performed as previously described (5, 6) with some modifications. Briefly, ventricular cardiomyocytes were lysed at 4°C with lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris·HCl, 5 mM EDTA·2Na, and 1 mM  $MgCl_2$  plus 1% Triton X-100, 0.5% SDS, and protease inhibitor cocktail SigmaFAST (Sigma)], the lysate was centrifuged, and the protein concentration of the supernatant was determined spectrophotometrically. Equal amounts of protein (30  $\mu g$ ) were separated in a denaturing SDS polyacrylamide gel (7.5 or 15%). Proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Millipore). Blots were blocked at room temperature with 5% nonfat dry milk in PBS plus 0.1% Tween 20 (PBS-T). The following antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were used: a polyclonal antibody for SERCA2a (1:2,000), a phospholamban (PLB) monoclonal antibody (1:5,000), a monoclonal anti-sarcolemmal  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange (NCX) antibody (1:2,000), a polyclonal ryanodine receptor type 2 (RyR2) antibody (1:5,000), and a polyclonal anti-GAPDH antibody (1:2,000). Immunocomplexes were detected by chemiluminescent reaction (ECL kit; Amersham, Les Ulis, France) followed by densitometric analyses with the software package ImageQuant.

**Statistical analysis.** Differences between groups for body weight, heart weight, heart weight-to-body weight ratio,  $\dot{V}O_{2max}$ , TTF, protein density, and time constant were assessed using unpaired  $t$ -tests. Differences in cell contractility parameters,  $[Ca^{2+}]_i$  transient amplitudes, time to peak, and times to 50, 75, and 90% declines in  $[Ca^{2+}]_i$  transients were assessed using Mann-Whitney tests. The relationship between  $[Ca^{2+}]_i$  transients and TTF was assessed by linear regression.

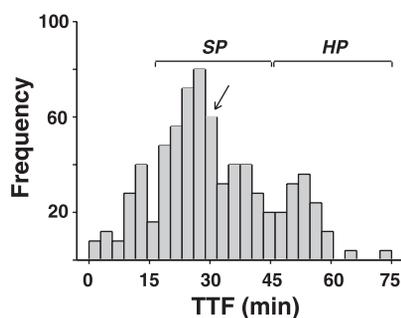


Fig. 1. Histogram of frequency distribution (number of tests) of rats submitted to a progressive exercise test until fatigue (TTF). The frequency is shown as total exercise time until fatigue (TTF, min). SP, standard-performance rats ( $n = 120$ ; 66.6%); HP, high-performance rats ( $n = 36$ ; 20%). Arrow indicates the bin of the population average ( $31.6 \pm 0.02$  min).

Table 1. Body weight, heart weight, body weight-to-heart weight ratio, TTF, and  $\dot{V}O_{2\max}$  of SP and HP rats

Variable	SP	HP
TTF, min	29.50 ± 0.00	54.58 ± 0.06*
$\dot{V}O_{2\max}$ , ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>	40.01 ± 0.42	56.72 ± 0.54*
Body weight, g	324.7 ± 0.3	326.7 ± 0.6
Heart weight, mg	1,304.3 ± 0.6	1,367.4 ± 1.3
HW/BW, mg/g	4.0 ± 0.0	4.2 ± 0.1

Values are means ± SE in standard-performance (SP) and high-performance (HP) rats. TTF, total exercise time until fatigue ( $n = 120$  SP and 36 HP rats);  $\dot{V}O_{2\max}$ , maximal O<sub>2</sub> consumption ( $n = 6$  SP and 6 HP rats); HW/BW, heart weight-to-body weight ratio. Data for body weight, heart weight, and HW/BW are from rats used in  $\dot{V}O_{2\max}$  and intracellular global Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) transient experiments ( $n = 11$  SP and 10 HP rats). \* $P \leq 0.05$  vs. SP.

Results are means ± SE. A statistical significance level of 5% was adopted.

## RESULTS

**HP rats.** In the first series of experiments, 180 animals performed the progressive test until fatigue (Fig. 1). The population average TTF was 31.6 ± 0.02 min, corresponding to a treadmill speed of 20 m/min (11° test stage) with a standard deviation of 14.97 min. Thus, based on the adopted criterion, the SP group included animals with TTF values between

16.63 and 46.57 min (SP = 66.6%;  $n = 120/180$  animals). In contrast, animals that ran more than 46.57 min until fatigue were included in the HP group (HP = 20%,  $n = 36/180$  animals). Animals that failed to run longer than 16.63 min were excluded from the study (13.4%;  $n = 24/180$  animals).

**Characteristics.** Table 1 summarizes the characteristics of the SP and HP groups. Both TTF and  $\dot{V}O_{2\max}$  were greater in the HP group compared with the SP group. No differences were observed in body weight, heart weight, or the heart weight-to-body weight ratio.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients.** After the two groups were established, confocal measurements of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients were made in isolated ventricular cardiomyocytes from resting SP ( $n = 5$  rats and 83 cells) and HP groups ( $n = 5$  rats and 71 cells). Figure 2A shows typical line-scan images recorded from field-stimulated SP (a) and HP (b) rat cardiomyocytes loaded with the Ca<sup>2+</sup> indicator fluo-4 AM. As shown in Fig. 2B, HP-isolated cardiomyocytes exhibited [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients ( $5.54 \pm 0.31$ ) that were 20% and significantly higher compared with SP ( $4.18 \pm 0.12$ ;  $P \leq 0.05$ ). No significant differences were found in the time to the peak of Ca<sup>2+</sup> release (HP,  $32.9 \pm 1.71$  ms vs. SP,  $30.9 \pm 2.50$  ms) (Fig. 2C). It is important to note that no differences were observed in diastolic Ca<sup>2+</sup> fluorescence. The values of F<sub>0</sub> found were  $39.58 \pm 2.47$  and  $34.82 \pm 2.70$  for the SP and HP groups, respectively.

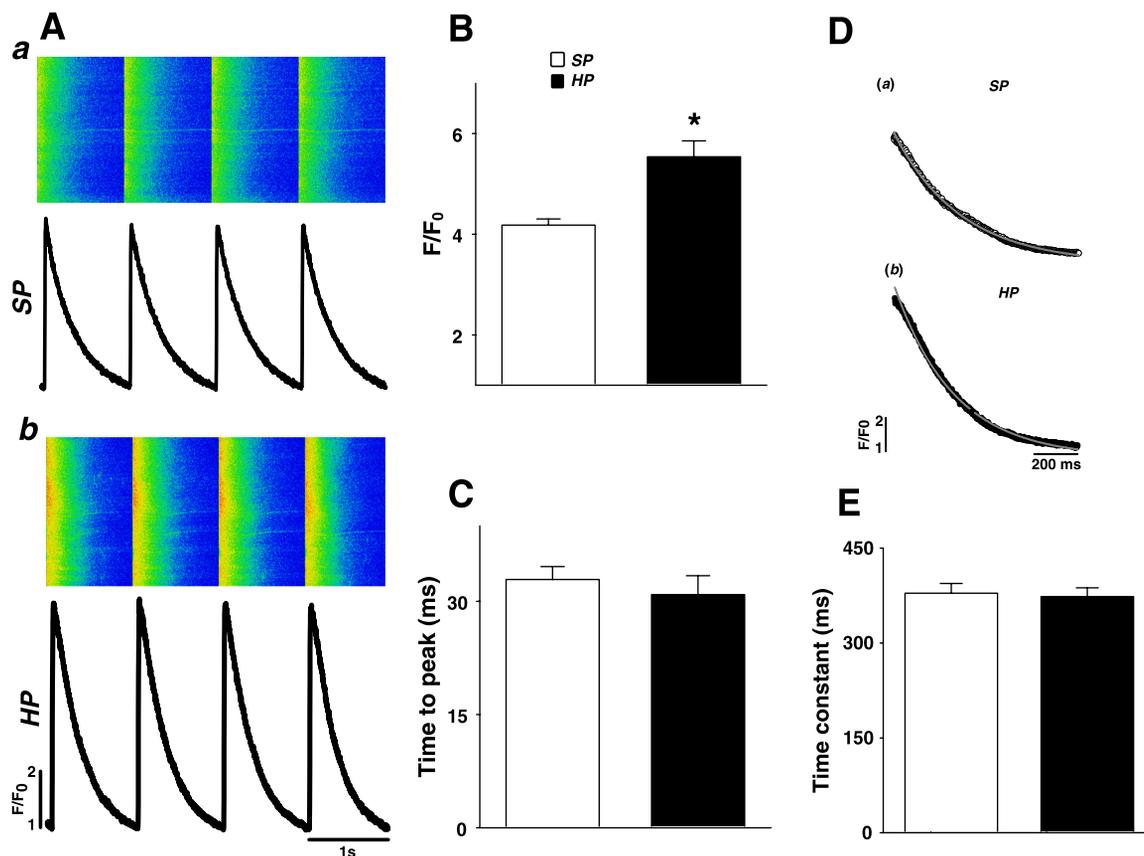


Fig. 2. A: representative line-scan images recorded from field-stimulated SP (a) and HP (b) cardiomyocytes loaded with the Ca<sup>2+</sup> indicator fluo-4 AM (5 μM). Ca<sup>2+</sup> signal is shown as fluorescence ratio (F/F<sub>0</sub>), with the fluorescence intensity (F) normalized to the minimal intensity measured between 1-Hz contractions at diastolic phase (F<sub>0</sub>). B: peak of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients in SP ( $4.18 \pm 0.12$ ) and HP rats ( $5.54 \pm 0.31$ ). C: time to peak of Ca<sup>2+</sup> release in SP ( $30.89 \pm 2.50$  ms) and HP rats ( $32.89 \pm 1.71$  ms). D: representative transient decay analyses curves of SP (a) and HP rats (b). Smooth lines represent best-fit curves to the data determined by monoexponential functions:  $f(t) = A_0 + A \cdot \exp(-t/\tau)$ . E: transient decay time constant ( $\tau$ ) of SP ( $378.60 \pm 0.04$  ms) and HP rats ( $373.30 \pm 0.05$ ). Values are means ± SE for SP ( $n = 5$  rats and 83 cells) and HP groups ( $n = 5$  rats and 71 cells). \* $P \leq 0.05$  vs. SP.

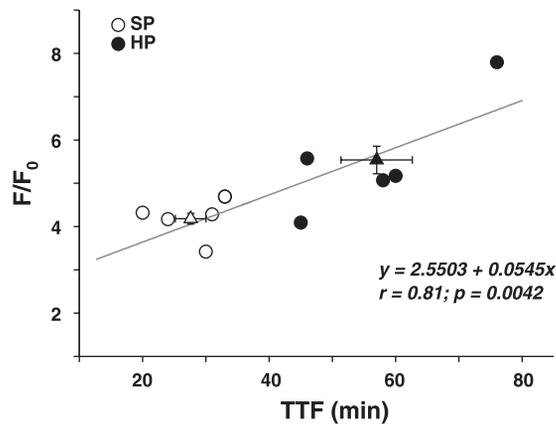


Fig. 3. Correlation between maximal treadmill speed (m/min) and global  $\text{Ca}^{2+}$  transient peak ( $F/F_0$ ) of SP ( $n = 5$  rats and 83 cells) and HP groups ( $n = 5$  rats and 71 cells).  $\triangle$  and  $\blacktriangle$  represent means  $\pm$  SE of SP and HP groups, respectively;  $\circ$  and  $\bullet$  represent the average of each rat  $\text{Ca}^{2+}$  transient peak for SP and HP groups, respectively.

To perform a more precise analysis of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient recovery kinetics, we fitted the time-dependent transient decay to monoexponential functions with the following form:

$$f(t) = A_0 + A \cdot \exp\left[\frac{-t}{\tau}\right] \quad (1)$$

where  $A_0$  is the time-independent component,  $A$  is the decay amplitude component,  $t$  is time (in ms), and  $\tau$  represents the transient decay time constant (in ms). Figure 2D shows the typical exponential analysis for SP ( $a$ ;  $r^2 = 0.9982$ ) and HP cells ( $b$ ;  $r^2 = 0.9957$ ). As shown in Fig. 2E, the decay time constant was not different between SP ( $378.60 \pm 0.04$  ms) and HP cells ( $373.30 \pm 0.05$ ). In addition, no differences were observed in the decay times at 50, 75, and 90%  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient relaxation (data not shown).

The next step was to establish the relationship between the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients peaks and the TTF attained during the progressive test. To this end, we plotted the peak of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient for each rat against the treadmill speed at the individual point of fatigue (Fig. 3). Open and filled triangles represent the means  $\pm$  SE of SP and HP groups, respectively. As shown in Fig. 3, the TTF was positively correlated with the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients ( $r = 0.81$ ).

**Cell contractility.** The amplitude of contraction was greater in cells of the HP group ( $n = 4$  rats and 108 cells) compared with cells of the SP group ( $n = 4$  rats and 96 cells) (Fig. 4). Differences between groups were also observed in the maximal velocities of contraction and relaxation. The contractility results are summarized in Table 2.

**Protein expression.** No differences between groups were observed in PLB and NCX expression levels. However, SERCA2a and RyR2 expression levels were higher in the HP group (Fig. 5).

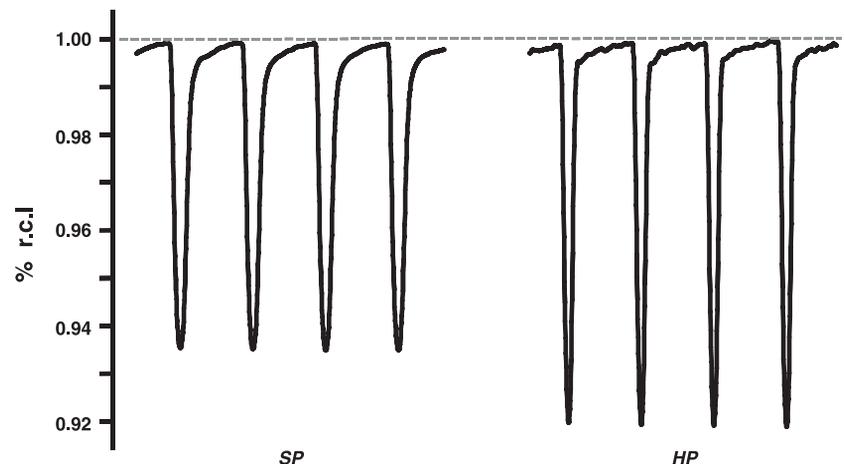
## DISCUSSION

The main goal of the present study was to examine intrinsic properties in ventricular cardiomyocytes of HP rats. Confirming our hypothesis, these rats exhibit intrinsic differences in  $\text{Ca}^{2+}$  handling (e.g., higher  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients) and in contractility (e.g., higher amplitude of contraction). These differences were strongly reinforced by the positive relationship between  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients and exercise capacity and by the increases observed in the expression levels of SERCA2a and RyR2. Together, these results explain some of the divergences observed in aerobic exercise capacity in HP vs. SP rats.

The first series of experiments in the present study showed that the frequency of HP animals corresponds to  $\sim 20\%$  of the studied rat population. These rats were selected according to the TTF and compared with those that had standard performance. In the eleventh generation of the LCR/HCR lines, the two phenotypes diverged from up to 347% in distance running to fatigue, which corresponds to exercise times of 14.3 and 41.6 min for LCRs and HCRs, respectively (15, 26). The criterion adopted in the present study of one standard deviation, which corresponds to a TTF average of 46.57 min ( $>31.6 + 14.97$  min), is in good agreement with those used by Koch and Britton's group. However, it is important to emphasize that we only studied the SP and HP groups, not animals with low performance in the progressive test as described by Koch and Britton (15, 26).

Our results showed that cardiomyocytes isolated from the ventricles of HP rats present higher  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients compared with those measured in SP rats. Moreover, we found a direct and positive relationship between exercise capacity and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients (13). Such intrinsic differences were accompanied by improvements in contractility, mainly in systolic cell

Fig. 4. Representative records of cardiac cellular contractility profiles in SP and HP rats. Dashed line shows the peak amplitude for each record series. Values are percentages of resting cell length (%r.c.l.).



function. Complementary to this framework, we have shown that SERCA2a and RyR2 expression levels were greater in the HP group. These results provide strong evidence that within the biological spectrum of aerobic exercise capacity, cardiomyocyte function is relevant (13).

Release from the sarcoplasmic reticulum through RyR2 is the major source of  $\text{Ca}^{2+}$  responsible for the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient in cardiomyocytes (7, 20). The present results agree with previous data showing that HCR rats had greater ventricular myocyte  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients than those from LCR (10). The increase in RyR2 expression demonstrated in the present study likely explains the greater amplitude of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients in HP rats. Our data also show that the amplitude and maximal velocity of contraction associated with high  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients were greater in myocytes from HP rats. Whether the rate of RyR2 phosphorylation is increased remains to be answered.

In rat ventricular cells,  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake is mediated mainly by SERCA2a (92%) (2). Although previous reports have shown that SERCA2a-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  reuptake was not different between LCR and HCR rats (10), the present study demonstrates that myocytes from HP rats exhibit higher levels of SERCA2a expression. This agrees with previous studies showing that SERCA2a is a target of adaptations when gains in aerobic exercise capacity are provoked by means of exercise training (25). In addition to SERCA2a, NCX and  $\text{pPLB}^{\text{Thr17}}$  also have been shown to be affected by exercise training (12). In the present study, we did not find intrinsic differences in PLB and NCX expression levels between SP and HP rats. The major regulator of SERCA2a activity is PLB, which either inhibits it at the unphosphorylated state or increases it by removing such inhibition when phosphorylation occurs (2). The increased SERCA2a expression without changes in PLB observed in the present study, thereby reducing the PLB/SERCA2a ratio, has been shown elsewhere (12). Despite the absence of differences in the time constants of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient relaxation between

Table 2. Morphological and contractile profiles measured in cardiomyocytes from SP and HP rats

Variable	SP	HP
<i>Cell variables</i>		
Cell length, $\mu\text{m}$	157.9 $\pm$ 2.0	160.4 $\pm$ 1.9
Cell width, $\mu\text{m}$	21.6 $\pm$ 0.4	21.1 $\pm$ 0.4
Cell volume, pl	25.9 $\pm$ 0.6	25.5 $\pm$ 0.5
<i>Systolic cell function</i>		
Shortening, % r.c.l.	6.0 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.2*
T peak contraction, ms	155 $\pm$ 4	149 $\pm$ 2
$V_{\text{max}}$ contraction, $\mu\text{m/s}$	87.0 $\pm$ 4.5	111.8 $\pm$ 5.3*
<i>Diastolic cell function</i>		
T relaxation, ms	259 $\pm$ 10	236 $\pm$ 7
$T_{50}$ relaxation, ms	90 $\pm$ 4	78 $\pm$ 2
$V_{\text{max}}$ relaxation, $\mu\text{m/s}$	69.8 $\pm$ 4.7	92.6 $\pm$ 5.8*

Values are means  $\pm$  SE of SP ( $n = 96$  cells from 4 rats) and HP groups ( $n = 108$  cells from 4 rats). Cell length, cell length at rest; cell width, cell width at rest; cell volume, cell volume at rest; shortening (% r.c.l.), amplitude of shortening expressed as a percentage of resting cell length; T peak contraction, time from stimulation to peak shortening; T relaxation, time from peak shortening to relaxation;  $T_{50}$  relaxation, time from peak shortening to half relaxation;  $V_{\text{max}}$  contraction, maximal velocity of contraction;  $V_{\text{max}}$  relaxation, maximal velocity of relaxation. \* $P \leq 0.05$  vs. SP.

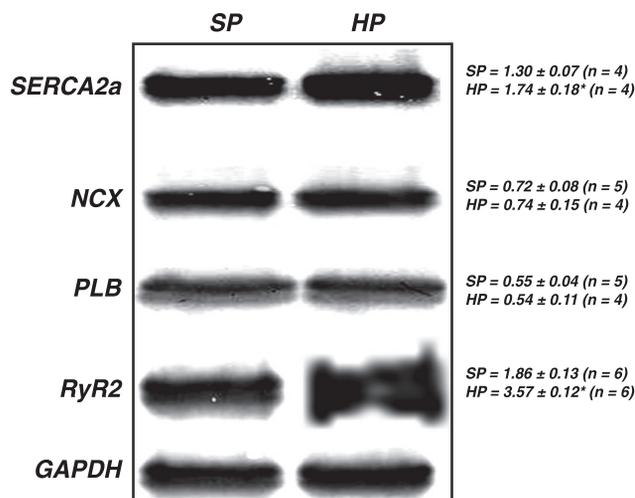


Fig. 5. Representative Western blot images of selected proteins under investigation. SERCA2a, sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; RyR2, ryanodine receptor type 2; NCX, sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange; PLB, phospholamban. Values are means  $\pm$  SE;  $n$  indicates the number of animals used. \* $P \leq 0.05$  vs. SP.

the HP and SP groups, the maximal velocities of relaxation were higher in myocytes from HP rats.

At the whole heart level, the major mechanistic adaptation of the myocardium that contributes to higher cardiac output in exercise-trained rats (3) and in rats that intrinsically develop high levels of aerobic exercise capacity (11) is increased stroke volume (8). It is likely that the increased cardiomyocyte  $\text{Ca}^{2+}$  handling and contractility in HP rats observed in the present study and elsewhere (16) contribute to this. However, because we did not properly calibrate the fluorescence measurements and performed the experiments at room temperature and 1-Hz frequency (a possible limitation of our study), caution should be exercised when transposing the results to real physiological conditions. Finally, it is important to note that cardiomyocyte function is more highly correlated with aerobic capacity than size itself (13). This explains the similarities in cell morphology found in SP and HP rats.

In conclusion, we have shown that the superior performance in healthy rats is related to an intrinsic component of aerobic exercise capacity. Also, our selection strategy was able to detect differences in cardiomyocyte function between SP and HP rats. We also found important intrinsic differences in  $\text{Ca}^{2+}$  handling and contractility in cardiomyocytes from HP rats. These findings are potentially important in the study of the biological determinants of aerobic capacity, which is an important trait for health and in disease conditions (24, 25).

#### ACKNOWLEDGMENTS

T. N. Prímola-Gomes thanks Dr. Nilo R. V. Lima for initial advice. We also thank Dr. Yeshwant S. Bakhle for reviewing this manuscript and Danilo Roman-Campos for making the cell contractility analysis available. The confocal experiments were done at the Centro de Microscopia Eletrônica-Instituto de Ciências Biológicas facility. The contractility experiments were done at the Biotério Experimental-Departamento de Educação Física facility.

#### GRANTS

This study was funded by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). T. N. Prímola-Gomes was a fellow of CNPq.

## REFERENCES

1. Baldwin KM, Cooke DA, Cheadle WG. Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs. *J Appl Physiol* 42: 267–272, 1977.
2. Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2002.
3. Blomqvist CG, Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol* 45: 169–189, 1983.
4. Britton SL, Koch LG. Animal genetic models for complex traits of physical capacity. *Exerc Sport Sci Rev* 29: 7–14, 2001.
5. Capellini LS, Cortes SF, Gomes MA, Silva GA, Pesquero JL, Lopes MJ, Teixeira MM, Lemos VS. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2503–H2511, 2008.
6. Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension* 52: 542–548, 2008.
7. Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85: 247–289, 1985.
8. Gledhill N, Cox D, Jamnik R. Endurance athletes' stroke volume does not plateau: major advantage is diastolic function. *Med Sci Sports Exerc* 26: 1116–1121, 1994.
9. Henderson KK, Wagner H, Favret F, Britton SL, Koch LG, Wagner PD, Gonzalez NC. Determinants of maximal O<sub>2</sub> uptake in rats selectively bred for endurance running capacity. *J Appl Physiol* 93: 1265–1274, 2002.
10. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Britton SL, Koch LG, Smith GL, Ellingsen O. Nitric oxide synthase type-1 modulates cardiomyocyte contractility and calcium handling: association with low intrinsic aerobic capacity. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14: 319–325, 2007.
11. Hussain SO, Barbato JC, Koch LG, Metting PJ, Britton SL. Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1787–R1791, 2001.
12. Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, Wisloff U. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 43: 354–361, 2007.
13. Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U, Ellingsen O. Moderate vs high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res* 67: 161–172, 2005.
14. Klissouras V. Heritability of adaptive variation. *J Appl Physiol* 31: 338–344, 1971.
15. Koch LG, Britton SL. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics* 5: 45–52, 2001.
16. Konhilas JP, Irving TC, de Tombe PP. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. *Pflügers Arch* 445: 305–310, 2002.
17. Lacerda AC, Marubayashi U, Balthazar CH, Leite LH, Coimbra CC. Central nitric oxide inhibition modifies metabolic adjustments induced by exercise in rats. *Neurosci Lett* 410: 152–156, 2006.
18. Lauton-Santos S, Guatimosim S, Castro CH, Oliveira FA, Almeida AP, Dias-Peixoto MF, Gomes MA, Pessoa P, Pesquero JL, Pesquero JB, Bader M, Cruz JS. Kinin B1 receptor participates in the control of cardiac function in mice. *Life Sci* 81: 814–822, 2007.
19. Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol* 204: 1191–1199, 2001.
20. Nayler WG, Daile P, Chipperfield D, Gan K. Effect of ryanodine on calcium in cardiac muscle. *Am J Physiol* 219: 1620–1626, 1970.
21. Oliveira FA, Guatimosim S, Castro CH, Galan DT, Lauton-Santos S, Ribeiro AM, Almeida AP, Cruz JS. Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H394–H401, 2007.
22. Rodrigues AG, Lima NR, Coimbra CC, Marubayashi U. Intracerebroventricular physostigmine facilitates heat loss mechanisms in running rats. *J Appl Physiol* 97: 333–338, 2004.
23. Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA Jr, Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, Cruz JS. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Res Cardiol* 104: 238–246, 2009.
24. Willenheimer R, Erhardt L, Cline C, Rydberg E, Israelsson B. Exercise training in heart failure improves quality of life and exercise capacity. *Eur Heart J* 19: 774–781, 1998.
25. Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, Ellingsen O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res* 50: 495–508, 2001.
26. Wisloff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, Fernstrom M, Rezaei K, Lee SJ, Koch LG, Britton SL. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science* 307: 418–420, 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)