

ÓXIDO NÍTRICO E DINÂMICA DE Ca^{2+} EM CARDIOMIÓCITOS: INFLUÊNCIA DA CAPACIDADE DE EXERCÍCIO



ARTIGO ORIGINAL
ORIGINAL ARTICLE
ARTÍCULO ORIGINAL

NITRIC OXIDE AND Ca^{2+} DYNAMICS IN CARDIOMYOCYTES: INFLUENCE OF EXERCISE CAPACITY

ÓXIDO NÍTRICO Y DINAMICA DE Ca^{2+} EN CARDIOMIÓCITOS: INFLUENCIA DE LA CAPACIDAD DE EJERCICIO

Lucas Rios Drummond¹
(Educador Físico)

Miguel Araujo Carneiro-Júnior¹
(Educador Físico)

Sandra Lauton-Santos² (Bióloga)

Luciano dos Santos Aggum
Capettini³ (Odontólogo)

Thássio Ricardo Ribeiro Mesquita²
(Educador Físico)

Jader dos Santos Cruz⁴ (Biólogo)

Cândido Celso Coimbra⁵
(Biomédico)

Virgínia Soares Lemos⁵
(Farmacêutica)

Antônio José Natali¹
(Educador Físico)

Thales Nicolau Prímola-Gomes¹
(Educador Físico)

1. Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Educação Física,
Viçosa, MG, Brasil.

2. Universidade Federal de Sergipe,
Departamento de Fisiologia, São
Cristóvão, SE, Brasil.

3. Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Farmacologia,
Belo Horizonte, MG, Brasil.

4. Universidade Federal de Minas
Gerais, Departamento de Bioquímica
e Imunologia, Belo Horizonte,
MG, Brasil.

5. Universidade Federal de Minas
Gerais, Departamento de Fisiologia
e Biofísica, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Correspondência:

Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Educação Física.
Av. Ph. Rolfs, s/n, Viçosa, MG, Brasil.
36570000. thales.gomes@ufv.br

RESUMO

Introdução: A capacidade intrínseca para o exercício aeróbico está relacionada com o inotropismo cardíaco. Por outro lado, a participação do óxido nítrico (NO) como mensageiro intracelular sobre a dinâmica do Ca^{2+} ainda permanece desconhecida em ratos com diferentes capacidades intrínsecas para o exercício. **Objetivo:** Avaliar se o NO modula diferentemente o transiente intracelular de Ca^{2+} e liberações espontâneas de Ca^{2+} (*sparks*) em cardiomiócitos de ratos com diferentes capacidades intrínsecas para o exercício. **Métodos:** Ratos machos Wistar foram selecionados como desempenho padrão (DP) e alto desempenho (AD), de acordo com a capacidade de exercício até a fadiga, mensurada através de teste de esforço progressivo em esteira. Os cardiomiócitos dos ratos foram utilizados para determinar o transiente intracelular de Ca^{2+} e Ca^{2+} *sparks* em microscópio confocal. Para estimar a contribuição do NO foi utilizado o inibidor das sínteses do NO (L-NAME, 100 μ M). Os dados foram analisados através de ANOVA *two-way* seguido do pós-teste de *Tukey* e apresentados como médias \pm EPM. **Resultados:** Os cardiomiócitos de ratos AD exibiram aumentos na amplitude do transiente de Ca^{2+} em comparação aos DP. Entretanto, o L-NAME aumentou a amplitude do transiente de Ca^{2+} somente em ratos DP. Não foram encontradas diferenças na constante de tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+} (τ) em cardiomiócitos de ratos com DP e AP, contudo, a administração do L-NAME diminuiu o τ em cardiomiócitos em ambos os grupos. cardiomiócitos de ratos AD apresentaram menor amplitude e frequência de Ca^{2+} *sparks* em comparação ao grupo DP. A administração de L-NAME aumentou a amplitude de Ca^{2+} *sparks* em cardiomiócitos do grupo AD. **Conclusão:** O NO modula o transiente de Ca^{2+} e as *sparks* de Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos com diferentes capacidades intrínsecas para o exercício.

Descritores: NG-Nitroarginina metil éster; aptidão física; miócitos cardíacos; cálcio.

ABSTRACT

Introduction: The intrinsic capacity to aerobic exercise is associated with cardiac inotropism. On the other hand, the contribution of nitric oxide (NO) as an intracellular messenger on Ca^{2+} dynamics remains unknown in rats with different intrinsic capacities to exercise. **Objective:** To evaluate whether NO modulates differently Ca^{2+} intracellular transient and spontaneous Ca^{2+} releases (*sparks*) in cardiomyocytes of rats with different intrinsic capacities to exercise. **Methods:** Male Wistar rats were selected as standard-performance (SP) and high-performance (HP), according to the exercise capacity until fatigue, assessed through a treadmill progressive stress test. Cardiomyocytes of rats were used to determine Ca^{2+} intracellular transient and Ca^{2+} *sparks* evaluated using confocal microscope. To estimate NO contribution, a NO synthase inhibitor (L-NAME, 100 μ M) was used. Data were analyzed through two-way ANOVA followed by *Tukey's* post hoc test and expressed as means \pm SEM. **Results:** Cardiomyocytes of HP rats exhibited higher Ca^{2+} transient amplitude compared to SP. However, L-NAME increased Ca^{2+} transient amplitude only in SP rats. No differences were found in Ca^{2+} transient decay time constant (τ) in cardiomyocytes of SP and HP rats. However, administration of L-NAME caused reduction of τ in cardiomyocytes of both groups. Lower amplitude and frequency of Ca^{2+} *sparks* were found in cardiomyocytes of HS rats compared to SP group. Administration of L-NAME increased the amplitude of Ca^{2+} *sparks* in cardiomyocytes of the HP group. **Conclusion:** NO modulates Ca^{2+} transient and Ca^{2+} *sparks* in cardiomyocytes of rats with different intrinsic exercise capacities.

Keywords: NG-Nitroarginine methyl ester; physical fitness; myocytes, cardiac; calcium.

RESUMEN

Introducción: La capacidad intrínseca para el ejercicio aeróbico está relacionada con el inotropismo cardíaco. Por otro lado, todavía se desconoce la contribución del óxido nítrico (ON) como mensajero intracelular sobre la dinámica del Ca^{2+} en ratones con diferentes capacidades intrínsecas para el ejercicio. **Objetivo:** Evaluar si el ON modula diferencialmente la variación transitoria intracelular de Ca^{2+} y las liberaciones espontáneas de Ca^{2+} (*sparks*) en cardiomiocitos de ratones con diferentes capacidades intrínsecas para el ejercicio. **Métodos:** Ratones machos Wistar fueron seleccionados como desempeño estándar (DE) y alto desempeño (AD), de acuerdo con la capacidad de ejercicio hasta la fatiga, medida a través del test de fuerza progresiva en la caminadora o cinta eléctrica. Los cardiomiocitos de los ratones fueron utilizados para determinar el tránsito intracelular y *sparks* de Ca^{2+} evaluados en microscopio confocal. Para estimar la contribución del ON fue utilizado un inhibidor de síntesis del ON (L-NAME, 100 μ M). Los datos fueron analizados a través de un

ANOVA two-way seguido de un post-test Tukey y presentados como promedios \pm EPM. Resultados: Los cardiomiocitos de ratones AD mostraron aumento en la amplitud de la variación transitoria de Ca^{2+} en comparación con los DE. Así mismo, el L-NAME incremento la amplitud transitoria de Ca^{2+} solamente en ratones DE. No se encontraron diferencias en la constante del tiempo de decaimiento de la variación transitoria (τ) de Ca^{2+} en cardiomiocitos de ratones DE e AD. Todavía, la administración de L-NAME mostro una reducción en el τ en cardiomiocitos de ambos los grupos. Cardiomiocitos de ratones AD presentaron menor amplitud y frecuencia de sparks de Ca^{2+} en comparación al grupo DE. La administración de L-NAME incrementó la amplitud de sparks de Ca^{2+} en cardiomiocitos del grupo AD. Conclusión: El ON modula la variación de Ca^{2+} y sparks de Ca^{2+} en cardiomiocitos de ratones con diferentes capacidades intrínsecas para el ejercicio.

Descriptor: NG-Nitroarginina metil éster; aptitud física; miocitos cardíacos; calcio.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1517-869220162201143904>

Artigo recebido em 12/12/2014 aprovado em 21/10/2015.

INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) modula a função cardíaca, em grande parte, influenciando canais para Ca^{2+} envolvidos no acoplamento excitação-contracção¹. Os mecanismos propostos pelos quais o NO modula negativamente o acoplamento excitação-contracção-relaxamento envolvem a redução do influxo de Ca^{2+} através de canais do tipo L e inibição da cAMP-PKA^{2,3}. Entretanto, a literatura aponta resultados conflitantes, e ainda não é possível determinar se os efeitos do NO sobre essas vias ocorrem por mecanismos diretos ou indiretos.

As ações do NO sobre a contratilidade de cardiomiócitos isolados já foram demonstradas⁴⁻⁶. A inibição, *in vitro*, das sínteses do NO em cardiomiócitos ventriculares através do L-NAME aumenta a taxa de encurtamento e relaxamento celular, aprimorando a função sistólica e diastólica da célula⁵. Por outro lado, Hoydal et al.⁶ demonstraram que o NO produzido pela NOS-1 (isoforma neuronal) alterou o desempenho contrátil de cardiomiócitos, aumentando o Ca^{2+} sistólico.

As sparks de Ca^{2+} foram primeiramente descritas por Cheng et al.⁷ As sparks são liberações espontâneas de Ca^{2+} através da abertura dos receptores de rianodina (RyR2) em células não estimuladas⁸. O aumento na frequência das sparks de Ca^{2+} , gerado pelo aumento do $[Ca^{2+}]_i$ no retículo sarcoplasmático (RS), está associado ao surgimento de ondas de Ca^{2+} . Desta forma, a sobrecarga de Ca^{2+} no RS e as sparks de Ca^{2+} estão associadas com doenças cardíacas, como as arritmias^{7,9}. Petroff et al.⁴ demonstraram que em cardiomiócitos isolados, o aumento da liberação de NO em reposta ao estiramento mecânico contribui para o aumento na frequência das sparks de Ca^{2+} .

A contratilidade de miócitos ventriculares e a dinâmica de Ca^{2+} intracelular estão correlacionadas à capacidade intrínseca para o exercício¹⁰. Foi demonstrado que a inibição específica da NOS-1, e, conseqüentemente, a redução da biodisponibilidade do NO, modularia a dinâmica de Ca^{2+} em ratos com baixa e alta capacidades aeróbicas⁶. Contudo, ainda são desconhecidos os efeitos da inibição simultânea das NOS constitutivas (NOS-1 e NOS-3) sobre a dinâmica do Ca^{2+} .

Assim, o presente estudo objetivou avaliar se o NO modula a dinâmica do Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares de ratos com diferentes capacidades intrínsecas para o exercício aeróbico. No presente estudo, a inibição das sintases do NO pelo L-NAME foi usada para estimar a sua contribuição na dinâmica do Ca^{2+} em cardiomiócitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos Wistar machos, pesando 250 ± 3 g no início do período experimental, foram mantidos em gaiolas coletivas sob um ciclo claro-escuro (14:10-h) e tiveram livre acesso a água e ração. Todos os experimentos foram executados de acordo com o Comitê de Ética para utilização e cuidados de animais de laboratório da Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte, MG, Brasil (protocolo nº. 015/08).

Para determinar o desempenho físico dos animais foi utilizado um

protocolo de exercício em esteira. O protocolo foi originalmente proposto por Koch e Britton¹¹ e adaptado para medir o tempo total de exercício até a fadiga (TTF)¹². Resumidamente, uma semana antes dos testes de exercício até a fadiga, os ratos foram familiarizados em esteira motorizada (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha), durante cinco dias consecutivos (5 min/dia; 5% de inclinação) e com aumentos diários da velocidade da esteira (10, 10, 11, 13, 15 m/min). O estímulo elétrico da esteira foi ajustado para 0,28 mA. A intensidade e duração do exercício estavam abaixo dos níveis necessários para produzir adaptações ao treinamento¹³. Animais que não foram capazes de se adaptar à esteira rolante foram excluídos do estudo (menos de 10%). Após a semana de adaptação, cada animal realizou, em três dias alternados, três testes de exercício progressivo até a fadiga (velocidade inicial de 10 m/min; 5% de inclinação). Durante os testes, a velocidade da esteira foi aumentada em 1 m/min a cada 3 min. A fadiga foi definida e o teste foi interrompido, quando o rato não era capaz de manter o ritmo de velocidade da esteira¹⁴.

A estratégia de seleção dos animais usada no presente estudo foi baseada no tempo de exercício até a fadiga de cada animal, de acordo com o dia de melhor desempenho físico¹⁵. Foram formados dois grupos experimentais: desempenho padrão (DP) e alto desempenho (AD). De acordo com o critério metodológico adotado, animais com TTF entre 16,33 e 46,57 min foram incluídos no grupo DP, ou seja, que tivesse um TTF que não fosse maior e nem menor que um desvio padrão da média da população. Os animais que obtiveram um TTF > 46,57 foram incluídos no grupo AD^{11,16}.

Dois dias após o teste de fadiga, os ratos foram pesados, em seguida foi realizada a eutanásia e os corações rapidamente removidos. Cardiomiócitos ventriculares dos grupos DP e AD foram enzimaticamente isolados como previamente descrito¹⁷. Resumidamente, os corações foram montados em sistema de Langendorff e perfundidos durante ~5 min com solução livre de Ca^{2+} contendo (em mM): 130 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 $MgCl_2$, 0,33 NaH_2PO_4 , 1 lactato, 3 piruvato, 22 glicose, and 25 HEPES (pH 7,4). Após esta etapa, os corações foram perfundidos durante 10-15 min com solução contendo 1 mg/mL de colagenase tipo II (Worthington) e 0,17 mg/mL de protease tipo IX (Sigma, St. Louis, MO). Em seguida, os corações foram cortados em pequenos fragmentos e as células isoladas por agitação mecânica e então estocadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). Somente miócitos tolerantes ao Ca^{2+} , em repouso e com morfologia típica foram estudados. Os miócitos cardíacos isolados foram utilizados até 2-3 h após isolamento.

Medida para liberação de Ca^{2+} (transiente intracelular de Ca^{2+}) e liberação espontânea de Ca^{2+} (sparks de Ca^{2+})

Cardiomiócitos isolados dos grupos DP e AD obtidos na condição de repouso foram carregados com 5 μ M fluo-4 AM (Molecular Probes, Eugene, OR), durante 20 min em temperatura ambiente e então, lavadas

com solução extracelular contendo 1,8 mM Ca^{2+} para remover o excesso da sonda¹⁸. A reação da sonda ao Ca^{2+} quando excitada em comprimento de onda de 488 nm, emite um sinal fluorescente que é capturado em 510 nm. Alterações na intensidade de fluorescência foram expressas como a razão F/F_0 . Na medida de transiente de Ca^{2+} , F_0 representa a média de fluorescência mínima medida na fase diastólica cardíaca. Transientes de Ca^{2+} foram evocados com estimulação elétrica de campo através de um par de eletrodos de platina com pulsos retangulares. As células foram estimuladas à 1 Hz para produzir a condição de *steady-state*. As imagens fluorescentes (transiente e *sparks* de Ca^{2+}) foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) utilizando sistema Meta LSM 510 com objetiva de imersão à óleo x63 (Zeiss, Jena, Germany). Para armazenamento das imagens, os miócitos foram escaneados com feixe posicionado randomicamente ao longo da célula, evitando cruzar o núcleo. Transientes foram registrados a cada 1,54 ms e, sequencialmente armazenados para criação de imagens com duas dimensões contendo o tempo no eixo x. As *sparks* de Ca^{2+} foram mensuradas nas células em condições de repouso e as imagens foram analisadas por meio da interface SparkMaster, no software ImageJ¹⁹. O processamento das imagens dos transientes foi realizado em uma plataforma caseira desenvolvida no programa MatLab[®].

Para avaliar o envolvimento do NO sobre o transiente de Ca^{2+} e as *sparks* de Ca^{2+} , os experimentos foram executados em miócitos ventriculares pré-incubados durante 20 min com 100 μM do inibidor não seletivo das enzimas sintetizadoras do NO, N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma, St. Louis, MO).

Análise Estatística

Os dados estão apresentados com média \pm EPM. Diferenças entre os grupos nas medidas de peso corporal, peso do coração, relação peso coração/peso corporal e TTF foram calculadas utilizando teste *t* de Student não pareado. ANOVA *Two-way* seguido do *post hoc* de Tukey foi utilizada para calcular diferenças na amplitude do transiente de Ca^{2+} , constante de tempo para o decaimento do transiente de Ca^{2+} , frequência e amplitude das *sparks* de Ca^{2+} . O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

A tabela 1 resume as características desempenho físico e as características morfométricas dos grupos DP e AD. O TTF foi significativamente maior no grupo AD quando comparado ao DP. Não foram observadas diferenças na massa corporal, massa do coração ou razão massa do coração/massa corporal.

Na Figura 1A estão apresentadas imagens representativas do transiente intracelular de Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos DP e AD carregados com o indicador fluorescente fluo-4 AM. Como demonstrado na Figura 1B, cardiomiócitos de ratos AD exibiram maior amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ comparado ao grupo DP ($7,43 \pm 0,97$ vs. $5,03 \pm 0,71$ F/F_0 ; $P < 0,05$). De forma interessante, a inibição das sintases de NO com L-NAME em cardiomiócitos de ratos DP aumentou amplitude do transiente de Ca^{2+} ($8,68 \pm 0,64$ F/F_0 ; $P < 0,05$), mas não alterou este parâmetro no grupo AD ($8,80 \pm 0,75$ F/F_0 ; $P > 0,05$). Não foram encontradas diferenças no tempo da recaptação do Ca^{2+} citosólico

Tabela 1. TTF, peso corporal, peso do coração ou razão peso coração/peso corporal em ratos DP e AD.

Medida	DP (n=10)	AD (n=5)
TTF (min)	31,7 \pm 3,8	46,1 \pm 2,8*
Peso corporal (g)	314,6 \pm 15,6	327,0 \pm 15,9
Peso do coração (mg)	2045,4 \pm 84,4	2170,5 \pm 126,7
PC/PC (mg/g)	6,5 \pm 0,2	6,6 \pm 0,3

DP= desempenho padrão. AD= alto desempenho. TTF= tempo total de exercício até a fadiga. PC/PC: razão peso coração/peso corporal. * $P < 0,05$ vs. DP.

(figura 1C) entre os grupos DP e AD, mas a administração do L-NAME diminuiu o tempo para recaptação do Ca^{2+} em ambos os grupos DP ($312,93 \pm 33,09$ para $177,20 \pm 31,35$ ms; $P < 0,05$) e AD ($352,88 \pm 41,74$ para $215,48 \pm 35,16$ ms; $P < 0,05$).

Imagens representativas das *sparks* de Ca^{2+} estão ilustradas na Figura 2A. Como demonstrado na Figura 2B, cardiomiócitos do grupo AD exibiram menor frequência das *sparks* de Ca^{2+} em comparação ao grupo DP ($6,07 \pm 0,77$ vs. $9,49 \pm 0,71$ em 100 μm^2 ; $P < 0,05$), entretanto, o tratamento com L-NAME não alterou a frequência das *sparks* de Ca^{2+} em ambos os grupos ($P > 0,05$). Como apresentados na Figura 2C, cardiomiócitos de ratos AD apresentaram menor amplitude das *sparks* de Ca^{2+} quando comparado ao grupo DP ($0,60 \pm 0,03$ vs. $0,81 \pm 0,02$ $\Delta F/F_0$; $P < 0,05$), mas, o tratamento com L-NAME aumentou a amplitude das *sparks* de Ca^{2+} somente no grupo AD ($0,90 \pm 0,03$ $\Delta F/F_0$; $P < 0,05$).

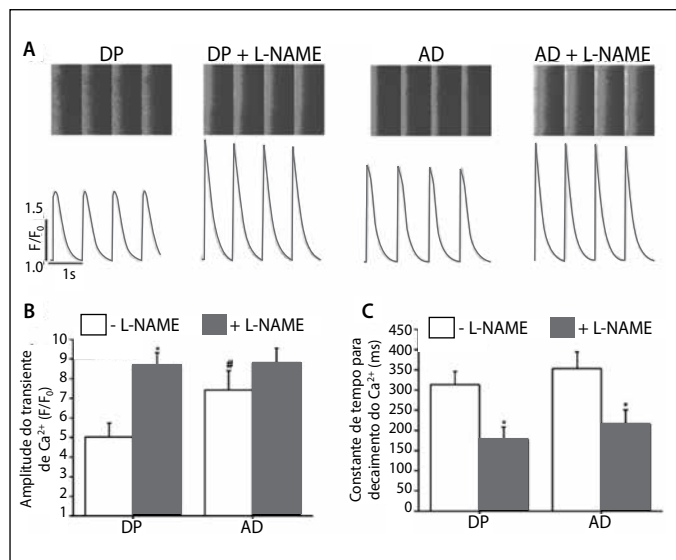


Figura 1. Transientes de Ca^{2+} em Cardiomiócitos. (A) Imagens representativas de cardiomiócitos carregados com o marcador para Ca^{2+} fluo 4-AM. (B) Amplitude do transiente (F/F_0) de Ca^{2+} . (C) constante de tempo do decaimento do transiente. DP= desempenho padrão (n= 79 células de 10 ratos). AD= alto desempenho (n= 53 células de cinco ratos). L-NAME= células incubadas com L-NAME (20 min, 100 μM). *, diferente do grupo sem L-NAME ($P < 0,05$). #, diferente do grupo DP sem L-NAME ($P < 0,05$).

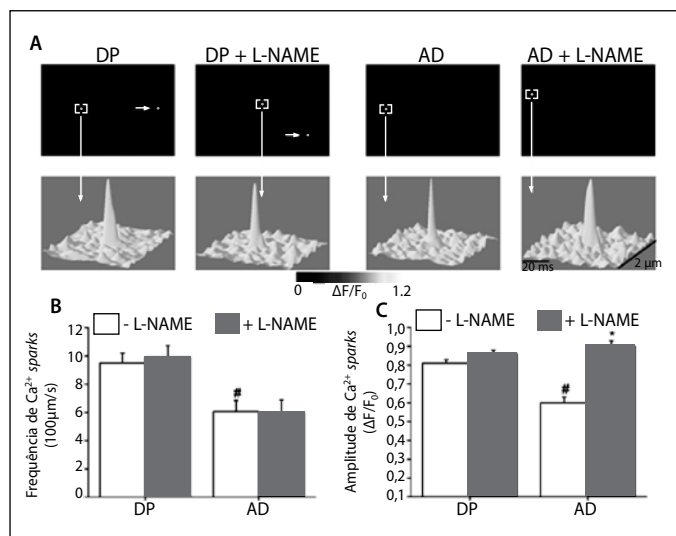


Figura 2. Sparks de Ca^{2+} . (A) Imagens representativas das *sparks* espontâneas de Ca^{2+} . (B) Frequência das *sparks* de Ca^{2+} . (C) Amplitude das *sparks* de Ca^{2+} . DP= desempenho padrão (n= 79 células de 10 ratos). AD= alto desempenho (n= 53 células de cinco ratos). L-NAME= células incubadas com L-NAME (20 min, 100 μM). *, diferente do grupo sem L-NAME ($P < 0,05$). #, diferente do grupo DP sem L-NAME ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Avaliamos no presente estudo os efeitos do NO sobre o transiente intracelular de Ca^{2+} e as *sparks* de Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos com desempenho padrão e alto desempenho para o exercício. Confirmando nossa hipótese, ratos dos grupos DP e AD apresentaram diferenças intrínsecas no transiente de Ca^{2+} intracelular e nas *sparks* de Ca^{2+} . Foi observado que a capacidade intrínseca para desempenho físico modulou a dinâmica de Ca^{2+} por mecanismos que envolvem a síntese do NO. Juntos, esses resultados ajudam a explicar algumas diferenças intrínsecas observadas na capacidade para exercício aeróbico entre ratos DP e AD.

Os resultados do presente trabalho mostraram que cardiomiócitos ventriculares de ratos AD apresentaram maior amplitude do transiente intracelular de Ca^{2+} em comparação aos ratos DP. Esta reposta pode estar diretamente relacionada à maior liberação do conteúdo de Ca^{2+} pelo RS através dos Ryr2, sendo esta estrutura a responsável pelo controle da liberação deste íon nos cardiomiócitos^{20,21}. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram níveis aumentados de expressão da Ryr2 em corações de ratos AD¹⁰.

Além disso, cardiomiócitos de ratos AD apresentaram menor amplitude e frequência das *sparks* de Ca^{2+} . Já foi demonstrado que animais AD exibem expressão aumentada da bomba de Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA2a)¹⁰, assim, estes cardiomiócitos podem apresentar maior capacidade para a recaptção de Ca^{2+} para o RS e, conseqüentemente, uma sobrecarga de Ca^{2+} no RS. Essa situação poderia explicar aumentos na frequência e na amplitude das *sparks* de Ca^{2+} . Entretanto, os dados deste trabalho não apoiam esta hipótese e para tentar explicar o fato, sugerimos então que ratos AD possuem funcionamento aprimorado do complexo Ryr2/FKBP12.6. A proteína FKBP12.6 está ancorada à quatro monômeros de Ryr2, estabilizando o canal. A deficiência nesta proteína está relacionada ao vazamento de Ca^{2+} a partir da Ryr2, sendo este, um mecanismo fundamental para o surgimento das arritmias cardíacas^{7,9,22}. Deste modo, é sugestivo propor que animais com alta capacidade intrínseca para o exercício poderiam apresentar maior proteção miocárdica contra eventos arritmicos.

Tem sido demonstrado que o NO inibe o influxo de Ca^{2+} através dos canais do tipo $L^{3,23}$, deste modo, a inibição da síntese do NO causaria aumento do influxo de Ca^{2+} para o sarcoplasma. Os resultados mostraram aumento na amplitude do transiente de Ca^{2+} no grupo DP com a inibição das sínteses de NO o que poderia causar um efeito inotrópico positivo em cardiomiócitos, como já demonstrado pelo nosso grupo⁵. Neste estudo prévio, a inibição da síntese do NO com L-NAME aumentou a taxa de encurtamento máximo dos cardiomiócitos⁵. Lunz et al.⁵ também demonstraram que a redução da biodisponibilidade do NO aumentou a taxa máxima para o relaxamento. No presente trabalho, a administração de L-NAME aumentou a Tau, o que pode ser atribuído à um aumento da expressão e/ou função da SERCA2. Isso sugere que o aumento na velocidade de recaptção de Ca^{2+} para o RS foi o responsável pelo aumento na taxa máxima de relaxamento encontrado por Lunz et al.⁵. Em nossos resultados, a inibição das sínteses de NO provocou mudanças na amplitude das *sparks* de Ca^{2+} apenas no grupo AD. Animais transgênicos com ausência das NOS-1 e NOS-3 apresentam comportamento alterado da Ryr2, com redução de S-nitrosilação e aumento da oxidação desse canal, com conseqüentemente vazamento de Ca^{2+} diastólico, causando um impacto negativo na estabilidade elétrica e contrátil cardíaca²⁴.

CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o NO modula o transiente de Ca^{2+} e as *sparks* de Ca^{2+} em cardiomiócitos de ratos com diferentes capacidades intrínsecas para o exercício.

AGRADECIMENTOS

Este estudo recebeu suporte financeiro do Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES: Cada autor contribuiu individual e significativamente para o desenvolvimento deste artigo. LRD (0000-0002-6042-7757)*, MACJ(0000-0001-5354-7913)*, e TNPG (0000-0002-4001-4429)* foram os principais contribuintes na redação do manuscrito. LRD, MACJ, SLS (0000-0003-3373-3254)*, LSAC(0000-0002-6487-9558)*, TRRM(0000-0002-6927-5745)* e TNPG realizaram a coleta de dados LRD, MACJ, SLS, LSAC, JSC(0000-0003-1365-2318)*, AJN e TNPG participaram da análise dos dados. LRD, MACJ, SLS, LSAC, TRRM, JSC, CCC (0000-0001-8981-6724)*, VSL(0000-0003-1234-9325)*, AJN(0000-0002-4927-4024)* e TNPG participaram ativamente da discussão dos resultados; LRD, MACJ, SLS, LSAC, TRRM, JSC, CCC, VSL, AJN e TNPG participaram da revisão e aprovação da versão final do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Hare JM, Stamler JS. NOS: modulator, not mediator of cardiac performance. *Nat Med*. 1999;5(3):273-4.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res*. 2003;93(5):388-98.
- Seddon M, Shah AM, Casadei B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res*. 2007;75(2):315-26.
- Petroff MG, Kim SH, Pepe S, Dessy C, Marbán E, Balligand JL, et al. Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca^{2+} release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol*. 2001;3(10):867-73.
- Lunz W, Natali AJ, Carneiro MA, Dos Santos Aggum Capetinni L, Baldo MP, et al. Short-term in vivo inhibition of nitric oxide synthase with L-NAME influences the contractile function of single left ventricular myocytes in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2011;89(4):305-10.
- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Britton SL, Koch LG, Smith GL, et al. Nitric oxide synthase type-1 modulates cardiomyocyte contractility and calcium handling: association with low intrinsic aerobic capacity. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007;14(2):319-25.
- Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*. 1993;262(5134):740-4.
- Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1491-545.
- Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and $[Ca^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1996;270(Pt 1):C148-59.
- Prímola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capetinni LS, et al. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(2):593-8.
- Koch LG, Britton SL. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics*. 2001;5(1):45-52.
- Lacerda AC, Marubayashi U, Balthazar CH, Leite LH, Coimbra CC. Central nitric oxide inhibition modifies metabolic adjustments induced by exercise in rats. *Neurosci Lett*. 2006;410(2):152-6.
- Baldwin KM, Cooke DA, Cheadle WG. Time course adaptations in cardiac and skeletal muscle to different running programs. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1977;42(2):267-72.
- Rodrigues AG, Lima NR, Coimbra CC, Marubayashi U. Intracerebroventricular physostigmine facilitates heat loss mechanisms in running rats. *J Appl Physiol* (1985). 2004;97(1):333-8.
- Britton SL, Koch LG. Animal genetic models for complex traits of physical capacity. *Exerc Sport Sci Rev*. 2001;29(1):7-14.
- Wisløff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, et al. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*. 2005;307(5708):418-20.
- Oliveira FA, Guatimosim S, Castro CH, Galan DT, Lauton-Santos S, Ribeiro AM, et al. Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H394-401.
- Lauton-Santos S, Guatimosim S, Castro CH, Oliveira FA, Almeida AP, Dias-Peixoto MF, et al. Kinin B1 receptor participates in the control of cardiac function in mice. *Life Sci*. 2007;81(10):814-22.
- Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(3):C1073-81.
- 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*. 1985;85(2):247-89.
- Naylor WG, Daile P, Chipperfield D, Gan K. Effect of ryanodine on calcium in cardiac muscle. *Am J Physiol*. 1970;219(6):1620-6.
- Lehnart SE, Terrenoire C, Reiken S, Wehrens XH, Song LS, Tillman EJ, et al. Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(20):7906-10.
- Gallo MP, Ghigo D, Bosia A, Alloati G, Costamagna C, Penna C, et al. Modulation of guinea-pig cardiac L-type calcium current by nitric oxide synthase inhibitors. *J Physiol*. 1998;506(Pt 3):639-51.
- Gonzalez DR, Beigi F, Treuer AV, Hare JM. Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(51):20612-7.