Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Patologia e Medicina Legal

ANA CAROLINE SILVA DE FREITAS

O papel da via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) no desenvolvimento da cardiomiopatia séptica induzida por ligadura e perfuração do ceco

Ribeirão Preto
2018

ANA CAROLINE SILVA DE FREITAS

O papel da via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) no desenvolvimento da cardiomiopatia séptica induzida por ligadura e perfuração do ceco

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutora em
Ciências

Orientadora: Prof^a Dra Mara Rúbia Nunes Celes
Co-orientadora: Prof^a Dra Simone Gusmão Ramos

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Freitas, Ana Caroline Silva de

O papel da via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) no desenvolvimento da cardiomiopatia séptica induzida por ligadura e perfuração do ceco. Ribeirão Preto, 2018.

92 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Celes, Mata Rúbia Nunes

Co-orientadora: Ramos, Simone Gusmão

Nome: FREITAS, Ana Caroline Silva de

Título: O papel da via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) no desenvolvimento da cardiomiopatia séptica induzida por ligadura e perfuração do ceco

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutora em
Ciências

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À minha família, base de todo meu empenho e dedicação para ser uma pessoa melhor.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família por todo apoio durante minha jornada em busca da finalização deste trabalho de doutorado, sem vocês não teria conseguido.

Aos meus amigos que me apoiaram nos momentos de felicidade e dor.

Aos meus companheiros de laboratório: Lígia Santoro, Maria José Figueiredo (Zezé), Vanessa Amorim, Érica Campos, Lenaldo Branco, Mônica Abreu, por terem me auxiliado nas pesquisas e pelas conversas e momentos maravilhosos vividos.

À minha co-orientadora Profa Dra Simone Gusmão Ramos por ter me auxiliado e me ancorado nos momentos em que precisei.

À minha orientadora, Mara, que se tornou mais que uma orientadora, uma amiga, por ter me ajudado a me tornar mais que uma profissional melhor, uma pessoa melhor. Obrigado pelos conselhos dados que seguirei por toda minha vida e pelo exemplo de como ser a melhor orientadora que alguém poderia ter.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade”

Marie Curie

Resumo

FREITAS, ACS. “O papel da via *mammalian target of rapamycin* (mTOR) no desenvolvimento da cardiomiopatia séptica induzida por ligadura e perfuração do ceco”. 2018. 87f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: A disfunção cardíaca, decorrente de um prejuízo na contratilidade miocárdica, tem sido reconhecida como um fator importante que contribui para as altas taxas de mortalidade na sepse. Outro fato importante aponta para o envolvimento da redução da expressão da via de sinalização PI3K/mTOR levando a uma diminuição potencial das taxas globais de síntese proteica através da redução da maquinaria de tradução disponível, o que reforça o envolvimento destes elementos na progressão da disfunção cardíaca na sepse. **Metodologia:** Foram utilizados camundongos da linhagem C57/BL6 para indução de sepse através da técnica de ligadura e perfuração do ceco separados em quatro grupos: controle com e sem tratamento e sepse moderada com e sem tratamento, o tratamento foi realizado 2 horas antes da cirurgia com inibidor da via mTOR, rapamicina. Foi realizada análise histopatológica em metacrilato e coloração picrosirius para colágeno, western blotting para quantificação da expressão proteica e real-time PCR para quantificação da expressão gênica, por fim realizamos análise funcional através da ecocardiografia. **Resultados:** Foi encontrado aumento das lesões teciduais e depósito de colágeno no grupo séptico tratado com rapamicina. A análise por western blotting e real-time PCR demonstrou redução das proteínas envolvidas na via mTOR nos grupos sépticos com e sem tratamento com ênfase no grupo tratado e por fim a avaliação funcional mostrou redução dos parâmetros débito cardíaco e fração de ejeção nos grupos sépticos com e sem tratamento. **Conclusão:** Nossos resultados demonstram que a via mTOR é de extrema importância na estrutura e função cardíacas, visto que sua inibição ocasionou o aumento de lesões e deposição de colágeno juntamente com alterações funcionais, podendo se transformar em um possível alvo terapêutico para futuras pesquisas clínicas em animais e humanos.

Palavras-chave: sepse, disfunção miocárdica, mTOR, Akt, mTORC1, mTORC2, ecocardiograma, p70S6K, remodelamento cardíaco.

ABSTRACT

FREITAS, ACS. **The role of the *mammalian target of rapamycin* (mTOR) pathway in the development of septic cardiomyopathy induced by cecal ligation and puncture.** 2018. 87p. Thesis (Doctorate) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: Cardiac dysfunction, due to impairment in myocardial contractility, has been recognized as an important factor contributing to the high mortality rates in sepsis. Another important fact is the involvement of the inhibition of the PI3K / mTOR signaling pathway leading to a potential decrease in the overall rates of protein synthesis through the reduction of available translation machinery, which reinforces the involvement of these elements in the progression of cardiac dysfunction in sepsis. **Methods:** C57 / BL6 mice were used for induction of sepsis through the technique of ligation and perforation of the cecum separated into four groups: control with and without treatment and moderate sepsis with and without treatment, treatment was performed 2 hours before surgery with mTOR pathway inhibitor, rapamycin. Histopathological analysis was performed on methacrylate and picrosirius staining for collagen, western blotting for quantification of protein expression and real-time PCR for quantification of gene expression. Finally we performed functional analysis through echocardiography. **Results:** Increased tissue lesions and collagen deposition were found in the septic group treated with rapamycin. Western blotting and real-time PCR analysis showed reduction of the proteins involved in the mTOR pathway in the septic groups with and without treatment with emphasis in the treated group and finally the functional evaluation showed a reduction of the parameters cardiac output and ejection fraction in the septic groups with and without treatment. **Conclusion:** Our results demonstrate that the mTOR pathway is extremely important in cardiac structure and function, since its inhibition has resulted in increased lesions and collagen deposition along with functional alterations, and may become a possible therapeutic target for future clinical research in animals and humans.

Keywords: sepsis, myocardial dysfunction, mTOR, Akt, mTORC1, mTORC2, echocardiogram, p70S6K, cardiac remodeling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. OBJETIVO.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5. RESULTADOS.....	27
5.1 INDUÇÃO DE SEPSE E AVALIAÇÃO DO MODELO DE CLP.....	27
5.2 REMODELAMENTO CARDÍACO.....	29
5.3 SÍNTESE PROTEICA (MTORC1).....	40
5.4 ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO (MTORC2).....	55
5.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL – ECOCARDIOGRAFIA.....	60
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A sepse e choque séptico representam uma das principais causas de morte nas Unidades de Terapia Intensiva, apesar dos recentes avanços em diagnóstico e terapêutica. A mortalidade induzida pela sepse ultrapassa 40% e estima-se que 35 a 40% dos pacientes sépticos evoluam para o estado de choque (Pereira *et al.*, 1998). Um estudo multicêntrico brasileiro sugeriu que a sepse é o principal problema de saúde pública das Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) brasileiras, com uma incidência de 57 para cada 1000 pacientes/dia admitidos nas UTIs (Silva *et al.*, 2004). Essa incidência tem sido estimada em 400.000 novos casos por ano com taxa de mortalidade acima de 50-60% e com custo hospitalar estimado em 8,5 bilhões de dólares ao ano (Teles *et al.*, 2008). Nos Estados Unidos, de acordo com relatos recentes, aproximadamente 230.000 pessoas morreram de sepse no ano de 2009, o que colocaria esta doença como a terceira causa mais comum de morte, após doenças cardíacas e o câncer (Gaieski *et al.*, 2013).

Definida como uma síndrome clínica complexa de intensa resposta inflamatória sistêmica (SIRS) com múltiplas anormalidades fisiológicas e imunológicas, a sepse está comumente associada a modificações hemodinâmicas, distúrbios da microcirculação e alterações celulares que causam um desequilíbrio entre o fluxo sanguíneo e as necessidades metabólicas tissulares acarretando disfunção de múltiplos órgãos, responsável pela forma grave e geralmente fatal da doença (Bone *et al.*, 1992). O conceito de Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO) reflete um consenso no qual disfunção orgânica compreende um espectro variável, desde disfunções menores até falência funcional irreversível. A identificação dessa síndrome carrega importante aspecto prognóstico uma vez que é a principal causa de morte de pacientes internados em UTIs (Silva *et al.*, 2004).

A existência de depressão miocárdica na sepse, decorrente de uma redução da fração de ejeção, apesar do débito cardíaco normal ou aumentado, foi claramente demonstrada em 1984 (Parker *et al.*, 1984). Desde então, a disfunção cardíaca tem sido reconhecida como uma manifestação grave em aproximadamente 40% dos pacientes com sepse, com taxa de mortalidade entre 70% e 90% em contraste com a taxa de 20% observada em pacientes sépticos sem envolvimento cardiovascular (Parker *et al.*, 1984; Parrillo *et al.*, 1990; Bone *et al.*, 1992; Astiz e Rackow, 1998; Wheeler e Bernard, 1999). Estudos recentes têm dado suporte à opinião de que alterações estruturais no miocárdio poderiam ser corresponsáveis pela depressão miocárdica observada na sepse.

Dessa forma, a disfunção cardíaca observada durante a sepse tornou-se o foco principal de numerosos estudos, incluindo modelos experimentais e estudos em humanos (Snell e Parrillo, 1991; Powers *et al.*, 1998; Krishnagopalan *et al.*, 2002). Essa disfunção tem sido atribuída a elementos estruturais bacterianos como endotoxinas, lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede de bactérias Gram-negativas, ácido lipoteicóico de bactérias Gram-positivas e várias outras exotoxinas (Bayston e Cohen, 1990; Bone *et al.*, 1992) capazes de induzir sepse e choque séptico em condições experimentais, tornando-os valiosos para o estudo em modelos animais (Bayston e Cohen, 1990).

A patogenia do choque séptico é complexa, mas diversos estudos têm sugerido uma sequência de eventos. Os microrganismos se multiplicam no sítio infectado produzindo exotoxinas ou endotoxinas. Estes produtos são capazes de induzir uma resposta do sistema imune do hospedeiro, que por sua vez, produz um número importante de mediadores inflamatórios, tais como citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-2, TNF- α), eicosanóides, componentes do complemento, cininas, fator ativador de plaquetas (PAF) e outros mediadores que podem produzir profundos efeitos na vasculatura, no miocárdio e em outros órgãos (Cavaillon *et al.*, 2003; Adib-Conquy e Cavaillon, 2012). Se esta cascata não for interrompida haverá insuficiência cardiovascular progressiva, depressão miocárdica, hipotensão arterial com redução do tônus vascular sistêmico e má distribuição do fluxo sanguíneo. Mesmo pacientes com débito cardíaco elevado apresentam uma disfunção miocárdica associada, caracterizada por dilatação ventricular e redução da fração de ejeção. Além disso, foi demonstrado que pacientes que sobrevivem à sepse frequentemente apresentam dilatação e hipocontratilidade do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da doença. (De Almeida *et al.*, 1999).

Evidências clínicas e experimentais sugerem que a sepse promove falência múltipla de órgãos em particular o coração como possível órgão mais vulnerável durante a síndrome (Ren e Wu, 2006; Bentzer *et al.*, 2015; Seymour e Rosengart, 2015). Estudos anteriores indicaram que a sepse leva a um comprometimento da estrutura e função cardíaca manifestada como redução do débito cardíaco, dilatação ventricular e comprometimento da contratilidade do miocárdio, contribuindo para o choque hipovolêmico ou cardiogênico (Ceylan-Isik *et al.*, 2010; Turdi *et al.*, 2012; Zhang, Xu, *et al.*, 2014).

Embora a função cardíaca esteja prejudicada na sepse, permanece controverso se a disfunção contrátil do miocárdio é secundária às alterações estruturais. Níveis elevados de troponina cardíaca I e T foram observados em pacientes com lesões miocárdicas clinicamente inaparentes (Turner *et al.*, 1999) (Arlati *et al.*, 2000); (Ver Elst *et al.*, 2000; Ammann *et al.*, 2001; Mehta *et al.*, 2004). No entanto, os mecanismos responsáveis pelo aumento dos níveis dessas troponinas na sepse não estão completamente esclarecidos. Dentre os mecanismos propostos, a presença de necrose difusa e dano reversível ao aparelho contrátil cardíaco através da proteólise das troponinas cardíacas com posterior escape para o meio externo são os mais aceitos (Turner *et al.*, 1999; Ver Elst *et al.*, 2000). Alguns trabalhos, utilizando modelos experimentais de sepse, avaliaram uma associação entre a sepse e alterações estruturais miocárdicas e demonstraram a ocorrência de necrose miocitária e edema mitocondrial (Coalson *et al.*, 1975; Hersch *et al.*, 1990; Gotloib *et al.*, 1992; Schlag *et al.*, 1992; Goddard *et al.*, 1996), e ainda, um prejuízo na contratilidade miocárdica na ausência de lesão tecidual (Piper *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998).

Estudo anterior realizado em nosso laboratório avaliou os mecanismos celulares diretamente dependentes da sepse de longa duração e choque séptico na produção de alterações estruturais no miocárdio humano (Rossi *et al.*, 2007). No trabalho em questão foi verificado um aumento na expressão de TNF- α e acúmulo intracelular de lipídios no miocárdio dos pacientes com sepse, resultando provavelmente em disfunção contrátil do miocárdio. Os corações dos pacientes com sepse apresentaram focos dispersos de ruptura do aparelho contrátil de actina/miosina, o que representaria lise de miofilamentos. Ainda, foi observado um aumento significativo dos níveis de iNOs e nitrotirosina, sugerindo que o estresse oxidativo poderia ter um papel importante no rompimento das moléculas de actina/miosina nos corações dos pacientes com sepse.

Também em nosso laboratório, demonstramos em estudo experimental de sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) que há perda de proteínas importantes envolvidas tanto no remodelamento do disco intercalar quanto na expressão de glicoproteínas que atuam na ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular. De acordo com nossos resultados, a redução na expressão das proteínas envolvidas na formação das *gap junctions* (conexina43) e *junções aderentes* (N-caderina) resultariam na perda da integridade estrutural dos discos intercalares, alterando o acoplamento mecânico e eletroquímico entre os cardiomiócitos vizinhos, contribuindo para a disfunção miocárdica observada na sepse (Celes *et al.*, 2007).

Outro ponto importante abordado em nosso estudo foi a avaliação do complexo distrofina-glicoproteínas associadas (CDG) cuja principal função é proporcionar forte ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular (Lapidos *et al.*, 2004), contribuindo para a manutenção da forma celular, resistência mecânica e transdução de força contrátil dos cardiomiócitos, permitindo a interação entre o citoesqueleto intracelular, o sistema contrátil propriamente dito e a matriz extracelular (Hein *et al.*, 2000; Kostin *et al.*, 2000). Os resultados demonstraram que houve redução na expressão de distrofina e das glicoproteínas associadas durante a sepse experimental. A redução e/ou perda da expressão de distrofina é o evento primário que ocorre seguido pela degeneração miofilamentar e lise dos cardiomiócitos. A diminuição na expressão ou colapso das glicoproteínas associadas à distrofina: β -dystroglicana, γ -sarcoglicana, integrina e laminina foram considerados eventos secundários (Celes, Torres-Duenas, Malvestio, *et al.*, 2010; Celes, Torres-Duenas, Prado, *et al.*, 2010).

Estudos realizados com humanos e em modelos animais indicam que a perda da associação entre as estruturas do complexo distrofina-glicoproteínas associadas e a matriz extracelular pode levar ao desenvolvimento de cardiomiopatias (Galvagni *et al.*, 2002; Lapidos *et al.*, 2004; Heydemann e McNally, 2007). A ausência de um ou mais componentes desse complexo causa degeneração muscular progressiva (Cordier *et al.*, 2000) e implica na ruptura da ligação física que ancora a actina ao citoesqueleto subsarcolemal e os sarcômeros ao sarcolema (Danialou *et al.*, 2001), com consequente perda de função e morte celular (Lapidos *et al.*, 2004). Na sepse polimicrobial, a presença de desarranjo miofilamentar cardíaco é caracterizada pela redução da integridade sarcolemal associada ao aumento da peroxidação lipídica e nitração de proteínas nos corações sépticos, ocasionando dano aos lipídios de membrana e proteínas celulares, o que reforça o envolvimento destes elementos na progressão da disfunção cardíaca (Celes, Torres-Duenas, Prado, *et al.*, 2010), resultando no acúmulo intracelular de cálcio e morte celular (Celes *et al.*, 2013).

Pesquisas utilizando pacientes com distrofia muscular de Duchene e modelos murinos de distrofia muscular (*mdx*) demonstraram que a perda de distrofina desestabiliza o complexo de proteínas associadas ao sarcolema, desestruturando o miócito (Straub *et al.*, 1997; Vatta *et al.*, 2002; Toyo-Oka *et al.*, 2004; Heydemann e McNally, 2007). Evidências do escape do conteúdo intracelular das células musculares danificadas ou distróficas são sustentada por níveis séricos elevados de enzimas musculares (Rosalki,

1989) e fatores de crescimento (D'amore *et al.*, 1994; Kaye *et al.*, 1996). Simultaneamente, ocorre perda da integridade sarcolemal que permite o influxo de moléculas para o interior da célula. Em particular, tem sido observado aumento dos níveis de cálcio (Ca^{+2}) no músculo esquelético deficiente de distrofina (Bodensteiner e Engel, 1978; Gillis, 1996). Nesse contexto, um ou ambos os eventos contribuiriam para a patogênese da distrofia muscular.

Ao longo dos anos tem sido demonstrado que os níveis intracelulares de Ca^{+2} possuem um papel regulador central nas funções cardiovasculares e a elevação sustentada desse íon no citosol poderia desencadear fenômenos bioquímicos e morfológicos que conduziriam à morte celular. A hipertrofia cardíaca, a cardiomiopatia isquêmica, a aterosclerose e outras alterações degenerativo-proliferativas em seres humanos estão relacionadas ao acúmulo intracelular de Ca^{+2} durante o processo de remodelamento progressivo do sistema cardiovascular (Berry *et al.*, 2001; Mandegar *et al.*, 2002; Varro *et al.*, 2004). Em diversas situações, o acúmulo intracelular de cálcio resulta do aumento inespecífico da permeabilidade da membrana celular. Em consequência, ocorre ativação de várias enzimas cálcio-dependentes que possuem potenciais efeitos celulares. As cisteíno-proteases são enzimas intracelulares caracterizadas pela presença de um resíduo de cisteína em seu sítio ativo e degradam tanto proteínas de membrana quanto do citoesqueleto (Sorimachi *et al.*, 1997; Huang e Wang, 2001). Existem três grandes grupos de cisteíno-proteases: as catepsinas, as caspases e as calpaínas. As catepsinas são proteases lisossomais independentes de Ca^{+2} e parecem não ter papel definido na lesão celular (Sorimachi *et al.*, 1997). As caspases, outra família de proteases não-lisossomais intracelulares independentes de cálcio, participam em duas vias de sinalização intracelular distintas: ativação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo: IL-1 β) e promoção da morte celular por apoptose (Mauriz *et al.*, 2003). A última classe de proteases são as calpaínas, enzimas intracelulares dependentes de cálcio, descobertas em 1964 por Guroff (Guroff, 1964) e purificadas por Dayton *et al.*, em 1976 (Dayton *et al.*, 1976). A ativação excessiva das calpaínas estaria implicada na fisiopatologia de várias alterações, incluindo inflamação (Cuzzocrea *et al.*, 2000), lesão por isquemia e reperfusão (Mcdonald *et al.*, 2001), trauma (Maass *et al.*, 2002), doenças neurodegenerativas e disfunção miocárdica (Camins *et al.*, 2006; Mani *et al.*, 2009; Muller e Dhalla, 2012).

Dados da literatura têm demonstrado que proteínas de membrana (receptores de fatores de crescimento, moléculas de adesão e transporte de íons), enzimas (quinasas,

fosfatases e fosfolipases), bem como citocinas e fatores de transcrição (Sorimachi *et al.*, 1997), são clivados rapidamente pelas calpaínas. O mesmo fenômeno foi observado em proteínas envolvidas na ligação entre o citoesqueleto celular e a membrana plasmática (talina, vinculina, espectrina e filamina) e na maioria das proteínas dos filamentos intermediários, como desmina e vimentina (Huang e Wang, 2001; Sorimachi *et al.*, 2011). Na maioria dos casos, a clivagem das proteínas do citoesqueleto pela calpaína, especialmente os filamentos intermediários, rompe sua capacidade de ligação cruzada disponibilizando essas proteínas para uma degradação posterior. Pouco se sabe a respeito da degradação proteica provocada pelas calpaínas; de forma geral, elas clivam as proteínas em substratos gerando grandes fragmentos polipeptídicos ao invés de pequenos peptídeos ou aminoácidos (Goll *et al.*, 2003). Essa ação proteolítica limitada das calpaínas levou à especulação de que os fragmentos peptídicos resultantes da clivagem das calpaínas seriam usados como substratos para o sistema ubiquitina-proteassoma (Huang e Forsberg, 1998; Goll *et al.*, 2003). A expressão aumentada de calpaína-1 em corações de camundongos foi associada a uma atividade proteolítica específica, com aumento de ubiquitinação e atividade do proteassoma. Ao contrário, a inibição dessa protease foi capaz de reduzir a ubiquitinação de proteínas específicas do miocárdio. Tais resultados demonstram a necessidade da calpaína no processo de ubiquitinação e degradação proteossomal de proteínas miocárdicas, cujo acúmulo anormal pode induzir a formação de autofagossomas e degeneração de cardiomiócitos (Galvez *et al.*, 2007).

Outro dado importante provém de um estudo realizado por Beltran *et al.*, (Beltran *et al.*, 2011), onde os autores sugeriram que a calpaína é capaz de modular os sinais proliferativos celulares, parcialmente dependentes da via de sinalização PI3K/mTOR. Os autores mostraram ainda, o papel regulador da calpaína sobre a via dependente de PI3K/mTOR no crescimento e sobrevivência celulares durante a privação de soro em cultura de células. A inibição da mTOR mediada pela calpaína poderia reduzir potencialmente as taxas globais de síntese de proteínas, reduzindo a maquinaria de tradução disponível para manter os níveis de síntese proteica (Smith e Dodd, 2007).

A enzima mTOR, é uma serino-treonina pertencente à família das fosfatidilinositol-3-quinase (PIKKs; que incluem ATM e ATR, proteínas envolvidas na reparação do DNA) (Harris e Lawrence, 2003). Envolvida na regulação do crescimento e sobrevivência celular (Chong *et al.*, 2010; Hwang e Kim, 2011), a mTOR forma dois complexos distintos: mTORC1, que ativa a proteína ribossomal S6 kinase-1 (S6K1) para

aumentar a síntese de proteínas (Iijima *et al.*, 2002; Shioi *et al.*, 2002; Shioi *et al.*, 2003) e mTORC2 que ativa Akt para promover a sobrevivência celular e organização do citoesqueleto (Figura-1) (Sarbasov *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006). As funções distintas de mTOR são mediadas por interações moleculares entre os complexos mTORC1 e mTORC2, que partilham algumas moléculas em comum, mas também possuem duas proteínas diferentes; uma proteína adaptadora sensível à rapamicina (Raptor) no complexo mTORC1 e uma proteína adaptadora insensível à rapamicina (Rictor), presente no complexo mTORC2 (Sarbasov *et al.*, 2004; Wullschleger *et al.*, 2006). A mTORC1 estimula a síntese de proteínas através do aumento da fosforilação de ambos, fator de iniciação eucariótico de tradução 4EBP-1 e da proteína ribossomal serina/treonina-quinase S6 (S6K1) (Lee *et al.*, 2007; Soulard e Hall, 2007); em situações onde o 4EBP-1 não é fosforilado ocorre o bloqueio da tradução de proteínas. A Raptor é um componente essencial do complexo e possui a função de recrutar o substrato da mTOR para o complexo mTORC1, a Raptor é uma proteína de ligação de 150 kDa, que também se liga ao 4EBP1 e à p70S6K. A ligação da Raptor à mTOR é necessária para a fosforilação catalisada pela mTOR do fator 4EBP1 *in vitro*, o qual aumenta fortemente a atividade da mTOR através da p70S6K. A mTORC2 controla a organização do citoesqueleto de actina, o tamanho celular, a migração e sobrevivência das células endoteliais e a progressão do ciclo celular. O Rictor permite que a mTORC2 fosforile a Akt na Ser473 ocasionando sua ativação e facilitando sua fosforilação na Thr308 pela fosfatidilinositol quinase-dependente 1 (PDK1) (Chong *et al.*, 2010; Hwang e Kim, 2011).

Figura-1 (Retirada de: Chong ZZ, Shang YC, and Maiese K. Cardiovascular Disease and mTOR Signaling. *Trends Cardiovasc Med.* 2011;21:151-155).

A expressão de mTOR ocorre em muitos sistemas do organismo, incluindo o sistema cardíaco, pulmonar, imunológico, reprodutivo e gastrointestinal (Chong *et al.*, 2010; Hwang e Kim, 2011). Sua sinalização é ativada através de hormônios e fatores de crescimento e sua inibição é causada pela falta de aminoácidos ou de energia, sendo uma das principais funções da mTOR promover a tradução do mRNA, um processo que necessita de aminoácidos como precursores e consome uma elevada proporção da energia celular (Wang e Proud, 2006). Além disso, a mTOR pode ter um papel significativo no desenvolvimento celular através da regulação de células satélites. Por exemplo, em células endoteliais a mTOR parece ser necessária para o desenvolvimento das células progenitoras endoteliais, isso porque a inibição das vias de mTOR com rapamicina levou à morte destas células, podendo ocorrer através da inibição da sinalização do fator de crescimento endotelial (Miriuka *et al.*, 2006).

Em relação ao tecido cardíaco, o crescimento embrionário dos cardiomiócitos através de células satélites em humanos poderia ser dependente da mTOR, uma vez que

a inibição farmacológica da mTOR levou à limitação do crescimento de células satélites (Foldes *et al.*, 2011). Em geral, acredita-se que a mTOR tenha um papel importante na proliferação e diferenciação de células satélites embrionárias. Isso ocorre porque a supressão do domínio C-terminal da mTOR, que controla a atividade desta cinase, leva a uma diminuição no tamanho das células, limitando a proliferação de células satélites embrionárias (Murakami *et al.*, 2004). Além disso, o silenciamento do gene da mTOR em camundongos resultou na letalidade precoce e na paralização da proliferação celular embrionária (Gangloff *et al.*, 2004). A angiogênese, processo de formação de novos vasos, é um componente importante de proteção e regeneração do tecido cardíaco podendo ser regulada em parte pela mTOR (Maiese *et al.*, 2009). A inibição da sinalização da mTOR em situações de estresse induz a uma sequência de eventos como a elevação dos níveis de metaloproteinase-1 e ao bloqueio do inibidor tecidual da metaloproteinase-3, com subsequente comprometimento da angiogênese (Lemaitre *et al.*, 2011).

Em casos de lesão cardíaca, onde não há um processo de neovascularização eficaz, o reparo e a regeneração tecidual podem ser limitados ou podem não ocorrer. Outro ponto importante é que durante a lesão cardíaca isquêmica, a ativação da mTOR pode possuir um papel protetor contra a lesão oxidante causada pela isquemia /reperfusão em cardiomiócitos (Hernandez *et al.*, 2011). Isso porque, durante os períodos de pós-condicionamento isquêmico, a mTOR é necessária para evitar a morte de células cardíacas por apoptose (Wagner *et al.*, 2010). Em estudos que bloqueiam a fosforilação e ativação da p70S6K, a área isquêmica cardíaca e cicatricial são aumentadas, ilustrando ainda, um papel cardioprotetor para a via de sinalização da mTOR (Lajoie *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura, poucos estudos tentaram estabelecer uma relação entre o desenvolvimento da sepse e ativação da via de sinalização da mTOR. Lee *et al.*, 2007 demonstraram que o complexo mTORC1-S6K estava ativado em vários órgãos (pulmões, rins e fígado) de camundongos desafiados com LPS, e que a inibição do mTORC1-S6K pela administração de rapamicina foi capaz de ocasionar a diminuição dos níveis de várias citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e VEGF (Lee *et al.*, 2007).

Dados esses, semelhantes ao estudo de Lorne *et al.*, 2009 que demonstraram que o tratamento com rapamicina foi capaz de reprimir a liberação de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela administração de LPS. Além disso, verificou-se que a secreção de VEGF é um processo dependente do complexo mTORC1-S6K, semelhante

a outros dados provenientes de estudos relacionados ao câncer (Guba *et al.*, 2002; El-Hashemite *et al.*, 2003; Lorne *et al.*, 2009). O VEGF tem sido implicado por desempenhar um papel significativo na síndrome do desconforto respiratório agudo (Thickett *et al.*, 2001), e na sepse (Yano *et al.*, 2008). Em estudo utilizando o músculo gastrocnêmio de ratos submetidos à ligadura e perfuração do ceco, Kazi *et al.*, 2011 demonstraram que a sepse diminuiu a fosforilação do fator 4E-BP1, bem como a fosforilação de mTOR em Ser2448 e Ser2481, indicando um decréscimo na atividade da mTOR (Kazi *et al.*, 2011). Além disso, a sepse foi capaz de aumentar a fosforilação de Raptor em aproximadamente 90% e o total de DEPTOR, uma proteína que interage com a mTOR que acredita-se ser um regulador negativo de mTOR (Peterson *et al.*, 2009), no músculo séptico por volta de 70%, em comparação com os valores dos controles.

Desta forma, o estudo dos mecanismos celulares e moleculares diretamente associados às alterações cardíacas observadas na sepse torna-se de extrema importância, uma vez que a identificação das bases moleculares relacionadas a esses processos pode resultar na proposição de novos alvos terapêuticos para essa síndrome. Neste contexto, a proposta do presente projeto é estudar a contribuição da via de sinalização da mTOR, avaliando sua ação reguladora na síntese proteica e atuação como um possível mecanismo cardioprotetor, no desenvolvimento da cardiomiopatia séptica induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP).

2. JUSTIFICATIVA

O estudo da sepse experimental em camundongos em nosso laboratório demonstrou a participação da distrofina e demais proteínas do CDG nas alterações cardíacas induzidas pela sepse, bem como o possível papel da ativação da via de sinalização de proteases cálcio-dependentes, as calpaínas, na perda das proteínas do CDG. Como dito anteriormente, os mecanismos precisos pelos quais o estresse induzido pela sepse modula a resposta da célula cardíaca ainda é uma questão a ser elucidada. Estudos recentes propõem o papel de uma variedade de vias de sinalização e síntese de proteínas, dentre elas, a via da mTOR, que poderia estar inibida durante a sepse e contribuir para a ocorrência de disfunção cardíaca.

3. OBJETIVO

De acordo com o exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar a contribuição da via de sinalização da mTOR, avaliando sua ação reguladora na síntese proteica e atuação no mecanismo intrínseco de remodelamento cardíaco em animais submetidos à sepse experimental induzida pela ligadura e perfuração do ceco (CLP) através do uso do inibidor de mTOR, Rapamicina.

3.1 Objetivos Específicos:

- Avaliar o remodelamento cardíaco através da expressão de colágeno e ocorrência de lesões.
- Avaliar a síntese de proteínas através de análise do complexo mTORC1.
- Avaliar as proteínas do complexo mTORC2, responsáveis pela organização do citoesqueleto.
- Avaliar a função cardíaca.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e aprovado (protocolo nº051/2014). O estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. A manipulação dos animais e coleta dos espécimes clínicos foi realizada de forma cuidadosa por um pesquisador devidamente treinado para realização dos experimentos propostos.

Animais de experimentação - Foram utilizados camundongos machos, adultos, da linhagem C57Bl/6, com peso entre 22 e 25g, provenientes do o Biotério do Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno [máximo de seis (06) animais por caixa], com água e ração comercial autoclavada *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais.

Grupos experimentais:

Grupo de animais falso-operados (SHAM);

Grupo de animais falso-operados e tratados com inibidor de mTOR – Rapamicina (SHAM+RP);

Grupo de animais submetidos ao estímulo séptico moderado (ESM);

Grupo de animais submetidos ao estímulo séptico moderado e tratados com inibidor de mTOR – Rapamicina (ESM+RP).

Indução de sepse pelo modelo de CLP (cecal ligation and puncture) - Os animais foram anestesiados com associação de ketamina (74 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg) por via intraperitoneal, que permite ao animal manter a respiração espontânea durante o experimento. Posteriormente, foi realizada laparotomia mediana com aproximadamente 1 cm de extensão. O ceco foi localizado, exposto e ligado com linha de seda estéril, após este procedimento o mesmo foi perfurado duas vezes com agulha 22G para indução do estímulo séptico moderado. O grupo de animais falso-operados foi submetido ao mesmo procedimento, porém sem a ligação e perfuração do ceco. Após o processo cirúrgico o ceco dos animais foi recolocado em sua posição original, dentro do abdômen, e o mesmo foi fechado em duas camadas. Imediatamente após a cirurgia cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 1mL de salina e colocado em incubadora a 37C° por 1 hora. No

pós-cirúrgico foi realizada a cobertura analgésica do animal utilizando fármaco opióide com alto potencial analgésico (Tramadol (Tramal®) na dose de 2mg/kg i.m., uma vez ao dia, durante o período experimental de 48 horas), o que foi suficiente para promover a ausência de qualquer reação dolorosa ou de desconforto aos animais devido o procedimento cirúrgico.

Tratamento dos animais - Os animais falso-operados (SH+RP) e submetidos à sepse (ESM+RP) receberam injeção intraperitoneal de inibidor de mTOR (Rapamicina - Sigma St. Louis, MO, EUA com dose a ser determinada), diluído em DMSO, uma hora antes do processo cirúrgico. Os animais controle (SHAM e ESM) receberam volume equivalente de solução veículo (a mesma utilizada para diluir a droga). Após o tratamento, os animais foram acondicionados novamente em suas gaiolas e inspecionados diariamente para verificar a ocorrência de complicações da ferida operatória (infecção e deiscência completa). Aqueles que apresentaram tais problemas foram submetidos à eutanásia para evitar sofrimento do animal.

Avaliação da sobrevivência - A mortalidade foi determinada através da observação da sobrevivência dos animais durante o período de infecção, ou seja, após a indução da sepse. Foi estabelecido um prazo máximo de observação de cinco dias e foram utilizados 10 animais por grupo, sendo o experimento repetido duas vezes.

Eutanásia dos animais e coleta do material - Após 24, 48 e 72 horas da indução da sepse por CLP, os animais de cada grupo foram sacrificados para coleta do material. Após anestesia, com associação de ketamina (74 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg) i.p., os animais foram colocados sobre mesa cirúrgica e, através de incisão mediana, o tórax foi aberto e os animais mortos por exsanguinação da aorta abdominal. O coração foi retirado ainda pulsando, lavado em salina gelada para retirada do excesso de sangue e seco em papel de filtro. Em seguida, o coração foi cortado longitudinalmente; metade do tecido foi fixado em formol a 4% e processado para análise anatomopatológica e a outra parte foi devidamente armazenada em freezer para as demais análises. Os fragmentos foram mantidos a -80°C até o momento de uso.

Análise histopatológica – 08 Animais de cada grupo controle e cada grupo séptico foram sacrificados nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a indução de sepse por CLP. O coração foi retirado ainda pulsando, lavado em salina gelada para retirada do excesso de sangue, seco em papel de filtro e dividido longitudinalmente. Uma parte foi fixada em formol 4% para realizar as colorações de hematoxilina e eosina e ácido fosfotungstico-hematoxilina

(PTAH) e Picrosirius Red. A outra metade do tecido foi congelada em nitrogênio líquido e, em seguida armazenada em freezer a -80°C até o momento do uso.

Western blot - Amostras de tecido cardíaco dos grupos controle e grupos sépticos (08 animais por grupo) foram coletadas, lavadas em PBS estéril gelado, secas em papel de filtro, colocadas em tubos de eppendorf de 2mL e imediatamente congeladas a -80°C até o momento da extração de proteínas. Foi adicionado ao eppendorf o tampão de extração com inibidores da protease e fosfatase e, em seguida, o tecido foi triturado em polytron. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante congelado a -70°C e posteriormente utilizado para a dosagem de proteínas. A dosagem de proteínas foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm pelo método de Bradford. As proteínas foram separadas por eletroforese (100 volts por 1h 40 min) e então transferidas para membrana de PVDF (100 volts por 2 horas em tampão de transferência). Após, as membranas foram coradas por Ponceau para marcação das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em H_2O deionizada e colocadas em solução de bloqueio *overnight*. Após esse procedimento, as membranas foram incubadas com anticorpo primário *overnight*. Os anticorpos utilizados foram: anti-mTOR, anti-4E-BP1, anti-p70S6K, anti-COL1A, anti-COL3A, anti-Raptor e anti-Rictor. Após as lavagens com Tampão TBS-T foi colocado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 40 minutos à temperatura ambiente. Após este processo, a membrana foi revelada no aparelho ChemiDoc XRS (BioRad). A quantificação das bandas específicas foi realizada usando o programa *ImageJ* (disponível na internet <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Os valores relatados são referentes à densidade óptica (DO) das bandas expressas em unidade arbitrária (UA).

Coleta, extração e quantificação de RNA para Real-Time PCR - Amostras de tecido cardíaco dos grupos controle e grupos sépticos (08 animais por grupo) foram coletadas e colocadas em tubos de eppendorf estéril de 2mL e imediatamente congeladas a -80°C até o momento da extração de RNA. Para a extração de RNA foi adicionado 1mL de TRIzol® Reagent (Life Technologies Corporation) ao tecido que foi triturado com homogeneizador de tecidos (DREMEL®300, Marconi). Após este procedimento as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio ao tubo e este foi homogeneizado no vórtex por 15 segundos, as amostras foram incubadas por 2 minutos e então centrifugadas a 4°C , 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos livres de

RNAse, o sobrenadante foi precipitado com 500µL de isopropanol e homogeneizado em vórtex por 15 segundos. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 4°C, 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi lavado com 200µL de etanol 70% e centrifugado a 4°C, 12.000 rpm por 2 minutos, o etanol foi retirado e o pellet deixado para secar a temperatura ambiente. Após a secagem foram adicionados 20µL de água DEPC. O RNA foi quantificado no aparelho Nanodrop 2000. Após a determinação da concentração do RNA total o lisado foi armazenado a -80°C, para a reação de Real Time-PCR.

Real-Time PCR - Para a transcrição reversa, 500ng de RNA total foram transcritos com o High-capacity cDNA RT (Applied Biosystems, Foster City, EUA), em termociclador, conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada reação para detecção dos genes: mTOR, Crtc2, Eif4e, Raptor, Rictor e Rps6k utilizando-se sondas TaqMan (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, CA, EUA), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante.

Avaliação da Função Cardíaca (Ecocardiografia) - O estudo histopatológico dos corações provê somente informação pontual referente à estrutura cardíaca em um animal. Por outro lado, o uso de técnicas diagnósticas não invasivas baseadas em imagem permite o estudo em série das alterações cardíacas tornando-se uma ferramenta importante para o estudo da progressão natural das doenças. Para essa análise, os animais (10 animais por grupo) foram anestesiados com sistema de anestesia inalatória com isoflurano, que permite ao animal manter a respiração espontânea durante o exame. Após a anestesia, foi realizada a retirada dos pêlos da região anterior do tórax com o auxílio de Nair®. O equipamento de ecocardiografia utilizado foi o Vevo 2100® High-Resolution Imaging System (VisualSonics, Toronto, ON, Canadá), com transdutor de frequência de 30-MHz. As medidas sistólicas foram feitas na região de menor dimensão da cavidade ventricular, de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

Avaliação da função sistólica:

Fração de encurtamento (FE) - %

Calculada subtraindo-se o diâmetro sistólico do diastólico do ventrículo esquerdo, e dividindo pelo diâmetro diastólico, vezes 100:

$$FE\% = \frac{DDVE - DSVE}{DDVE} \times 100$$

Fração de Ejeção (FEj) - %:

$$\frac{\text{Volume diastólico final} - \text{volume sistólico final}}{\text{Volume diastólico final}} \times 100$$

Débito Cardíaco (DC) mL/min:

$$\text{DC} = \text{VE} \times \text{frequência cardíaca}$$

Análise Estatística

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentaram distribuição normal. O índice de sobrevivência foi apresentado como a porcentagem de animais vivos. O nível de significância considerado foi de 5% e os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., San Diego, California, EUA). Comparações múltiplas entre os grupos foram feitas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1 Indução de sepse e avaliação do modelo de CLP

Avaliação do índice de sobrevida dos animais submetidos à sepse

Inicialmente, a letalidade do modelo de CLP em camundongos foi avaliada nos grupos controles e nos grupos submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da sepse. A mortalidade foi avaliada em intervalos de no mínimo seis, e no máximo doze horas, sendo a primeira observação realizada seis horas após o término da cirurgia. No primeiro horário de avaliação (6 horas) não foram observadas alterações físicas nos animais e também não ocorreram mortes em nenhum dos grupos. Nos horários mais tardios de observação (a partir das 12 horas) os animais submetidos ao estímulo séptico apresentaram sinais de instalação do estado de sepse, como piloereção, tremores, redução da temperatura corporal (sensível ao tato), prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação.

Na figura 1.1 observa-se a curva de sobrevida dos animais submetidos à falsa cirurgia (Sham) e os animais submetidos ao estímulo séptico moderado sem ou com tratamento (CLP, 3mg/Kg, 6mg/Kg e 12mg/Kg) para obtenção da dose adequada para o presente estudo. Os camundongos submetidos ao estímulo séptico moderado (CLP) apresentaram 100% de sobrevida 12 horas após a cirurgia, declinando progressivamente para 80% no período de 36 horas, 70% no período de 48 horas, até 50% no período de 60 horas, valor que se manteve até o final do período de observação de 168 horas.

Os camundongos submetidos ao estímulo séptico moderado e tratados com Rapamicina na dose 3mg/Kg (3mg/Kg) apresentaram 100% de sobrevida 12 horas após a indução da sepse. Após 24, 48 e 72 horas, tempo definido como período de estudo, a porcentagem de sobrevida dos animais do grupo 3mg/Kg foram de 100%, 50% e 30% respectivamente, número que se manteve até o final do período de observação, 168 horas. Os camundongos submetidos ao estímulo séptico moderado e tratados com Rapamicina na dose 6mg/Kg (6mg/Kg) apresentaram 100% de sobrevida 12 horas após a indução da sepse. Após 24, 48 e 72 horas, tempo definido como período de estudo, as porcentagens de sobrevida dos animais do grupo 6mg/Kg foram de 90%, 80% e 60% respectivamente, número que reduziu até aproximadamente 40% até o final do período de observação, 168 horas. Os camundongos submetidos ao estímulo séptico moderado e tratados com

Rapamicina na dose 12mg/Kg (12mg/Kg) apresentaram 100% de sobrevida 12 horas após a indução da sepse. Após 24, 48 e 72 horas, tempo definido como período de estudo, as porcentagens de sobrevida dos animais do grupo 12mg/Kg foram de 100%, 30% e 30% respectivamente, número que reduziu até aproximadamente 20% até o final do período de observação, 168 horas.

Após análise do gráfico de sobrevida foi escolhido a dose de 6mg/Kg para o estudo.

Figura 1.1 - Sobrevida

Figura 1.1 Curva de sobrevida dos animais após a indução da sepse em função do tratamento com Rapamicina em diferentes dosagens. Os dados mostram a porcentagem de sobrevida dos animais submetidos à falsa cirurgia (Sham) e dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado (CLP) com ou sem tratamento com Rapamicina nas doses de 3mg/Kg, 6mg/Kg e 12mg/Kg. A sobrevida dos animais foi acompanhada diariamente por um período de 168 horas após a indução da sepse (n=10). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

5.2 Remodelamento Cardíaco

As células do músculo cardíaco são providas de mecanismos bioquímicos especializados para a rápida geração de força e movimento. O citoesqueleto forma o arcabouço dos cardiomiócitos, pois regula a forma celular, proporcionando integridade mecânica e resistência, além de estabilizar as proteínas do sarcômero. Alterações no citoesqueleto representam tanto causa como consequência de disfunções contráteis e remodelamento cardíaco em pacientes com insuficiência cardíaca (Sequeira *et al.*, 2014). Para verificar a ocorrência de lesão cardíaca induzida pela sepse foi realizada análise histológica do tecido cardíaco pela técnica de metacrilato. Posteriormente, foi realizada análise qualitativa e quantitativa de colágeno no tecido cardíaco dos animais submetidos à falsa cirurgia e ao estímulo séptico moderado com e sem tratamento com Rapamicina além da análise quantitativa da expressão gênica de mTOR, responsável pelo controle do remodelamento cardíaco e sobrevida celulares.

Análise histopatológica das alterações estruturais do miocárdio

A análise histopatológica do miocárdio dos animais tratados e não tratados foi realizada 24, 48 e 72 horas após a indução da sepse polimicrobiana por meio da técnica de microcopia de alta resolução, metacrilato (Figura 1.2). O miocárdio dos animais dos grupos Sham e Sham+Rapa não apresentaram alterações histológicas. Os animais do grupo ESM apresentaram focos de miocitólise e edema celular, porém com menor intensidade e extensão quando comparados ao grupo ESM+RAPA (Figura 1.2). A distribuição das lesões nos miocárdios dos animais no grupo ESM se fez em focos de lesões, já no grupo que recebeu o tratamento a distribuição de lesões foi difusa, se estendendo por todo o tecido cardíaco. Não foi detectada a presença de infiltrado inflamatório em nenhum dos grupos avaliados nos períodos avaliados.

Figura 1.2. Análise histopatológica do miocárdio dos animais falso-operados com e sem tratamento com Rapamicina e submetidos à sepse moderada com e sem tratamento com Rapamicina (material incluído em metacrilato). O miocárdio dos animais dos grupos Sham e Sham+Rapamicina (painéis superiores), ESM e ESM+Rapamicina (painéis inferiores) 24, 48 e 72 horas após a indução da sepse. A formação de focos de miocitólise e a presença de bandas de contratura se tornam mais evidentes no miocárdio séptico com tratamento com Rapamicina na progressão dos períodos analisados quando comparados ao grupo ESM. Aumento de 400x.

Análise qualitativa do colágeno

A análise da deposição de colágeno no miocárdio dos animais falso operados com e sem tratamento e submetidos ao estímulo séptico moderado com e sem tratamento foi realizada 24, 48 e 72 horas após a indução da sepse polimicrobiana por meio da técnica de coloração picrosírius red e analisada em microscópio de luz polarizada.

O miocárdio dos animais dos grupos Sham e Sham+Rapamicina apresentaram distribuição normal para colágeno. O tecido cardíaco dos animais dos grupos sépticos apresentou aumento da marcação em vermelho para colágeno com ênfase para o período de 72 horas pós estímulo séptico. Uma observação deve ser feita devido à distribuição do colágeno nos grupos sépticos, no grupo ESM o aumento se fez em focos de lesões, já no grupo que recebeu o tratamento a distribuição de colágeno foi difusa, se estendendo por todo o tecido cardíaco, principalmente em regiões perivasculares.

Figura 1.3. Análise histopatológica do miocárdio dos animais falso-operados com e sem tratamento com Rapamicina e submetidos à sepse moderada com e sem tratamento com Rapamicina (material submetido à técnica de coloração picrosirius red). O miocárdio dos animais dos grupos Sham e Sham+Rapamicina (painéis superiores), ESM e ESM+Rapamicina (painéis inferiores) 24, 48 e 72 horas após a indução da sepse. O aumento de distribuição de colágeno ocorre nos animais sépticos com maior evidência no grupo com tratamento com Rapamicina na progressão dos períodos analisados quando comparados ao grupo ESM. A distribuição do colágeno no grupo ESM se fez em focos de lesões, já no grupo que recebeu o tratamento a distribuição de colágeno foi difusa, se estendendo por todo o tecido cardíaco, principalmente em regiões perivasculares. Aumento de 400x.

Avaliação do perfil de expressão proteica de Colágeno 1A

A análise quantitativa dos níveis proteicos de colágeno 1A por imunoblotting foi realizada no lisado de proteínas do miocárdio dos animais controle, controle tratado, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de colágeno 1A em relação à quantidade total de proteínas. Na Figura 1.4 observa-se a quantidade de colágeno 1A com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) após a indução da sepse polimicrobiana. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de colágeno 1A nos períodos de 24 horas, 48 horas e 72 horas em nenhum dos grupos analisados.

Figura 1.4. Análise do perfil de expressão proteica de COL1A por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado com ou sem tratamento com inibidor de mTOR (**Rapamicina**). Não houve diferença significativa nos níveis de COL1A no miocárdio dos animais submetidos à sepse moderada (ESM), se comparados aos valores encontrados no miocárdio dos animais dos grupos (Sham, Sham+Rapamicina e ESM+Rapamicina), 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) após a cirurgia. Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão proteica de Colágeno 3A

A análise quantitativa dos níveis proteicos de colágeno 3A por imunoblotting foi realizada no lisado de proteínas do miocárdio dos animais controle, controle tratado, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de colágeno 3A em relação à quantidade total de proteínas. Na Figura 1.5 observa-se a quantidade de colágeno 3A com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) após a indução da sepse polimicrobiana. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de colágeno 3A nos períodos de 24 horas e 48 horas. No período de 72 horas foi encontrado aumento significativo nos níveis de COL3A no grupo controle tratado ($0,366 \pm 0,07$ UA) quando comparados ao grupo séptico moderado tratado ($0,277 \pm 0,03$ UA).

Figura 1.5. Análise do perfil de expressão proteica de COL3A por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado com ou sem tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Não houve diferença significativa nos níveis de COL1A no miocárdio dos animais submetidos à sepse moderada (ESM), se comparados aos valores encontrados no miocárdio dos animais dos grupos (Sham, Sham+Rapamicina e ESM+Rapamicina), 24 horas (A) e 48 horas (B) após a cirurgia, no período de 72 horas (C) foi encontrada diferença significativa entre os animais do grupo Sham+Rapamicina e ESM+Rapamicina. Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão gênica de mTOR

A análise da expressão do gene mTOR por *real time PCR* foi realizada no miocárdio dos animais controles, controles tratados, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de mRNA para mTOR. Na Figura 1.6 observa-se a expressão gênica de mTOR com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A) após a indução da sepse polimicrobiana a expressão de mTOR encontrada no miocárdio dos animais do grupo ESM ($2,837 \pm 1,49$ UA) foi significativamente maior quando comparada aos valores encontrados no miocárdio dos animais Sham ($1,000 \pm 0,00$ UA). No período de 48 horas (B) foi encontrada uma redução significativa dos níveis gênicos de mTOR no grupo ESM ($0,377 \pm 0,20$ UA) quando comparados ao do grupo controle sem tratamento ($1,000 \pm 0,00$ UA). Já no período de 72 horas (C), foi encontrado aumento significativo de expressão gênica para mTOR no grupo ESM ($2,493 \pm 0,66$ UA) quando comparada aos demais grupos estudados, Sham ($1,000 \pm 0,00$ UA), Sham+Rapamicina ($1,410 \pm 0,21$ UA) e ESM+Rapamicina ($1,633 \pm 0,17$ UA).

Figura 1.6. Análise do perfil de expressão gênica para mTOR por PCR *real-time* no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado sem ou com tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Observa-se um aumento acentuado nos níveis de expressão do gene mTOR no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado (ESM) se comparado ao dos animais dos grupos falso-operado sem tratamento (Sham) nos períodos de 24 horas (A) e 72 horas (C) que também apresentou redução da expressão gênica nos grupos com tratamento (Sham+Rapamicina e ESM+Rapamicina). No período de 48 horas (B) houve redução da expressão gênica para mTOR no grupo estímulo séptico moderado sem tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina). Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

5.3 SÍNTESE PROTEICA (mTORC1)

O complexo mTORC1, que contém mTOR em associação à raptor (proteína reguladora associada à mTOR) e IST8 (também conhecido como Gβ1), diretamente regula a síntese de proteínas nos mamíferos. Raptor, um componente decisivo do complexo mTORC1, determina a especificidade do complexo mTORC1, em parte por interagir com substratos que contenham a sinalização TOR.

Os principais alvos do complexo mTORC1 parecem ser os componentes da maquinaria de tradução, incluindo 4EBPs e 40S proteína ribossomal S6 quinase (S6Ks), ambos os quais são importantes no controle fisiológico do início da tradução. A sinalização do mTORC1 é potencialmente inibida pela rapamicina. Como a regulação da síntese de proteínas tem um papel central na manutenção do crescimento celular adequado, alterações na sinalização de mTORC1 poderiam levar a uma vasta rede de patologias humanas, incluindo câncer e doenças metabólicas (Ma e Blenis, 2009).

Avaliação do perfil de expressão gênica de Raptor

A análise da expressão do gene Raptor por *real time PCR* foi realizada no miocárdio dos animais controles, controles tratados, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de mRNA para Raptor. Na Figura 2.1 observa-se a expressão gênica de Raptor com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A) após a indução da sepse polimicrobiana a expressão de Raptor encontrada no miocárdio dos animais do grupo ESM ($1,840 \pm 0,50$ UA) foi significativamente maior quando comparada aos valores encontrados no miocárdio dos animais ESM+Rapamicina ($0,405 \pm 0,09$ UA) e no grupo Sham+Rapamicina ($1,563 \pm 0,87$ UA) quando comparada aos valores do grupo ESM+Rapamicina ($0,405 \pm 0,09$ UA). No período de 48 horas (B) foi encontrada uma redução significativa dos níveis gênicos de Raptor no grupo ESM+Rapamicina ($0,665 \pm 0,18$ UA) quando comparados ao do grupo controle sem tratamento ($1,000 \pm 0,00$ UA). Já no período de 72 horas (C), foi encontrado aumento significativo de expressão gênica para Raptor no grupo ESM ($2,040 \pm 0,44$ UA) quando comparada aos demais grupos estudados, Sham ($1,000 \pm 0,00$ UA), Sham+Rapamicina ($1,400 \pm 0,08$ UA) e ESM+Rapamicina ($1,005 \pm 0,06$ UA). Também foi encontrado aumento na expressão gênica para Raptor no grupo controle tratado Sham+Rapamicina ($1,400 \pm 0,08$ UA) quando comparada ao grupo ESM+Rapamicina ($1,005 \pm 0,06$ UA).

Figura 2.1. Análise do perfil de expressão gênica para Raptor por PCR *real-time* no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado sem ou com tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Observa-se um aumento acentuado nos níveis de expressão do gene Raptor no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado (ESM) se comparado ao dos animais do grupo estímulo séptico moderado com tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina) e do grupo submetido à falsa cirurgia com tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina) quando comparado ao grupo estímulo séptico moderado com tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina) no período de 24 horas (A). No período de 48 horas (B) foi observado aumento da expressão gênica no grupo submetido à falsa cirurgia sem tratamento (Sham) quando comparados ao grupo estímulo séptico moderado com tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina). Já no período de 72 horas (C) foi encontrado aumento da expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado quando comparado aos outros grupos do experimento (Sham, Sham+Rapamicina e ESM+Rapamicina), o grupo submetido à falsa cirurgia com tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina) apresentou aumento na expressão gênica para Raptor quando comparado ao grupo estímulo séptico moderado com tratamento (ESM+Rapamicina). Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão proteica de Raptor

A análise quantitativa dos níveis protéicos de Raptor por imunoblotting foi realizada no lisado de proteínas do miocárdio dos animais controle, controle tratado, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de Raptor em relação à quantidade total de proteínas. Na Figura 2.2 observa-se a quantidade de Raptor com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) após a indução da sepse polimicrobiana. No período de 24 horas foi encontrada redução significativa nos níveis de Raptor no grupo ESM+Rapamicina ($0,264 \pm 0,09$ UA) quando comparados aos grupos controles com e sem tratamento ($0,418 \pm 0,07$ UA e $0,443 \pm 0,10$ UA). 48 horas após a indução da sepse foram encontradas reduções significativas nos grupos tratados com Rapamicina, ESM+Rapamicina ($0,252 \pm 0,15$ UA) quando comparadas aos grupos Sham ($0,416 \pm 0,06$ UA) e ESM ($0,379 \pm 0,07$ UA), Sham+Rapamicina ($0,279 \pm 0,07$ UA) quando comparadas ao grupo Sham ($0,416 \pm 0,06$ UA). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de Raptor no período de 72 horas.

Figura 2.2. Análise do perfil de expressão proteica de Raptor por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado com ou sem tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Houve diferença significativa nos níveis de Raptor no miocárdio dos animais submetidos à sepse moderada com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparados ao grupo submetido à falsa cirurgia sem tratamento (Sham) no período de 24 horas (A). 48 horas (B) após a cirurgia, foi encontrado aumento nos níveis protéicos no miocárdio dos animais submetidos à falsa cirurgia sem tratamento (Sham) quando comparados aos grupos que receberam tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina e ESM+Rapamicina) e no grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparado ao grupo estímulo séptico moderado com tratamento (ESM+Rapamicina). No período de 72 horas (C) não foram encontradas diferenças significativas. Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão gênica de Eif4E

A análise da expressão do gene Eif4E por *real time PCR* foi realizada no miocárdio dos animais controles, controles tratados, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de mRNA para Eif4E. Na Figura 2.3 observa-se a expressão gênica de Eif4E com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A) após a indução da sepse polimicrobiana a expressão de Eif4E encontrada no miocárdio dos animais do grupo ESM+Rapamicina ($2,195 \pm 0,47$ UA) foi significativamente maior quando comparada aos valores encontrados no miocárdio dos animais ESM ($1,103 \pm 0,23$ UA), Sham ($1,000 \pm 0,00$ UA) e Sham+Rapamicina. No período de 48 horas (B) foi encontrado um aumento significativo dos níveis gênicos de Eif4E no grupo ESM ($1,707 \pm 0,56$ UA) quando comparados aos demais grupos controle com sem tratamento ($0,333 \pm 0,13$ e $1,000 \pm 0,00$ UA) e ao grupo ESM+Rapamicina. Houve redução significativa no grupo Sham+Rapamicina ($0,333 \pm 0,13$ UA) quando comparado ao grupo ESM+Rapamicina ($0,936 \pm 0,25$). Já no período de 72 horas (C), foi encontrado aumento significativo de expressão gênica para Eif4E no grupo ESM ($5,493 \pm 2,90$) quando comparados aos demais grupos estudados, Sham ($1,000 \pm 0,00$), Sham+Rapamicina ($1,210 \pm 0,73$) e ESM+Rapamicina ($2,463 \pm 1,09$).

Figura 2.3. Análise do perfil de expressão gênica para Eif4E por PCR *real-time* no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado sem ou com tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Observa-se um aumento nos níveis de expressão do gene Eif4E no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado com tratamento (ESM+Rapamicina) se comparado ao dos animais dos grupos estímulo séptico moderado sem tratamento com Rapamicina (ESM), submetidos à falsa cirurgia com tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina) e submetidos à falsa cirurgia (Sham) 24 horas após a cirurgia (A). No período de 48 horas (B) foi observado aumento da expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparados aos grupos estímulo séptico moderado com tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina), submetidos à falsa cirurgia com tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina) e submetidos à falsa cirurgia (Sham). O grupo estímulo séptico moderado sem tratamento com Rapamicina (ESM) também apresentou aumento da expressão gênica quando comparado ao grupo submetido à falsa cirurgia sem tratamento com Rapamicina (Sham). O grupo estímulo séptico moderado com tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina) também apresentou aumento da expressão gênica quando comparado ao grupo submetido à falsa cirurgia com tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina). Já no período de 72 horas (C) foi encontrado aumento da expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado (ESM) quando comparado aos outros grupos do experimento (Sham, Sham+Rapamicina e ESM+Rapamicina). Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão gênica de RpS6K

A análise da expressão do gene RpS6K por *real time PCR* foi realizada no miocárdio dos animais controles, controles tratados, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de mRNA para RpS6K. Na Figura 2.4 observa-se a expressão gênica de RpS6K com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A) após a indução da sepse polimicrobiana não foram encontradas diferenças significativas na expressão de RpS6K no miocárdio dos animais estudados. No período de 48 horas (B) foi encontrado um aumento significativo dos níveis gênicos de RpS6K no grupo ESM ($2,643 \pm 0,68$ UA) quando comparados aos demais grupos controle com sem tratamento ($0,720 \pm 0,35$ UA e $1,000 \pm 0,00$ UA) e ao grupo ESM+Rapamicina ($0,863 \pm 0,17$ UA). Já no período de 72 horas (C), foi encontrado aumento significativo de expressão gênica para RpS6K no grupo ESM ($2,338 \pm 0,42$ UA) quando comparados aos grupos controle sem e com tratamento Sham ($1,000 \pm 0,00$ UA) e Sham+Rapamicina ($1,330 \pm 0,16$ UA), também foi encontrado aumento significativo no grupo ESM+Rapamicina ($3,210 \pm 1,22$ UA) quando comparado ao grupo ESM ($2,338 \pm 0,42$ UA) e ao grupo controle tratado Sham+Rapamicina ($1,330 \pm 0,16$ UA).

Figura 2.4. Análise do perfil de expressão gênica para RpS6K por PCR *real-time* no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado sem ou com tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Não foi observado alterações significativas nos níveis de expressão do gene RpS6K no miocárdio dos animais no período de 24 horas (A). No período de 48 horas (B) foi observado aumento da expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparados aos grupos estímulo séptico moderado com tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina), submetidos à falsa cirurgia com tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina) e submetidos à falsa cirurgia (Sham). Já no período de 72 horas (C) foi encontrado aumento da expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado (ESM) quando comparado aos grupos submetidos à falsa cirurgia com e sem tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina e Sham). E aumento dos níveis de expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado com tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina) quando comparado aos grupo submetido à falsa cirurgia com tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina) e submetidos ao estímulo séptico moderado (ESM). Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão proteica de p70S6K

A análise quantitativa dos níveis protéicos de p70S6K por imunoblotting foi realizada no lisado de proteínas do miocárdio dos animais controle, controle tratado, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de p70S6K em relação à quantidade total de proteínas. Na Figura 2.5 observa-se a quantidade de p70S6K com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) após a indução da sepse polimicrobiana. No período de 24 horas foi encontrada redução significativa nos níveis de p70S6K no grupo ESM+Rapamicina ($0,055 \pm 0,02$ UA) quando comparados aos grupos controles com e sem tratamento ($0,188 \pm 0,09$ UA e $0,163 \pm 0,03$ UA) e ao grupo ESM ($0,145 \pm 0,05$ UA). 48 horas após a indução da sepse foram encontradas reduções significativas nos grupos submetidos ao estímulo séptico com e sem tratamento, ESM+Rapamicina ($0,092 \pm 0,07$ UA) e ESM ($0,136 \pm 0,03$ UA) quando comparados aos grupos controle Sham ($0,259 \pm 0,06$ UA) e Sham+Rapamicina ($0,197 \pm 0,07$ UA) respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de p70S6K no período de 72 horas.

Figura 2.5. Análise do perfil de expressão proteica de p70S6K por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado com ou sem tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Houve redução significativa nos níveis de p70S6K no miocárdio dos animais submetidos à sepse moderada com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparados aos grupos submetido à falsa cirurgia com e sem tratamento (Sham+Rapamicina e Sham) e ao grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) no período de 24 horas (A). 48 horas (B) após a cirurgia, foi encontrado redução nos níveis protéicos no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparados ao grupo submetido à falsa cirurgia sem tratamento (Sham) e redução nos níveis protéicos no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparados ao grupo submetido à falsa cirurgia com e sem tratamento (Sham+Rapamicina e Sham). No período de 72 horas (C) não foram encontradas diferenças significativas. Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão proteica de 4E-BP1

A análise quantitativa dos níveis protéicos de 4E-BP1 por imunoblotting foi realizada no lisado de proteínas do miocárdio dos animais controle, controle tratado, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de 4E-BP1 em relação à quantidade total de proteínas. Na Figura 2.6 observa-se a quantidade de 4E-BP1 com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) após a indução da sepse polimicrobiana. No período de 24 horas foi encontrado aumento significativo nos níveis de 4E-BP1 no grupo ESM+Rapamicina ($1,484 \pm 0,06$ UA) quando comparados aos grupos controles com e sem tratamento ($1,037 \pm 0,23$ UA e $1,057 \pm 0,24$ UA) e ao grupo ESM ($1,226 \pm 0,09$ UA). 48 horas após a indução da sepse foi encontrado aumento significativo nos grupos submetidos ao estímulo séptico com e sem tratamento, ESM+Rapamicina ($1,411 \pm 0,18$ UA) e ESM ($1,350 \pm 0,11$ UA) quando comparados aos grupos controle Sham ($1,152 \pm 0,03$ UA) e Sham+Rapamicina ($1,156 \pm 0,15$ UA) respectivamente. No período de 72 horas foi encontrado aumento significativo nos níveis de 4E-BP1 no grupo submetido ao estímulo séptico e tratado com Rapamicina, ESM+Rapamicina ($1,612 \pm 0,20$ UA) quando comparado aos demais grupos Sham ($1,189 \pm 0,12$ UA), Sham+Rapamicina ($1,231 \pm 0,08$ UA) e ESM ($1,371 \pm 0,14$ UA).

Figura 2.6. Análise do perfil de expressão proteica de 4E-BP1 por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado com ou sem tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Houve aumento significativo nos níveis de 4E-BP1 no miocárdio dos animais submetidos à sepse moderada com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparados aos grupos submetido à falsa cirurgia com e sem tratamento (Sham+Rapamicina e Sham) e ao grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) no período de 24 horas (A). 48 horas (B) após a cirurgia, foi encontrado aumento nos níveis protéicos no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparados ao grupo submetido à falsa cirurgia com e sem tratamento (Sham+Rapamicina e Sham) e aumento nos níveis protéicos no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparados ao grupo submetido à falsa cirurgia com e sem tratamento (Sham+Rapamicina e Sham). No período de 72 horas (C) houve aumento significativo nos níveis de 4E-BP1 no miocárdio dos animais submetidos à sepse moderada com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparados aos grupos submetido à falsa cirurgia com e sem tratamento (Sham+Rapamicina e Sham) e ao grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM). Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão gênica de Crtc2

A análise da expressão do gene *Crtc2* por *real time PCR* foi realizada no miocárdio dos animais controles, controles tratados, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de mRNA para *Crtc2*. Na Figura 2.7 observa-se a expressão gênica de *Crtc2* com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A) após a indução da sepse polimicrobiana foi encontrado aumento significativo na expressão de *Crtc2* no miocárdio dos animais do grupo submetido ao estímulo séptico tratado ESM+Rapamicina ($1,678 \pm 0,69$ UA) quando comparado aos animais dos grupos Sham+Rapamicina ($0,920 \pm 0,51$ UA) e ESM ($0,940 \pm 0,25$ UA). No período de 48 horas (B) o mesmo padrão se repetiu com aumento na expressão gênica no grupo ESM+Rapamicina ($2,250 \pm 1,14$ UA) quando comparado aos grupos Sham+Rapamicina ($0,523 \pm 0,27$ UA) e ESM ($1,045 \pm 0,58$ UA). Já no período de 72 horas (C), foi encontrado aumento significativo de expressão gênica para *Crtc2* nos grupo ESM ($3,188 \pm 1,18$ UA) e ESM+Rapamicina ($2,223 \pm 0,63$ UA) quando comparados ao grupo controle sem tratamento Sham ($1,000 \pm 0,00$ UA).

Figura 2.7. Análise do perfil de expressão gênica para *Crtc2* por PCR *real-time* no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado sem ou com tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Foi observado aumento significativo nos níveis de expressão do gene *Crtc2* no miocárdio dos animais no período de 24 horas (A) no grupo submetido ao estímulo séptico com tratamento com Rapamicina (ESM+Rapamicina) quando comparado aos grupos submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) e ao grupo submetido à falsa cirurgia com tratamento com Rapamicina (Sham+Rapamicina), padrão que se repetiu no período de 48 horas (B). Já no período de 72 horas (C) foi encontrado aumento da expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparado ao submetido à falsa cirurgia sem tratamento com Rapamicina (Sham) e aumento na expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparado ao submetido à falsa cirurgia sem tratamento com Rapamicina (Sham). Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

5.4 ORGANIZAÇÃO DO CITOESQUELETO (mTORC2)

Trabalhos anteriores demonstraram que, ao ativar membros da família AGC quinase, como PKC, PKB / Akt e SGK1, o complexo mTORC2 possui papel na regulação da organização de actina citoesquelética, sobrevivência celular e outros processos.

mTORC2 também foi relacionado recentemente à regulação do tamanho, forma e a plasticidade sináptica dos neurônios, bem como a diferenciação dos oligodendrócitos.

Estes e outros estudos demonstram que as funções do mTORC2 são diversas e específicas para o tecido ou tipo celular sendo analisados (Shende *et al.*, 2016).

Avaliação do perfil de expressão gênica de Rictor

A análise da expressão do gene Rictor por *real time PCR* foi realizada no miocárdio dos animais controles, controles tratados, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de mRNA para Rictor. Na Figura 3.1 observa-se a expressão gênica de Rictor com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A) após a indução da sepse polimicrobiana não foram encontradas diferenças significativas na expressão de Rictor no miocárdio dos animais estudados. No período de 48 horas (B) foi encontrado aumento na expressão gênica no grupo ESM ($1,990 \pm 0,44$ UA) quando comparado aos demais grupos Sham ($1,000 \pm 0,00$ UA), Sham+Rapamicina ($0,570 \pm 0,33$ UA) e ESM+Rapamicina ($1,043 \pm 0,16$ UA), e no grupo ESM+Rapamicina ($1,043 \pm 0,16$ UA) quando comparado a seu controle tratado Sham+Rapamicina ($0,570 \pm 0,33$ UA). Já no período de 72 horas (C), foi encontrado aumento significativo de expressão gênica para Rictor no grupo ESM ($3,298 \pm 0,99$ UA) e quando comparado ao grupo controle sem tratamento Sham ($1,000 \pm 0,00$ UA).

Figura 3.1. Análise do perfil de expressão gênica para Rictor por PCR *real-time* no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado sem ou com tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de expressão do gene Rictor no miocárdio dos animais no período de 24 horas (A). No período de 48 horas (B) foi encontrado aumento significativo no grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento com Rapamicina (ESM) quando comparado aos demais grupos experimentais (Sham, Sham+Rapamicina e ESM+Rapamicina). Já no período de 72 horas (C) foi encontrado aumento da expressão gênica no grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparado ao submetido à falsa cirurgia sem tratamento com Rapamicina (Sham). Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão proteica de Rictor

A análise quantitativa dos níveis protéicos de Rictor por imunoblotting foi realizada no lisado de proteínas do miocárdio dos animais controle, controle tratado, sépticos e sépticos tratados para estimar a quantidade relativa de Rictor em relação à quantidade total de proteínas. Na Figura 3.2 observa-se a quantidade de Rictor com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) após a indução da sepse polimicrobiana. No período de 24 horas foi encontrada redução significativa nos níveis de Rictor nos grupos submetidos ao estímulo séptico com e sem tratamento ESM+Rapamicina ($0,274 \pm 0,11$ UA) e ESM ($0,465 \pm 0,08$ UA) quando comparados aos grupos controles com e sem tratamento ($0,628 \pm 0,11$ UA e $0,682 \pm 0,20$ UA) respectivamente e redução proteica no grupo ESM+Rapamicina ($0,274 \pm 0,11$ UA) quando comparado ao grupo ESM ($0,465 \pm 0,08$ UA). 48 horas o mesmo padrão foi encontrado com redução nos grupos ESM+Rapamicina ($0,225 \pm 0,05$ UA) e ESM ($0,364 \pm 0,05$ UA) quando comparados aos grupos controles com e sem tratamento ($0,355 \pm 0,06$ UA e $0,538 \pm 0,10$ UA) respectivamente e redução proteica no grupo ESM+Rapamicina ($0,225 \pm 0,05$ UA) quando comparado ao grupo ESM ($0,364 \pm 0,05$ UA) além de redução nos níveis do grupo Sham+Rapamicina ($0,355 \pm 0,06$ UA) quando comparados ao grupo controle, Sham ($0,538 \pm 0,10$ UA). No período de 72 horas foi encontrada redução significativa nos níveis de Rictor em todos os grupos submetidos ao estímulo séptico com e sem tratamento com Rapamicina ESM+Rapamicina ($0,265 \pm 0,16$ UA) e ESM ($0,312 \pm 0,07$ UA) e grupo Sham+Rapamicina ($0,289 \pm 0,10$ UA) quando comparados ao grupo Sham ($0,565 \pm 0,23$ UA).

Figura 3.2. Análise do perfil de expressão proteica de Rictor por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado com ou sem tratamento com inibidor de mTOR (Rapamicina). Houve redução significativa nos níveis de Rictor no miocárdio dos animais submetidos à sepse moderada com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparados aos grupos submetido à falsa cirurgia com e sem tratamento (Sham+Rapamicina e Sham) e ao grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM). Também houve redução significativa nos níveis de Rictor no grupo submetido ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparado ao grupo submetido à falsa cirurgia sem tratamento (Sham) no período de 24 horas (A). 48 horas (B) após a cirurgia, foi encontrada redução nos níveis protéicos de Rictor no miocárdio dos animais submetidos à falsa cirurgia com tratamento (Sham+Rapamicina) quando comparados ao grupo submetido à falsa cirurgia sem tratamento (Sham), redução nos níveis protéicos de Rictor nos animais submetidos ao estímulo séptico moderado sem tratamento (ESM) quando comparados ao grupo submetido à falsa cirurgia sem tratamento (Sham) e redução nos níveis protéicos no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado com tratamento (ESM+Rapamicina) quando comparados aos demais grupos do estudo (Sham, Sham+Rapamicina e ESM). No período de 72 horas (C) houve redução significativa nos níveis de Rictor no miocárdio dos animais dos grupos submetidos ao estímulo séptico moderado com e sem tratamento (ESM+Rapamicina e ESM) e no grupo submetido à falsa cirurgia com tratamento (Sham+Rapamicina) quando comparados ao grupo submetido à falsa cirurgia sem tratamento (Sham). Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

5.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL - ECOCARDIOGRAFIA

A análise ecocardiográfica para função sistólica (DC, FEj e FE) e frequência cardíaca (FC) foi realizada nos animais dos grupos controle com e sem tratamento e submetidos à sepse moderada com e sem tratamento 24 e 72 horas pós estímulo séptico.

Os dados referentes aos achados ecocardiográficos dos grupos experimentais 24 e 72 horas pós o estímulo séptico estão resumidos a seguir nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Parâmetros ecocardiográficos dos grupos controle sem e com tratamento e estímulo séptico moderado sem e com tratamento com Rapamicina no período de 24 horas pós CLP.

Parâmetros 24h	Sham	Sham+RP	ESM	ESM+RP
Frequência cardíaca (bpm)	685,5	574,9	458,2	464,7
Fração de Ejeção (FEj) %	62,5±4,4	67,2±5,4	73±5,8	65,7±4,8
Fração de Encurtamento (FE) %	33,4±3,1	37,6±4,3	42,4±5,1*	36,3±3,6
Débito Cardíaco (DC) mL/min	19±1,9	14,7±0,8	10±1,4*	13,8±1,5
Diâmetro interno VE diástole	3,36±0,1	3,42±0,2	3,16±0,1	3,29±0,1
Diâmetro interno VE sístole	2,26±0,2	2,18±0,2	1,91±0,1	2,10±0,1
Parede livre VE diástole	0,90±0,09	1,10±0,07	0,79±0,04	0,86±0,05
Parede livre VE sístole	1,05±0,08	1,32±0,05	1,15±0,1	1,23±0,07

Os dados são a média+desvio padrão. FEj, fração de ejeção; FE, fração de encurtamento; DC, débito cardíaco; VE, Ventrículo Esquerdo; bpm, batimentos/min, *p<0.05.

Tabela 2. Parâmetros ecocardiográficos dos grupos controle sem e com tratamento e estímulo séptico moderado sem e com tratamento com Rapamicina no período de 72 horas pós CLP.

Parâmetros 72h	Sham	Sham+RP	ESM	ESM+RP
Frequência cardíaca (bpm)	685,5	471,3	408*	471,3
Fração de Ejeção (FEj) %	62,5±4,4	61±3,7	51,7±1,8*	58,4±6,7
Fração de Encurtamento (FE) %	33,4±3,1	34,5±1,3	28,4±3	28,9±3,8
Débito Cardíaco (DC) mL/min	19±1,9	14,3±2,9	10,4±1,2*	11,3±1,2*
Diâmetro interno VE diástole	3,36±0,1	3,48±0,1	2,97±0,1	3,19±0,1
Diâmetro interno VE sístole	2,26±0,2	2,34±0,07	1,94±0,2	2,22±0,1
Parede livre VE diástole	0,90±0,09	0,89±0,06	0,84±0,05	0,81±0,05
Parede livre VE sístole	1,05±0,08	1,27±0,07	1,13±0,1	1,09±0,06

Os dados são a média+desvio padrão. FEj, fração de ejeção; FE, fração de encurtamento; DC, débito cardíaco; VE, Ventrículo Esquerdo; bpm, batimentos/min, *p<0.05.

Débito Cardíaco

Na figura 4.1 Observa-se redução do DC nos grupos sépticos sem tratamento quando comparados ao controle 24h ($10 \pm 1,4$ vs. $19,03 \pm 1,9$) e 72h ($10,4 \pm 1,2$ vs. $19,03 \pm 1,9$) e no grupo séptico com tratamento quando comparado ao controle 72h ($11,35 \pm 1,2$ vs. $19,03 \pm 1,9$).

Figura 4.1 Análise ecocardiográfica do débito cardíaco nos animais controle com e sem tratamento com Rapamicina e submetidos à sepse moderada com e sem tratamento com Rapamicina. Observa-se uma redução do DC 24 e 72 horas pós CLP no grupo ESM e redução do DC no grupo ESM+RAPA 72 horas pós CLP.

Fração de Ejeção

Na figura 4.2 Observa-se uma redução da FEj 72 horas pós CLP no grupo ESM quando comparado ao seu período anterior ($51,7 \pm 1,8$ vs. $73,01 \pm 5,8$).

Figura 4.2 Análise ecocardiográfica da fração de ejeção nos animais controle com e sem tratamento com Rapamicina e submetidos à sepse moderada com e sem tratamento com Rapamicina. Observa-se uma redução da FEj 72 horas pós CLP no grupo ESM quando comparado ao seu período anterior.

Fração de Encurtamento

Na figura 4.3 Observa-se um aumento da FE 24h pós CLP no grupo ESM quando comparado ao grupo controle 24h ($42,4 \pm 5,1$ vs. $33,4 \pm 3,1$).

Figura 4.3 Análise ecocardiográfica da fração de encurtamento nos animais controle com e sem tratamento com Rapamicina e submetidos à sepse moderada com e sem tratamento com Rapamicina. Observa-se um aumento da FE 24 horas pós CLP no grupo ESM quando comparado ao grupo controle.

Frequência Cardíaca

A frequência cardíaca (FC) durante o exame de ecocardiografia reduziu significativamente no grupo ESM 72h pós-estímulo séptico quando comparado ao controle ($408,7 \pm 25,0$ vs. $685,5 \pm 94,9$), Figura 4.4.

Figura 4.4 Análise da frequência cardíaca dos animais controle com e sem tratamento com Rapamicina e submetidos à sepse moderada com e sem tratamento com Rapamicina. Observa-se uma redução da FC 72 horas pós CLP no grupo ESM quando comparado ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO

A rede de sinalização mTOR geralmente promove processos anabólicos, mas inibe os catabólicos. Assim, a ativação da mTOR estimula a biogênese dos ribossomos, síntese de proteínas e a entrada de nutrientes nas células, que em conjunto resultam em um aumento do metabolismo, crescimento e proliferação celular (Wullschleger *et al.*, 2006). A ativação de mTOR também inibe a via da autofagia, sensível ao estresse e a degradação proteica. Em contrapartida, a inibição de mTOR por restrição nutricional, estresse ou agentes farmacológicos, como a rapamicina, faz o oposto - retarda a síntese de proteínas, crescimento celular e proliferação; aumenta a transcrição sensível ao estresse e estimula a autofagia (Zhang, Bokov, *et al.*, 2014).

A generalidade dos efeitos da inibição da via mTOR na sobrevida combinada ao fato de que a rapamicina já está aprovada para uso humano, levanta a tentadora perspectiva de que a rapamicina pode prolongar a vida humana. No entanto, a associação do aumento da vida sem o aumento simultâneo da saúde é uma tarefa errante, visto que ainda não possuem estudos que associem os efeitos na sobrevida ao tratamento com rapamicina com os efeitos na saúde de animais e humanos. Algumas evidências sugerem que a rapamicina pode ter efeitos protetores contra múltiplos processos degenerativos. Por exemplo, por causa de seus efeitos antiproliferativos, atualmente está sendo investigada sua eficácia terapêutica contra vários tipos de câncer humano e doenças vasculares (Adelman, 2010; Heng, 2011). Em modelos de estudo com camundongos, provou-se ser uma terapêutica bem sucedida em retardar o início da patologia de Alzheimer (Caccamo *et al.*, 2010; Spilman *et al.*, 2010), na redução da incidência de câncer (Anisimov *et al.*, 2011), na inibição do desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Pakala *et al.*, 2005), no aumento da resposta da vacina em ratos idosos (Chen *et al.*, 2009), e ao atrasar o declínio cognitivo normal, relacionado à idade (Majumder *et al.*, 2012). Por outro lado, a rapamicina poderia ter efeitos deletérios sobre alguns aspectos da saúde.

Devido à inibição da síntese proteica, processos celulares como crescimento, reparo tecidual e regeneração, podem ser comprometidos pela administração crônica de rapamicina. Assim, alguns estudos de roedores observaram que a inibição da mTOR retarda a recuperação do músculo esquelético (Dickinson *et al.*, 2011) ou do músculo cardíaco pós lesão (Aoyagi *et al.*, 2012). Além disso, a rapamicina foi relatada como fator

negativo à potencialização neuronal a longo prazo e na consolidação da memória (Parsons *et al.*, 2006; Stoica *et al.*, 2011). Ademais, tanto estudos humanos quanto em roedores associaram a inibição de mTOR à resistência à insulina (Larsen *et al.*, 2006).

No presente estudo foi observada manutenção da taxa de sobrevivência próxima a 100% até o período de 36 horas pós-estímulo séptico (período em que a ação do medicamento rapamicina está começando a perder o efeito). Após esse período a sobrevivência começou a reduzir em todos os grupos, com maior evidência para o grupo que recebeu o tratamento pré-cirúrgico, demonstrando que a recuperação foi deficitária nos animais tratados com rapamicina quando comparados ao grupo séptico sem tratamento.

Podemos verificar o aumento da extensão de lesões cardíacas nos animais que receberam o tratamento com rapamicina quando analisamos as imagens de metacrilato. Encontramos aumento da miocitólise, edema celular e bandas de contratura quando comparamos aos animais sépticos sem tratamento, o que é sugestivo de redução do reparo celular causado pela inibição da via mTOR. Dado confirmado através da análise qualitativa e quantitativa de colágeno por meio da análise dos corações com a coloração picrosírius red e western blot onde foi observado o aumento na expressão de colágeno nos corações dos animais que foram submetidos ao estímulo séptico e tratados com rapamicina quando comparados ao grupo séptico sem tratamento.

O parênquima cardíaco, uma fusão de cardiomiócitos, é organizado em uma rede de proteínas estruturais, composta principalmente de colágeno fibrilar tipo 1A, que possui resistência à tração (Celes *et al.*, 2013). O papel mecânico da matriz é fornecer uma estrutura para o alinhamento da miofibra, que a protege contra o excesso de tração do sarcômero. Além disso, a matriz tem papéis igualmente cruciais, que são parte integrante do comportamento funcional e elétrico do miocárdio. Portanto, a matriz desempenha um papel fundamental na eficiência da função cardíaca (Weber *et al.*, 2013).

As lesões na arquitetura miocárdica levam à incorporação de colágeno fibrilar de tipo 1A rígido e reticulado, atuando como uma fibrose "reparadora" substituindo os cardiomiócitos perdidos e preservando a integridade estrutural deste órgão (Ahokas *et al.*, 2003; Gerling *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2012). No coração lesionado, a ativação de fibroblastos ocasiona a diferenciação desses em miofibroblastos, o que altera a reatividade vasomotora (Coen *et al.*, 2011) aproximando cardiomiócitos vizinhos através da deposição de tecido fibroso causando a sua atrofia.

Além de gerar tecido fibroso denso, os miofibroblastos também exercem efeitos adversos sobre lesões cardíacas. A associação entre dois tipos diferentes de células (miofibroblastos e cardiomiócitos) poderia influenciar negativamente o comportamento elétrico do músculo cardíaco, predispondo-o a arritmias (Rosker *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2011).

Foi realizada a quantificação da expressão gênica de mTOR para confirmar se o tratamento realmente surtiu efeito na inibição da via de sinalização e encontramos aumento da expressão gênica para mTOR no grupo ESM 24h e 72h pós CLP demonstrando a necessidade da produção dessa proteína durante a sepse possivelmente devido à redução da atividade proteica no tecido cardíaco. Não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com rapamicina demonstrando que a droga possivelmente inibe o aumento gênico de mTOR, o que não ocasionaria alterações teciduais da proteína.

A sepse inibe a síntese de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas preferencialmente em músculos compostos por fibras rápidas, por exemplo, gastrocnêmio (Vary e Kimball, 1992; Lang *et al.*, 2007). No entanto, se o insulto infeccioso tiver uma gravidade suficiente, como pode ser observado após a administração de uma dose relativamente grande de endotoxina lipopolissacarídeo ou de citocina pró-inflamatória, como o fator de necrose tumoral, ambos são usados para mimetizar a resposta séptica, observa-se uma diminuição generalizada da síntese de proteínas musculares independentemente da composição do tipo de fibra (Lang *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2002). Não há evidências definitivas de que a sepse reduz o número de ribossomos; portanto, a redução da taxa de síntese resulta principalmente da redução da eficiência de tradução proteica (Vary e Kimball, 1992; Lang *et al.*, 2007).

A mTOR regula a síntese proteica através da fosforilação das três isoformas do fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) de ligação à proteína (4E-BP) e as duas isoformas da proteína S6 kinase (S6K) (Ma e Blenis, 2009; Iadevaia *et al.*, 2012). Os 4E-BPs são repressores de tradução devido ao fato de que em seu estado ativo não fosforilado eles se ligam à eIF4E impedindo a interação entre eIF4E e eIF4G no final da 5' RNAm, uma interação que é necessária para o início da tradução (Albert e Hall, 2015). Quando o mTORC1 fosforila o 4E-BP1, este dissocia-se do EiF4E, o que resulta no início da tradução. Por outro lado, a fosforilação do S6K pelo mTORC1 aumenta o início da

tradução e alongação através da modulação da atividade de múltiplos fatores que participam no processo de tradução. O aumento da atividade da p70S6K (S6K1) e p54 S6K (S6K2) também afeta a capacidade da síntese de proteínas através da fosforilação da S6 o que aumenta a biogênese ribossomal. Deveria ser ressaltado que o fator 4E-BP1 é parcialmente resistente à rapamicina, e por outro lado o fator S6K é eficientemente inibido pela droga (Albert e Hall, 2015).

Na inibição do complexo mTORC1 com rapamicina, a desfosforilação de seus alvos parece ser rápida. Por exemplo, a rapamicina induz rapidamente a desfosforilação de S6K1, incluindo sítios que não são fosforilados pelo mTORC1. Isso indica que o mTORC1 também pode regular a fosforilação de seus substratos, possivelmente por supressão da interação ou atividade da fosfatase com os alvos do mTORC1 (Hay e Sonenberg, 2004).

A sepse não altera a quantidade total de eIF4E celular, mas altera a sua distribuição entre complexos ativos e inativos (Lang *et al.*, 2007). Um consenso emergiu agora sobre a capacidade da sepse em alterar a formação de eIF4F. Em geral, os insultos sépticos, como os impostos pela ligadura e perfuração do ceco e a administração de LPS, diminuem a fosforilação do 4E-BP1, como evidenciado por uma redução na isoforma γ hiperfosforada ou na fosforilação do resíduo Thr37 /46 em 4E-BP1. Esta alteração está associada a uma quantidade aumentada do complexo inativo eIF4E • 4E-BP1 e uma diminuição recíproca no complexo eIF4E • eIF4G ativo (Kimball *et al.*, 2003; Lang e Frost, 2004; 2005; 2007). A redução da indução ocasionada pela sepse do complexo eIF4E • eIF4G no músculo gastrocnêmio diminui a ligação do mRNA com os ribossomos e, assim, limita a síntese proteica. Em adendo, ambos sepse e LPS, diminuem de forma coordenada a fosforilação de mTOR em Ser2481 e Ser2448 independentemente de uma alteração na proteína mTOR total em músculo esquelético (Kimball *et al.*, 2003; Lang e Frost, 2005; 2007).

No presente estudo encontramos aumento da expressão gênica para raptor no grupo ESM quando comparamos ao grupo séptico tratado com rapamicina, com relação à expressão proteica foi encontrada redução da expressão proteica nos grupos sépticos (ESM e ESM+RAPA) e no grupo SHAM+RAPA, condizentes com o efeito esperado com o tratamento com rapamicina e sobre o efeito da sepse no complexo mTORC1.

Com relação aos demais componentes do complexo mTORC1, encontramos aumento expressivo na expressão gênica para eIF4E e Rps6K no grupo ESM quando comparamos aos demais grupos. A expressão proteica de p70S6K se mostrou reduzida nos grupos sépticos até o período de 48 horas, tempo de meia vida da droga rapamicina. Ademais, a expressão proteica do fator 4E-BP1 se mostrou aumentada nos grupos sépticos, o que demonstra uma possível redução da tradução proteica durante a sepse.

Juntos nossos resultados indicam uma resposta do organismo a fim de aumentar os mecanismos responsáveis pela síntese de proteínas e assim combater o insulto infeccioso e reparar as lesões causadas pelo mesmo, como esse mecanismo está parcialmente bloqueado pela sepse ocorre o aumento da deposição de colágeno nas áreas de lesão, alterando a mecânica contrátil e elétrica dos cardiomiócitos.

A redução da atividade de mTOR bloqueia a proliferação endotelial e a angiogênese (Humar *et al.*, 2002), bem como a proliferação de células progenitoras endoteliais (Miriuka *et al.*, 2006), o que resulta na não ocorrência de reparação após lesão cardíaca. A inibição farmacológica com inibidores de mTOR e o silenciamento genético de rictor resultam em aumento dos danos causados por lesão isquêmica e estão associados ao aumento da mortalidade após infarto do miocárdio (Volkers *et al.*, 2013).

O estresse hemodinâmico leva a disfunção cardíaca em camundongos deficientes de rictor, enquanto que os animais controle que apresentam atividade de rictor normal mantiveram a função normal durante a sobrecarga de pressão induzida experimentalmente. Juntos, os resultados desses estudos indicam que o complexo mTORC2 é importante para o desempenho contrátil em condições de sobrecarga de pressão aguda (Shende *et al.*, 2016).

Os níveis de proteína rictor aumentam simultaneamente com a função cardíaca nos animais controle durante sobrecarga de pressão, esse aumento é paralelo com a fosforilação melhorada de PKCa e PKCβII. A fosforilação dos resíduos serina / treonina em cPKCs e nPKCs é necessária para a sua estabilidade, distribuição intracelular e função catalítica (Gallegos e Newton, 2008; Freeley *et al.*, 2011). Uma vez que a disfunção cardíaca ocorreu após o estresse hemodinâmico induzido, os autores concluem que PKCβII e -δ, estão implicados em defeitos funcionais em corações deficientes em rictor (Shende *et al.*, 2016).

No presente estudo encontramos aumento da expressão gênica e redução da expressão proteica para rictor nos corações sépticos tratados e não tratados com rapamicina e no grupo controle tratado, o que demonstra que a droga é capaz de inibir a ativação do complexo mTORC2.

Nossos resultados demonstram que o insulto séptico afeta o complexo mTORC2 e pode ser o papel regulador juntamente com o complexo mTORC1, da cardiomiopatia séptica e disfunção cardíaca progressiva observada durante a progressão desta doença.

Além disso, evidências genéticas mostram que a deleção de mTOR resulta em cardiomiopatia letal, totalmente penetrante e dilatada. Juntos, esses resultados demonstram o papel benéfico para o complexo mTORC2 na sobrevivência e função celular (Zhang *et al.*, 2010).

A análise funcional do nosso estudo mostra que 72h após o estímulo séptico, a fração de ejeção e o débito cardíaco sofreram redução quando comparados ao grupo controle, apesar da normalidade na fração de encurtamento, levando os animais sépticos a uma possível insuficiência cardíaca.

A disfunção cardíaca é uma manifestação reconhecida durante a sepse e o choque séptico (Rudiger e Singer, 2007). O envolvimento do coração varia de acordo com o tempo e a gravidade da síndrome. Durante a fase precoce da doença, uma FEj > 55% é indicativo de sepse, como demonstrado em uma avaliação retrospectiva de pacientes com choque na sala de emergência (Jones *et al.*, 2005). Isso pode ser explicado pelo aumento da contratilidade cardíaca devido à estimulação adrenérgica. Importante, apesar de uma alta ou estabilidade na FEj, o volume traçado neste ponto é baixo devido à pré-carga cardíaca insuficiente causada a uma alta permeabilidade vascular e baixo tônus vascular. O aumento compensatório da frequência cardíaca é frequentemente insuficiente para manter o débito cardíaco adequado durante este fase precoce da sepse, resultando na redução deste parâmetro. Outro aspecto clínico da disfunção cardíaca na sepse é a ocorrência de taquiarritmias (Leibovici *et al.*, 2007; Goodman *et al.*, 2008).

O desenvolvimento da disfunção requer algum grau de inflamação. Assim, uma disfunção cardíaca leve pode resultar de inflamação sistêmica leve e, portanto, ser um bom sinal prognóstico (Jardin *et al.*, 1999). No presente estudo não encontramos

alterações significativas na função cardíaca dos animais tratados com rapamicina, possivelmente devido à ação reguladora imunológica da droga.

Podemos inferir que a ação do medicamento ocasionou uma “pseudo melhora” da função cardíaca nos animais sépticos, ao possivelmente regular o aumento da resposta inflamatória inicial causada pela sepse, porém, do ponto de vista histopatológico, observamos alterações significativas nos corações dos animais, com aumento das lesões e deposição de colágeno o que predispôs a ocorrência de alterações eletrocardiográficas durante o exame de ecocardiografia, compatível com bloqueio de transmissão elétrica cardíaca, o que poderia levar os animais ao choque.

7. CONCLUSÃO

Juntos, nossos resultados demonstram que a disfunção cardíaca observada na sepse é possivelmente associada a alterações na expressão da via de sinalização mTOR.

Uma vez que a inibição desta via nos corações dos animais sépticos levou à ocorrência de aumento nas lesões teciduais difusas com aumento na deposição de colágeno tipo 1A.

Adicionalmente, houve redução nas proteínas responsáveis pela síntese proteica do complexo mTORC1 juntamente com redução da proteína reguladora do complexo mTORC2, responsável pela organização do citoesqueleto, o que poderia ser a base para as alterações funcionais encontradas nos animais sépticos.

REFERÊNCIAS

- ADELMAN, S. J. Sirolimus and its analogs and its effects on vascular diseases. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 36, p. 4002-11, 2010. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ADIB-CONQUY, M.; CAVAILLON, J. M. [Host inflammatory and anti-inflammatory response during sepsis]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 60, n. 5, p. 306-13, Oct 2012. ISSN 0369-8114. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2012.03.011> >.
- AHOKAS, R. A. et al. Aldosteronism and peripheral blood mononuclear cell activation: a neuroendocrine-immune interface. **Circ Res**, v. 93, n. 10, p. e124-35, Nov 14 2003. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.0000102404.81461.25> >.
- ALBERT, V.; HALL, M. N. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. **Curr Opin Cell Biol**, v. 33, p. 55-66, Apr 2015. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.001> >.
- AMMANN, P. et al. Elevation of troponin I in sepsis and septic shock. **Intensive Care Med**, v. 27, n. 6, p. 965-9, Jun 2001. ISSN 0342-4642 (Print)0342-4642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ANISIMOV, V. N. et al. Rapamycin increases lifespan and inhibits spontaneous tumorigenesis in inbred female mice. **Cell Cycle**, v. 10, n. 24, p. 4230-6, Dec 15 2011. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.24.18486> >.
- AOYAGI, T. et al. Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 303, n. 1, p. H75-85, Jul 2012. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00241.2012> >.
- ARLATI, S. et al. Myocardial necrosis in ICU patients with acute non-cardiac disease: a prospective study. **Intensive Care Med**, v. 26, n. 1, p. 31-7, Jan 2000. ISSN 0342-4642 (Print)0342-4642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- ASTIZ, M. E.; RACKOW, E. C. Septic shock. **Lancet**, v. 351, n. 9114, p. 1501-5, May 16 1998. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)01134-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(98)01134-9) >.
- BAYSTON, K. F.; COHEN, J. Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. **J Med Microbiol**, v. 31, n. 2, p. 73-83, Feb 1990. ISSN 0022-2615 (Print)0022-2615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-31-2-73> >.
- BELTRAN, L. et al. Calpain interacts with class IA phosphoinositide 3-kinases regulating their stability and signaling activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 39, p. 16217-22, Sep 27 2011. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1107692108> >.

BENTZER, P.; RUSSELL, J. A.; WALLEY, K. R. Advances in Sepsis Research. **Clin Chest Med**, v. 36, n. 3, p. 521-30, Sep 2015. ISSN 0272-5231. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2015.05.009> >.

BERRY, C. et al. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 6, p. H2337-65, Dec 2001. ISSN 0363-6135 (Print)0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BODENSTEINER, J. B.; ENGEL, A. G. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. **Neurology**, v. 28, n. 5, p. 439-46, May 1978. ISSN 0028-3878 (Print)0028-3878. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-55, Jun 1992. ISSN 0012-3692 (Print)0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CACCAMO, A. et al. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. **J Biol Chem**, v. 285, n. 17, p. 13107-20, Apr 23 2010. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.100420> >.

CAMINS, A. et al. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. **Drug News Perspect**, v. 19, n. 8, p. 453-60, Oct 2006. ISSN 0214-0934 (Print)0214-0934. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1358/dnp.2006.19.8.1043961> >.

CAVAILLON, J. M. et al. Cytokine cascade in sepsis. **Scand J Infect Dis**, v. 35, n. 9, p. 535-44, 2003. ISSN 0036-5548 (Print)0036-5548. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/00365540310015935> >.

CELES, M. R. et al. Disruption of calcium homeostasis in cardiomyocytes underlies cardiac structural and functional changes in severe sepsis. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68809, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068809> >.

_____. Reduction of gap and adherens junction proteins and intercalated disc structural remodeling in the hearts of mice submitted to severe cecal ligation and puncture sepsis. **Crit Care Med**, v. 35, n. 9, p. 2176-85, Sep 2007. ISSN 0090-3493 (Print)0090-3493. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Disruption of sarcolemmal dystrophin and beta-dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. **Lab Invest**, v. 90, n. 4, p. 531-42, Apr 2010. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2010.3> >.

_____. Increased sarcolemmal permeability as an early event in experimental septic cardiomyopathy: a potential role for oxidative damage to lipids and proteins. **Shock**, v. 33, n. 3, p. 322-31, Mar 2010. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181b38ef6> >.

CEYLAN-ISIK, A. F. et al. Cardiac overexpression of metallothionein rescues cardiac contractile dysfunction and endoplasmic reticulum stress but not autophagy in sepsis. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 2, p. 367-78, Feb 2010. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.11.003> >.

CHEN, C.; LIU, Y.; ZHENG, P. mTOR regulation and therapeutic rejuvenation of aging hematopoietic stem cells. **Sci Signal**, v. 2, n. 98, p. ra75, Nov 24 2009. ISSN 1945-0877. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2000559> >.

CHONG, Z. Z. et al. Mammalian target of rapamycin: hitting the bull's-eye for neurological disorders. **Oxid Med Cell Longev**, v. 3, n. 6, p. 374-91, Nov-Dec 2010. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COALSON, J. J. et al. Pathophysiologic responses of the subhuman primate in experimental septic shock. **Lab Invest**, v. 32, n. 4, p. 561-9, Apr 1975. ISSN 0023-6837 (Print)0023-6837. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COEN, M.; GABBIANI, G.; BOCHATON-PIALLAT, M. L. Myofibroblast-mediated adventitial remodeling: an underestimated player in arterial pathology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 11, p. 2391-6, Nov 2011. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.111.231548> >.

CORDIER, L. et al. Rescue of skeletal muscles of gamma-sarcoglycan-deficient mice with adeno-associated virus-mediated gene transfer. **Mol Ther**, v. 1, n. 2, p. 119-29, Feb 2000. ISSN 1525-0016 (Print)1525-0016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/mthe.1999.0019> >.

CUZZOCREA, S. et al. Calpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation. **Am J Pathol**, v. 157, n. 6, p. 2065-79, Dec 2000. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64845-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64845-6) >.

D'AMORE, P. A. et al. Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. **Ann Neurol**, v. 35, n. 3, p. 362-5, Mar 1994. ISSN 0364-5134 (Print)0364-5134. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410350320> >.

DANIALOU, G. et al. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. **Faseb j**, v. 15, n. 9, p. 1655-7, Jul 2001. ISSN 0892-6638 (Print)0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DAYTON, W. R. et al. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. **Biochemistry**, v. 15, n. 10, p. 2150-8, May 18 1976. ISSN 0006-2960 (Print)0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DE ALMEIDA, D. R. et al. [I Guidelines of the Brazilian Cardiology Society for Heart Transplantation: V. Complication after heart transplantation]. **Arq Bras Cardiol**, v. 73 Suppl 5, p. 27-37, Sep 1999. ISSN 0066-782X (Print)0066-782x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DICKINSON, J. M. et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 activation is required for the stimulation of human skeletal muscle protein synthesis by essential amino acids. **J Nutr**, v. 141, n. 5, p. 856-62, May 2011. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3945/jn.111.139485> >.

EL-HASHEMITE, N. et al. Loss of Tsc1 or Tsc2 induces vascular endothelial growth factor production through mammalian target of rapamycin. **Cancer Res**, v. 63, n. 17, p. 5173-7, Sep 01 2003. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FOLDES, G. et al. Modulation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte growth: a testbed for studying human cardiac hypertrophy? **J Mol Cell Cardiol**, v. 50, n. 2, p. 367-76, Feb 2011. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.029> >.

FREELEY, M.; KELLEHER, D.; LONG, A. Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. **Cell Signal**, v. 23, n. 5, p. 753-62, May 2011. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.013> >.

GAIESKI, D. F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Crit Care Med**, v. 41, n. 5, p. 1167-74, May 2013. ISSN 0090-3493. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e31827c09f8> >.

GALLEGOS, L. L.; NEWTON, A. C. Spatiotemporal dynamics of lipid signaling: protein kinase C as a paradigm. **IUBMB Life**, v. 60, n. 12, p. 782-9, Dec 2008. ISSN 1521-6543. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/iub.122> >.

GALVAGNI, F.; CANTINI, M.; OLIVIERO, S. The utrophin gene is transcriptionally up-regulated in regenerating muscle. **J Biol Chem**, v. 277, n. 21, p. 19106-13, May 24 2002. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109642200> >.

GALVEZ, A. S. et al. Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. **Circ Res**, v. 100, n. 7, p. 1071-8, Apr 13 2007. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.0000261938.28365.11> >.

GANGLOFF, Y. G. et al. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 21, p. 9508-

16, Nov 2004. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1128/mcb.24.21.9508-9516.2004> >.

GERLING, I. C. et al. Aldosteronism: an immunostimulatory state precedes proinflammatory/fibrogenic cardiac phenotype. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 285, n. 2, p. H813-21, Aug 2003. ISSN 0363-6135 (Print)0363-6135. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00113.2003> >.

GILLIS, J. M. Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. **Acta Physiol Scand**, v. 156, n. 3, p. 397-406, Mar 1996. ISSN 0001-6772 (Print)0001-6772. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-201X.1996.201000.x> >.

GODDARD, C. M. et al. Myocardial morphometric changes related to decreased contractility after endotoxin. **Am J Physiol**, v. 270, n. 4 Pt 2, p. H1446-52, Apr 1996. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOLL, D. E. et al. The calpain system. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 731-801, Jul 2003. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00029.2002> >.

GOODMAN, S.; WEISS, Y.; WEISSMAN, C. Update on cardiac arrhythmias in the ICU. **Curr Opin Crit Care**, v. 14, n. 5, p. 549-54, Oct 2008. ISSN 1070-5295. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1097/MCC.0b013e32830a4c5d> >.

GOTLOIB, L. et al. Loss of microvascular negative charges accompanied by interstitial edema in septic rats' heart. **Circ Shock**, v. 36, n. 1, p. 45-56, Jan 1992. ISSN 0092-6213 (Print)0092-6213. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GUBA, M. et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. **Nat Med**, v. 8, n. 2, p. 128-35, Feb 2002. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm0202-128> >.

GUROFF, G. A NEUTRAL, CALCIUM-ACTIVATED PROTEINASE FROM THE SOLUBLE FRACTION OF RAT BRAIN. **J Biol Chem**, v. 239, p. 149-55, Jan 1964. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HARRIS, T. E.; LAWRENCE, J. C., JR. TOR signaling. **Sci STKE**, v. 2003, n. 212, p. re15, Dec 09 2003. ISSN 1525-8882. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/stke.2122003re15> >.

HARRISON, D. G. et al. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. In: (Ed.). **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**. England, v.4, 2003. p.51-61. ISBN 1470-3203 (Print)1470-3203 (Linking).

- HARRISON, D. G.; MARVAR, P. J.; TITZE, J. M. Vascular inflammatory cells in hypertension. **Front Physiol**, v. 3, p. 128, 2012. ISSN 1664-042x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2012.00128> >.
- HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**, v. 18, n. 16, p. 1926-45, Aug 15 2004. ISSN 0890-9369 (Print)0890-9369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1212704> >.
- HEIN, S. et al. The role of the cytoskeleton in heart failure. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 2, p. 273-8, Jan 14 2000. ISSN 0008-6363 (Print)0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- HENG, D. Y. Combination therapy in metastatic renal cell carcinoma. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 7, p. 613-4, Jul 2011. ISSN 1470-2045. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(11\)70146-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(11)70146-2) >.
- HERNANDEZ, G. et al. A novel cardioprotective p38-MAPK/mTOR pathway. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 20, p. 2938-49, Dec 10 2011. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.09.011> >.
- HERSCH, M. et al. Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. **Surgery**, v. 107, n. 4, p. 397-410, Apr 1990. ISSN 0039-6060 (Print)0039-6060. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- HEYDEMANN, A.; MCNALLY, E. M. Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy. **Trends Cardiovasc Med**, v. 17, n. 2, p. 55-9, Feb 2007. ISSN 1050-1738 (Print)1050-1738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2006.12.002> >.
- HUANG, J.; FORSBERG, N. E. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 21, p. 12100-5, Oct 13 1998. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- HUANG, Y.; WANG, K. K. The calpain family and human disease. **Trends Mol Med**, v. 7, n. 8, p. 355-62, Aug 2001. ISSN 1471-4914 (Print)1471-4914. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- HUMAR, R. et al. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. **Faseb j**, v. 16, n. 8, p. 771-80, Jun 2002. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0658com> >.
- HWANG, S. K.; KIM, H. H. The functions of mTOR in ischemic diseases. **BMB Rep**, v. 44, n. 8, p. 506-11, Aug 2011. ISSN 1976-6696. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

- IADEVAIA, V. et al. Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis. **Biochem Soc Trans**, v. 40, n. 1, p. 168-72, Feb 2012. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1042/bst20110682> >.
- IJIMA, Y. et al. c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. **J Biol Chem**, v. 277, n. 25, p. 23065-75, Jun 21 2002. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M200328200> >.
- JARDIN, F. et al. Persistent preload defect in severe sepsis despite fluid loading: A longitudinal echocardiographic study in patients with septic shock. **Chest**, v. 116, n. 5, p. 1354-9, Nov 1999. ISSN 0012-3692 (Print)0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- JONES, A. E. et al. Diagnostic accuracy of left ventricular function for identifying sepsis among emergency department patients with nontraumatic symptomatic undifferentiated hypotension. **Shock**, v. 24, n. 6, p. 513-7, Dec 2005. ISSN 1073-2322 (Print)1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- KAYE, D. et al. Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro. **J Clin Invest**, v. 97, n. 2, p. 281-91, Jan 15 1996. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci118414> >.
- KAZI, A. A. et al. Sepsis-induced alterations in protein-protein interactions within mTOR complex 1 and the modulating effect of leucine on muscle protein synthesis. **Shock**, v. 35, n. 2, p. 117-25, Feb 2011. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181ecb57c> >.
- KIMBALL, S. R. et al. Endotoxin induces differential regulation of mTOR-dependent signaling in skeletal muscle and liver of neonatal pigs. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 3, p. E637-44, Sep 2003. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00340.2002> >.
- KOSTIN, S. et al. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. **Heart Fail Rev**, v. 5, n. 3, p. 271-80, Oct 2000. ISSN 1382-4147 (Print)1382-4147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/a:1009813621103> >.
- KRISHNAGOPALAN, S.; KUMAR, A.; PARRILLO, J. E. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. **Curr Opin Crit Care**, v. 8, n. 5, p. 376-88, Oct 2002. ISSN 1070-5295 (Print)1070-5295. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- LAJOIE, C. et al. Infarct size is increased in female post-MI rats treated with rapamycin. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 87, n. 6, p. 460-70, Jun 2009. ISSN 0008-4212. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/y09-031> >.

LANG, C. H.; FROST, R. A. Differential effect of sepsis on ability of leucine and IGF-I to stimulate muscle translation initiation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, n. 4, p. E721-30, Oct 2004. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00132.2004> >.

_____. Endotoxin disrupts the leucine-signaling pathway involving phosphorylation of mTOR, 4E-BP1, and S6K1 in skeletal muscle. **J Cell Physiol**, v. 203, n. 1, p. 144-55, Apr 2005. ISSN 0021-9541 (Print)0021-9541. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20207> >.

_____. Sepsis-induced suppression of skeletal muscle translation initiation mediated by tumor necrosis factor alpha. **Metabolism**, v. 56, n. 1, p. 49-57, Jan 2007. ISSN 0026-0495 (Print)0026-0495. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2006.08.025> >.

LANG, C. H. et al. Endotoxin-induced decrease in muscle protein synthesis is associated with changes in eIF2B, eIF4E, and IGF-I. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 278, n. 6, p. E1133-43, Jun 2000. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. TNF-alpha impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 282, n. 2, p. E336-47, Feb 2002. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00366.2001> >.

LANG, C. H.; FROST, R. A.; VARY, T. C. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 2, p. E453-9, Aug 2007. ISSN 0193-1849 (Print)0193-1849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2007> >.

LAPIDOS, K. A.; KAKKAR, R.; MCNALLY, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. **Circ Res**, v. 94, n. 8, p. 1023-31, Apr 30 2004. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.0000126574.61061.25> >.

LARSEN, J. L. et al. Tacrolimus and sirolimus cause insulin resistance in normal sprague dawley rats. **Transplantation**, v. 82, n. 4, p. 466-70, Aug 27 2006. ISSN 0041-1337 (Print)0041-1337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000229384.22217.15> >.

LEE, D. F. et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 440-55, Aug 10 2007. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.058> >.

LEIBOVICI, L. et al. Relative tachycardia in patients with sepsis: an independent risk factor for mortality. **Qjm**, v. 100, n. 10, p. 629-34, Oct 2007. ISSN 1460-2725 (Print)1460-2393. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/qjmed/hcm074> >.

LEMAITRE, V.; DABO, A. J.; D'ARMIENTO, J. Cigarette smoke components induce matrix metalloproteinase-1 in aortic endothelial cells through inhibition of mTOR signaling. **Toxicol**

Sci, v. 123, n. 2, p. 542-9, Oct 2011. ISSN 1096-0929. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr181> >.

LORNE, E. et al. Participation of mammalian target of rapamycin complex 1 in Toll-like receptor 2- and 4-induced neutrophil activation and acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 41, n. 2, p. 237-45, Aug 2009. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2008-0290OC> >.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 307-18, May 2009. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2672> >.

MAASS, D. L. et al. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. **Shock**, v. 17, n. 4, p. 293-9, Apr 2002. ISSN 1073-2322 (Print)1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MAIESE, K. et al. FoxO proteins: cunning concepts and considerations for the cardiovascular system. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 3, p. 191-203, Feb 2009. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1042/cs20080113> >.

MAJUMDER, S. et al. Lifelong rapamycin administration ameliorates age-dependent cognitive deficits by reducing IL-1beta and enhancing NMDA signaling. **Aging Cell**, v. 11, n. 2, p. 326-35, Apr 2012. ISSN 1474-9718. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00791.x> >.

MANDEGAR, M.; REMILLARD, C. V.; YUAN, J. X. Ion channels in pulmonary arterial hypertension. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 45, n. 2, p. 81-114, Sep-Oct 2002. ISSN 0033-0620 (Print)0033-0620. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MANI, S. K. et al. Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 5, p. H1744-51, Nov 2009. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00338.2009> >.

MAURIZ, J. L. et al. Caspase inhibition does not protect against liver damage in hemorrhagic shock. **Shock**, v. 19, n. 1, p. 33-7, Jan 2003. ISSN 1073-2322 (Print)1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MCDONALD, M. C. et al. Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. **Faseb j**, v. 15, n. 1, p. 171-186, Jan 2001. ISSN 0892-6638 (Print)0892-6638. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1096/fj.99-0645com> >.

MEHTA, N. J. et al. Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. **Int J Cardiol**, v. 95, n. 1, p. 13-7, May 2004. ISSN 0167-5273 (Print)0167-5273. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2003.02.005> >.

MIRIUKA, S. G. et al. mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death. **Am J Transplant**, v. 6, n. 9, p. 2069-79, Sep 2006. ISSN 1600-6135 (Print)1600-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01433.x> >.

MULLER, A. L.; DHALLA, N. S. Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. **Heart Fail Rev**, v. 17, n. 3, p. 395-409, May 2012. ISSN 1382-4147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10741-011-9269-8> >.

MURAKAMI, M. et al. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 15, p. 6710-8, Aug 2004. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.24.15.6710-6718.2004> >.

PAKALA, R. et al. Rapamycin attenuates atherosclerotic plaque progression in apolipoprotein E knockout mice: inhibitory effect on monocyte chemotaxis. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 46, n. 4, p. 481-6, Oct 2005. ISSN 0160-2446 (Print)0160-2446. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PARKER, M. M. et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Ann Intern Med**, v. 100, n. 4, p. 483-90, Apr 1984. ISSN 0003-4819 (Print)0003-4819. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PARRILLO, J. E. et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann Intern Med**, v. 113, n. 3, p. 227-42, Aug 01 1990. ISSN 0003-4819 (Print)0003-4819. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PARSONS, R. G.; GAFFORD, G. M.; HELMSTETTER, F. J. Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. **J Neurosci**, v. 26, n. 50, p. 12977-83, Dec 13 2006. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4209-06.2006> >.

PETERSON, T. R. et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 873-86, May 29 2009. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046> >.

PIPER, R. D. et al. Structure-function relationships in the septic rat heart. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, n. 5, p. 1473-82, Nov 1997. ISSN 1073-449X (Print)1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.156.5.96-10085> >.

POWERS, F. M. et al. Cardiac myofilament protein function is altered during sepsis. **J Mol Cell Cardiol**, v. 30, n. 5, p. 967-78, May 1998. ISSN 0022-2828 (Print)0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/jmcc.1998.0661> >.

REN, J.; WU, S. A burning issue: do sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS) directly contribute to cardiac dysfunction? **Front Biosci**, v. 11, p. 15-22, Jan 1 2006. ISSN 1093-9946 (Print)1093-4715. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ROSALKI, S. B. Serum enzymes in disease of skeletal muscle. **Clin Lab Med**, v. 9, n. 4, p. 767-81, Dec 1989. ISSN 0272-2712 (Print)0272-2712. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ROSKER, C. et al. Abolishing myofibroblast arrhythmogenicity by pharmacological ablation of alpha-smooth muscle actin containing stress fibers. **Circ Res**, v. 109, n. 10, p. 1120-31, Oct 28 2011. ISSN 0009-7330. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.111.244798> >.

ROSSI, M. A. et al. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. **Shock**, v. 27, n. 1, p. 10-8, Jan 2007. ISSN 1073-2322 (Print)1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.shk.0000235141.05528.47> >.

RUDIGER, A.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. **Crit Care Med**, v. 35, n. 6, p. 1599-608, Jun 2007. ISSN 0090-3493 (Print)0090-3493. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.ccm.0000266683.64081.02> >.

SARBASSOV, D. D. et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol**, v. 14, n. 14, p. 1296-302, Jul 27 2004. ISSN 0960-9822 (Print)0960-9822. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054> >.

_____. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098-101, Feb 18 2005. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1106148> >.

SCHLAG, G. et al. Hyperdynamic sepsis in baboons: II. Relation of organ damage to severity of sepsis evaluated by a newly developed morphological scoring system. **Circ Shock**, v. 38, n. 4, p. 253-63, Dec 1992. ISSN 0092-6213 (Print)0092-6213. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SEQUEIRA, V. et al. The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. **Biochim Biophys Acta**, v. 1838, n. 2, p. 700-22, Feb 2014. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.011> >.

SEYMOUR, C. W.; ROSENGART, M. R. Septic Shock: Advances in Diagnosis and Treatment. **Jama**, v. 314, n. 7, p. 708-17, Aug 18 2015. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2015.7885> >.

SHENDE, P. et al. Cardiac mTOR complex 2 preserves ventricular function in pressure-overload hypertrophy. **Cardiovasc Res**, v. 109, n. 1, p. 103-14, Jan 1 2016. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvv252> >.

SHIOI, T. et al. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 8, p. 2799-809, Apr 2002. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circulation**, v. 107, n. 12, p. 1664-70, Apr 01 2003. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.0000057979.36322.88> >.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, v. 8, n. 4, p. R251-60, Aug 2004. ISSN 1364-8535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/cc2892> >.

SMITH, I. J.; DODD, S. L. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. **Exp Physiol**, v. 92, n. 3, p. 561-73, May 2007. ISSN 0958-0670 (Print)0958-0670. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2006.035790> >.

SNELL, R. J.; PARRILLO, J. E. Cardiovascular dysfunction in septic shock. **Chest**, v. 99, n. 4, p. 1000-9, Apr 1991. ISSN 0012-3692 (Print)0012-3692. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SORIMACHI, H.; HATA, S.; ONO, Y. Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 87, n. 6, p. 287-327, 2011. ISSN 0386-2208. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SORIMACHI, H.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. Structure and physiological function of calpains. **Biochem J**, v. 328 (Pt 3), p. 721-32, Dec 15 1997. ISSN 0264-6021 (Print)0264-6021. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SOULARD, A.; HALL, M. N. SnapShot: mTOR signaling. **Cell**, v. 129, n. 2, p. 434, Apr 20 2007. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.010> >.

SPILMAN, P. et al. Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e9979, Apr 1 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009979> >.

STOICA, L. et al. Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 9, p. 3791-6, Mar 1 2011. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1014715108> >.

STRAUB, V. et al. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. **J Cell Biol**, v. 139, n. 2, p. 375-85, Oct 20 1997. ISSN 0021-9525 (Print)0021-9525. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TELES, J. M. et al. Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 47-52, Oct 2008. ISSN 1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/SHK.0b013e318181a128> >.

THICKETT, D. R. et al. Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 164, n. 9, p. 1601-5, Nov 01 2001. ISSN 1073-449X (Print)1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.164.9.2011071> >.

TOYO-OKA, T. et al. Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 19, p. 7381-5, May 11 2004. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401944101> >.

TURDI, S. et al. Cardiac-specific overexpression of catalase attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial contractile dysfunction: role of autophagy. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 6, p. 1327-38, Sep 15 2012. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.084> >.

TURNER, A.; TSAMITROS, M.; BELLOMO, R. Myocardial cell injury in septic shock. **Crit Care Med**, v. 27, n. 9, p. 1775-80, Sep 1999. ISSN 0090-3493 (Print)0090-3493. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VARRO, A. et al. Cardiac sarcolemmal ion channels and transporters as possible targets for antiarrhythmic and positive inotropic drugs: strategies of the past--perspectives of the future. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 20, p. 2411-27, 2004. ISSN 1381-6128 (Print)1381-6128. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VARY, T. C.; KIMBALL, S. R. Sepsis-induced changes in protein synthesis: differential effects on fast- and slow-twitch muscles. **Am J Physiol**, v. 262, n. 6 Pt 1, p. C1513-9, Jun 1992. ISSN 0002-9513 (Print)0002-9513. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VATTA, M. et al. Molecular remodelling of dystrophin in patients with end-stage cardiomyopathies and reversal in patients on assistance-device therapy. **Lancet**, v. 359, n. 9310, p. 936-41, Mar 16 2002. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)08026-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(02)08026-1) >.

VER ELST, K. M. et al. Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. **Clin Chem**, v. 46, n. 5, p. 650-7, May 2000. ISSN 0009-9147 (Print)0009-9147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

- VOLKERS, M. et al. Mechanistic target of rapamycin complex 2 protects the heart from ischemic damage. **Circulation**, v. 128, n. 19, p. 2132-44, Nov 5 2013. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1161/circulationaha.113.003638> >.
- WAGNER, C. et al. Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis. **Mol Cell Biochem**, v. 339, n. 1-2, p. 135-47, Jun 2010. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-009-0377-x> >.
- WANG, X.; PROUD, C. G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. **Physiology (Bethesda)**, v. 21, p. 362-9, Oct 2006. ISSN 1548-9213 (Print)1548-9221. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00024.2006> >.
- WEBER, K. T. et al. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. **Nat Rev Cardiol**, v. 10, n. 1, p. 15-26, Jan 2013. ISSN 1759-5002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2012.158> >.
- WHEELER, A. P.; BERNARD, G. R. Treating patients with severe sepsis. **N Engl J Med**, v. 340, n. 3, p. 207-14, Jan 21 1999. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199901213400307> >.
- WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-84, Feb 10 2006. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016> >.
- YANG, Q. et al. TSC1/TSC2 and Rheb have different effects on TORC1 and TORC2 activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 18, p. 6811-6, May 02 2006. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0602282103> >.
- YANO, K. et al. Elevated levels of placental growth factor represent an adaptive host response in sepsis. **J Exp Med**, v. 205, n. 11, p. 2623-31, Oct 27 2008. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20080398> >.
- YUE, L.; XIE, J.; NATTEL, S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. **Cardiovasc Res**, v. 89, n. 4, p. 744-53, Mar 1 2011. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvq329> >.
- ZHANG, D. et al. MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 8, p. 2805-16, Aug 2010. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci43008> >.
- ZHANG, Y. et al. Rapamycin extends life and health in C57BL/6 mice. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 69, n. 2, p. 119-30, Feb 2014. ISSN 1079-5006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/glt056> >.

_____. Ablation of Akt2 protects against lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction: role of Akt ubiquitination E3 ligase TRAF6. **J Mol Cell Cardiol**, v. 74, p. 76-87, Sep 2014. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.020> >.

ZHOU, M.; WANG, P.; CHAUDRY, I. H. Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late, hypodynamic stage of sepsis. **Shock**, v. 9, n. 5, p. 352-8, May 1998. ISSN 1073-2322 (Print)1073-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RESEARCH ARTICLE

Activation of Both the Calpain and Ubiquitin-Proteasome Systems Contributes to Septic Cardiomyopathy through Dystrophin Loss/Disruption and mTOR Inhibition

Ana Caroline Silva Freitas¹, Maria Jose Figueiredo¹, Erica Carolina Campos², Danilo Figueiredo Soave³, Simone Gusmao Ramos¹, Herbert B. Tanowitz⁴, Mara Rúbia N. Celes^{1,5*}

1 Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, **2** Department of Physiotherapy, Faculty of Physical Education, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil, **3** Department of Histology, Embryology and Cellular Biology, Federal University of Goias, Goias, Brazil, **4** Departments of Pathology and medicine, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Bronx, New York, United States of America, **5** Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goias, Goias, Brazil

* rubia.celes@gmail.com, mrubia.celes@usp.br

OPEN ACCESS

Citation: Freitas ACS, Figueiredo MJ, Campos EC, Soave DF, Ramos SG, Tanowitz HB, et al. (2016) Activation of Both the Calpain and Ubiquitin-Proteasome Systems Contributes to Septic Cardiomyopathy through Dystrophin Loss/Disruption and mTOR Inhibition. PLoS ONE 11 (11): e0166839. doi:10.1371/journal.pone.0166839

Editor: Morris Karmazyn, Western University, CANADA

Received: July 17, 2016

Accepted: November 5, 2016

Published: November 23, 2016

Copyright: © 2016 Freitas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: MRNC has received grants (07/58843-2) from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and is currently receiving a grant (303308/2013-3) from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). SGR is currently receiving grants

Abstract

Cardiac dysfunction caused by the impairment of myocardial contractility has been recognized as an important factor contributing to the high mortality in sepsis. Calpain activation in the heart takes place in response to increased intracellular calcium influx resulting in proteolysis of structural and contractile proteins with subsequent myocardial dysfunction. The purpose of the present study was to test the hypothesis that increased levels of calpain in the septic heart leads to disruption of structural and contractile proteins and that administration of calpain inhibitor-1 (N-acetyl-leuciny-l-leuciny-l-norleucinal (ALLN)) after sepsis induced by cecal ligation and puncture prevents cardiac protein degradation. We also tested the hypothesis that calpain plays a role in the modulation of protein synthesis/degradation through the activation of proteasome-dependent proteolysis and inhibition of the mTOR pathway. Severe sepsis significantly increased heart calpain-1 levels and promoted ubiquitin and Pa28 β over-expression with a reduction in the mTOR levels. In addition, sepsis reduced the expression of structural proteins dystrophin and β -dystroglycan as well as the contractile proteins actin and myosin. ALLN administration prevented sepsis-induced increases in calpain and ubiquitin levels in the heart, which resulted in decreased of structural and contractile proteins degradation and basal mTOR expression levels were re-established. Our results support the concept that increased calpain concentrations may be part of an important mechanism of sepsis-induced cardiac muscle proteolysis.

(12/23649-0, 12/17542-8) from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The concept of “septic cardiomyopathy” has been described as a complex mechanism resulting in myocardial damage and functional impairment [1–2]. One of possible underlying mechanisms are structural changes associated in the septic hearts, which may contribute to cardiac dysfunction in septic patients [3]. Recently, using an experimental sepsis model based of cecal ligation and puncture (CLP), our research group demonstrated a marked reduction in cardiac dystrophin, an important protein involved in assembling and maintaining of the link between cytoskeletal actin and the extracellular matrix [4]. The presence of heart myofilament breakdown is characterized by reduced sarcolemmal integrity associated with increased lipid peroxidation and protein nitration in septic hearts causing damage to membrane lipids and cellular proteins [5] that could result in intracellular calcium accumulation [6]. The increased calcium concentration results in activation of calpain, a calcium-dependent intracellular cysteine protease, which results in an upregulation of proteolysis of both target and non-target proteins with consequent irreversible tissue damage [7].

Excessive activation of calpain has been implicated in the pathophysiology of several disorders, including inflammation [8], ischemia-reperfusion [9], trauma [10], diabetes [11], neurodegenerative diseases [12] and myocardial dysfunction [13,14]. Increased activation of calpain results in the subsequent proteolysis of numerous membrane proteins including receptors, growth factors, adhesion molecules and ion transport proteins, enzymes; cytokines and transcription factors [15,16], proteins involved in the link between the cytoskeleton and the plasma membrane (talin, vinculin, spectrin and filamin) and most of the intermediate filament proteins (desmin and vimentin) [17,18]. Importantly, calpain proteolytic activity may eliminate the cross-linking ability of cytoskeletal proteins, especially intermediate filaments, leading to further degradation [7]. Although several cytoskeletal proteins have been identified as substrates, little is known about the molecular mechanisms of protein degradation by calpain. In general, calpains are capable in producing only limited substrate proteolysis resulting in large polypeptide fragments rather than small peptides or amino acids [7]. This limited proteolytic action of calpain has led to speculation that peptide fragments resulting from cleavage are used as substrates for the ubiquitin-proteasome system (UPS) once that system is involved in cellular protein degradation in cardiac myocytes [7,19,20].

UPS has emerged as a key regulator of numerous cellular processes since its initial description over 30 years ago. Composed by a multi-enzymatic cascade that results in the covalent attachment of small molecule ubiquitin to lysine residues within target proteins. The UPS function under normal conditions is essential for the maintenance of protein integrity that make up the sarcomere, mitochondria and the cell membrane including cardiac myocytes, to ensure normal functioning of the heart [20]. Although the UPS has been most commonly studied in the context of cancer biology, increasing evidence suggests that dysfunction of the UPS plays a role in cardiac hypertrophy, ischemia-reperfusion injury and heart failure [21]. However, to date, no study has assessed the role of the ubiquitin-proteasome system in septic cardiomyopathy.

Recent, evidence indicates that calpain plays a dual role in protein metabolism through the concomitant activation of proteasome-dependent proteolysis and inhibition of the PI3K/Akt protein synthesis pathway [22]. Furthermore, mTOR inhibition mediated by calpain could potentially reduce the overall rates of protein synthesis, reducing the available translational machinery required for the maintenance of the protein synthesis levels [15]. Although a regulatory role of the PI3K/Akt/mTOR pathway, partly dependent of calpain, has been demonstrated in cell growth and survival during serum deprivation [22], little has been elucidated

about how the PI3K/mTOR signaling pathway is modulated by calpain during cardiac dysfunction.

In rat models of organ dysfunction and circulatory failure caused by endotoxin, treatment with calpain inhibitor has been demonstrated to reduce organ injury and inflammation associated with prevention of circulatory shock and reinstatement of pressor response to noradrenaline [23]. Tissier et al. 2004 demonstrated that endotoxemic rats treated with calpain inhibitor I (ALLN) reduced plasma TNF- α and nitrite/nitrate levels and, decreased mesenteric venule leukocyte rolling and adhesion, resulting in improvement of endotoxin-induced cardiac dysfunction [24].

To the best of our knowledge, there are no reports demonstrating a relationship between the inhibition of calpain-1, UPS activation and mTOR inhibition associated with the expression of contractile and cytoskeletal proteins during sepsis-induced myocardial dysfunction. Thus, the aim of this study was to investigate the contribution of calpain-1 to the ubiquitin-proteasome system and mTOR signaling pathway modulation during septic cardiomyopathy induced by cecal ligation and puncture.

Materials and Methods

Experimental Animals

Male C57BL/6 mice weighing 22–24 g were maintained at an ambient room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) under a 12/12 h light-dark cycle. They were housed at the animal Facility of the Department of Pathology of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto and given standard mouse chow and water *ad libitum*. The animal protocol was approved by the Committee on Animal Research of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (Protocol #051/2014). All efforts were made to minimize animal suffering.

Polymicrobial sepsis model (CLP model)

A modified CLP model was used to induce polymicrobial sepsis. Mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) administered intraperitoneally (i.p.) and prepared for surgery. A midline incision was made in the abdomen and the cecum was exposed and carefully ligated with silk thread below the ileocecal valve. Then, it was punctured with an 18-gauge needle to induce severe septic injury (SSI). The bowel contents were gently extruded through the puncture, and the cecum was then returned to its original position and the abdomen was sutured. Control mice (SHAM) underwent the same procedures, except for cecal ligation and puncture. All mice received subcutaneous doses of saline (50 mL/kg of body weight) immediately and 12 hours after the surgical procedure to prevent dehydration. Tramadol hydrochloride (10 mg/Kg, i.p.) was administered at the end of surgery as well as 12 hours post-surgery for pain relief. Mice were monitored daily for signs of sepsis (12hs/12hs), which typically included piloerection, abnormal gait, slow movements and secretion around eyes. Mice displaying severe signs of distress (labored breathing, non-responsiveness to cage tapping, failure of grooming and severe eye discharge) were humanely sacrificed by injecting a combination of ketamine (90–120 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) followed by cervical dislocation as specified by guide for the care and use of laboratory animals from the Committee on Animal Research of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

Groups and Treatment

The mice were divided into four groups: 1) SHAM; 2) SHAM+ALLN; 3) SSI; and 4) SSI+ALLN. Half of the mice were administered injections of N-acetyl-leuciny-leuciny-

norleucinal (ALLN) (i.p., 3 mg/Kg body weight, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) diluted in sterile 0.9% NaCl saline (50 μ l total volume/animal) four hours after the CLP procedure or sham-operation. Control groups (SHAM and SSI) received an equivalent volume of saline alone.

Histopathology

For the histopathology analyses, mice were sacrificed by injecting a combination of ketamine (90–120 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) followed by cervical dislocation. After, hearts from SSI, SSI+ALLN, SHAM and SHAM+ALLN groups obtained 24 hours after surgery ($n = 6$ animals/group) were longitudinally sectioned into two halves, fixed in phosphate-buffered 10% formalin, and embedded in Historesin (Leica Instruments, Heidelberg, Germany) for high-resolution light microscopy, and 2- μ m-thick sections were stained with toluidine blue and left ventricles were analyzed.

Western Blot Analysis

To determine the amount of dystrophin, β -dystroglycan, sarcomeric actin, myosin, ubiquitin, mTOR, calpain-1 and Pa28 β in the hearts of septic and SHAM mice, with and without treatment, homogenates of heart left ventricles ($n = 6$ animals/group) were submitted to immunoblotting 24 hours after the CLP procedure. Fresh hearts left ventricles were washed in cold PBS, and homogenized in extraction buffer supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Total ventricular protein (50 mg protein/well) was resolved on a 5%, 7% or 10% SDS-PAGE (according to protein weight) and transferred to PVDF membranes (Immobilon®-P^{sq}, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). The membranes were incubated in blocking solution (5% bovine serum albumin (BSA) in PBS-T) for 24 hours at 4°C with primary antibodies (anti-dystrophin, 1:500; anti- β -dystroglycan, 1:500; Santa Cruz Biotechnology, anti-sarcomeric alpha actin, 1:1500; Sigma-Aldrich, anti-heavy chain cardiac myosin, 1:1000; Abcam, anti-ubiquitin, 1:1000, anti-mTOR, 1:1000, anti-calpain-1, 1:1000, anti-GAPDH, 1:10 000, anti-Pa28 β , 1:1000 and anti- α -tubulin, 1:1000; Cell Signaling). Then, the blots were washed and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Membranes were washed, developed using ECL (Amersham Pharmacia Biotech) and visualized using ChemiDoc XRS (BioRad). The image analysis was performed using the public domain *ImageJ Program* (developed at the National Institutes of Health and available at <http://rbs.info.nih.gov/nih-image/>), using the 'Gel Analysis' functions. The analysis results are the values of each band, each of which is proportional to the integrated density value (IDV) of that band, which corresponds to arbitrary units (AU). GAPDH and α -tubulin were used to determine equivalent loading conditions.

Immunofluorescence

For immunofluorescence studies, left ventricular fragments from SSI and SHAM mice with and without treatment ($n = 6$ animals/group) were excised 24 hours after surgery and were longitudinally sectioned into two halves, embedded in optimal cutting temperature embedding medium (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek USA, Inc, Torrance, CA, USA), frozen in isopentane chilled in liquid nitrogen, and stored accordingly at -80°C. Immunolabeling was performed (5 mm-thick sections) using primary antibodies to dystrophin (rabbit polyclonal antibody anti-dystrophin, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Omission of the primary antibodies served as the negative control.

RNA isolation, reverse transcription and RT-PCR

Total RNA was isolated from left ventricles ($n = 6$ animals/group) using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) of cDNA with the SYBR II Green QPCR system was performed with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the internal control. The nucleotide sequences of the primers from previous studies were as follows: calpain-1 (small subunit-1 (Capns1) (NM_009795)—sense AGCAGGATTCCACCTGAATG e anti-sense—TGGCTCCATAGTGAGCTGTG) and dystrophin (D427) (NM_007868.2)—sense GTTCATTGATGGAGACGGAA and anti-sense—GCACTTCAGCTTCTTCATCT. The reaction products were amplified using the SsoFast™ EvaGreen® Supermix kit (BioRad) with the following cycling conditions: 95°C for 30 seconds, 40 cycles at 95°C for 5 seconds, 60°C for 5 seconds with a final extension at 72°C for 1 minute. The quantification of calpain-1 and dystrophin gene expression was expressed in $\Delta\Delta C_t$ values.

Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 5 statistics program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Multiple comparisons were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey (parametric data) or Dunn's (nonparametric data) post hoc multiple-comparisons tests. All data are presented as the mean $\pm$ SD. A $p < 0.05$ was considered statistically significant and all p values are demonstrated in the graphics.

Results

Effect of ALLN administration on cardiac lesions formation

Severe sepsis induced by CLP resulted in intense cellular damage in the myocardium (Fig 1). Cardiac tissue from the SSI group showed widespread and diffuse foci of cardiac myocyte lysis, development of contraction bands necrosis and swollen cytoplasm compared to the hearts of the control animal groups (SHAM and SHAM+ALLN). However, septic mice treated with calpain inhibitor-1 (SSI+ALLN) displayed lower intensity and extended areas of myocytolysis and reduced edema compared with the SSI group at 24 hours after CLP.

Effect of ALLN administration on calpain-1, ubiquitin and proteasome protein levels and calpain-1 gene expression in the cardiac tissue

We found that protein levels of calpain-1 in the myocardium of animals receiving CLP (SSI) were increased by approximately 25% compared with SHAM mice (1.23 ± 0.26 vs. 0.91 ± 0.11) 24 hours after the CLP procedure. The SSI+ALLN group demonstrated a marked reduction in calpain-1 levels of approximately 31% compared to the SSI group (0.82 ± 0.06 vs. 1.23 ± 0.26), which exhibited values similar to those of the control groups (Fig 2A). Sepsis increased the ubiquitin protein levels by greater than 901% in the cardiac tissue obtained from the SSI group compared with that of the SHAM group (2.01 ± 0.32 vs. 1.05 ± 0.16) (Fig 2B), whereas in the sepsis group treated with ALLN (SSI+ALLN), the levels of ubiquitin were similar to those of the controls (1.45 ± 0.09 vs. 1.05 ± 0.16). Similarly, the protein levels of Pa28 β is increased by approximately 15% in the group (SSI) when compared to the sham group (SHAM) (0.71 ± 0.06 vs. 0.62 ± 0.05), where Pa28 β levels remained similar in septic group treated with ALLN (SSI+ALLN) compared to the SHAM values (Fig 2C), suggesting a correlation between increased calpain-1 and ubiquitin-proteasome protein levels during sepsis.

The measurement of cardiac calpain-1 gene expression has been used to examine the effectiveness of ALLN treatment in inhibiting genetic expression of this protease. Non-treated mice

Fig 1. Histopathology of myocardial tissue after CLP. Myocytolysis and contraction bands become evident in the SSI group (upper right panel) compared to the SSI+ALLN group (bottom right panel) 24 h after surgery. The SHAM (upper left panel) and SHAM+ALLN (bottom left panel) groups revealed no morphological alterations. Scale bars indicate 50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0166839.g001

submitted to severe sepsis (SSI) displayed increased expression of calpain-1 by 102% when compared with the SHAM group (2.02 ± 0.61 vs. 1.00 ± 0.00). In contrast, the SSI+ALLN group exhibited a significant reduction in calpain-1 gene expression in cardiac tissue as compared to the SSI group (0.50 ± 0.44 vs. 2.02 ± 0.61), as shown in [Fig 2D](#).

Effects of ALLN administration on cardiac structural and contractile proteins recover

[Fig 3](#) shows that fluorescent signals for dystrophin were markedly reduced in SSI hearts ([Fig 3](#), left bottom panel) compared with SHAM hearts, which exhibited abundant signal for this protein ([Fig 3](#), left upper panel). In contrast, the analysis of the dystrophin fluorescent signal in the SSI group after treatment with ALLN (SSI+ALLN) did not show a significant discrepancy of the fluorescent signal as compared to SHAM or SHAM+ALLN groups ([Fig 3](#), upper panel).

Fig 2. Western blot analysis of cardiac calpain-1, ubiquitin and Pa28 β after CLP. Protein levels of calpain-1 (A), ubiquitin (B) and Pa28 β (C) in the SHAM, SSI, SHAM+ALLN and SSI+ALLN groups were measured 24 h after the CLP procedure and expressed in arbitrary units (AUs). GAPDH was used to determine equivalent loading conditions. (D) Calpain-1 mRNA expression was measured 24 h after the CLP procedure and expressed in arbitrary units (AUs). GAPDH gene expression was used as the internal control for gene expression normalization. The results (n = 6 per group) are representative of three different experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0166839.g002

In addition, the cardiac levels of dystrophin (Fig 3B) in the SSI group were markedly reduced compared with SHAM mice (0.69 ± 0.19 vs. 1.09 ± 0.07) 24 hours after CLP, representing a reduction of approximately 50%. On the other hand, the treatment of SSI mice with ALLN (SSI+ALLN) significantly prevented the reduction of dystrophin levels in the heart ventricles compared with SHAM or SHAM+ALLN hearts (1.24 ± 0.10 vs. 1.09 ± 0.17 and 1.24 ± 0.10 vs. 1.15 ± 0.12).

Fig 4 shows the cardiac levels of structural β -dystroglycan and contractile actin and myosin proteins 24 hours after sepsis. The β -dystroglycan levels (Fig 4A) were markedly decreased in SSI hearts compared with SHAM heart ventricles (0.54 ± 0.03 vs. 0.93 ± 0.09), representing a reduction of 40%. In contrast, treatment of SSI mice with ALLN (SSI+ALLN) significantly prevented β -dystroglycan loss compared with the SHAM or SHAM+ALLN hearts (0.80 ± 0.03 vs. 0.93 ± 0.09 and 0.80 ± 0.03 vs. 0.69 ± 0.02).

The contractile proteins, sarcomeric alpha actin and heavy chain cardiac myosin, were reduced by approximately 25% and 48%, respectively, in the SSI hearts compared with the SHAM hearts (Fig 4B and 4C). In contrast, ALLN treatment abrogated the reduction of sarcomeric alpha actin and myosin in the SSI hearts (SSI+ALLN), with values similar to those observed in the sham-treated mice (SHAM+ALLN).

Fig 3. Immunofluorescence and western blot analysis of cardiac dystrophin after CLP. (A) Immunofluorescence signal for dystrophin is significantly reduced in the SSI heart (bottom left panel) compared with the immunofluorescent signal in the SHAM heart (upper left panel), and the SHAM+ALLN (upper right panel) and SSI+ALLN (bottom right panel) myocardium. (B) Protein levels of dystrophin in the SHAM, SSI, SHAM+ALLN and SSI+ALLN hearts were measured 24 h after the CLP procedure and were expressed in arbitrary units (AUs). α -Tubulin was used to determine equivalent loading conditions. The results (n = 6 per group) are representative of three different experiments. Scale bars indicate 50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0166839.g003

Fig 4. Western blot analysis of cardiac β-dystroglycan, sarcomeric actin and myosin after CLP. Protein levels of β-dystroglycan (A), sarcomeric actin (B) and myosin (C) in the SHAM, SSI, SHAM+ALLN and SSI+ALLN groups were measured 24 h after the CLP procedure and expressed in arbitrary units (AUs). GAPDH was used to determine equivalent loading conditions. The results (n = 6 per group) are representative of three different experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0166839.g004

mTOR inhibition may prevent protein synthesis in sepsis

We then verified mTOR protein levels and dystrophin gene expression. The cardiac levels of mTOR protein (Fig 5A) were reduced by approximately 40% in the SSI mice compared with the SHAM group (0.42 ± 0.05 vs. 0.69 ± 0.06). In contrast, SSI mice treated with ALLN (SSI+ALLN) significantly recovered the expression of mTOR protein levels compared with the SHAM or SHAM+ALLN hearts.

There was an increase in dystrophin gene expression (Fig 5B) in both septic (SSI) and septic mice treated with ALLN (SSI+ALLN) 24 hours after the CLP. This expression represents an increase of approximately 220% for the SSI group compared with the SHAM (3.28 ± 0.69 vs. 1.00 ± 0.00) group and approximately 230% for the SSI+ALLN compared with the SHAM (3.33 ± 1.31 vs. 0.93 ± 0.24) group. These alterations in mTOR proteins may explain, in part, the dystrophin gene expression and protein level results.

Discussion

Herein, we have demonstrated, for the first time, that calpain-1 inhibition reduces the loss of essential cardiac cytoskeletal (dystrophin and β-dystroglycan) and contractile (sarcomeric actin and myosin) proteins during sepsis. These changes were accompanied by the inhibition of ubiquitin, a protein implicated in the degradation of intracellular proteins, and Pa28β, a protein that participates of proteasome activity. We also observed increased mTOR protein expression, a key component of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway involved in cell survival and proliferation. These results indicate its importance as a possible regulator of protein turnover in sepsis-induced cardiac dysfunction.

Calpain activation plays an important role in the mechanisms of many acute inflammatory disease of the cardiovascular system [23,24]. Previous studies have shown the peak of calpain activity approximately 6 hours after sepsis induction and that calpain activation may play an important role in the course of sepsis and multiple organ failure [25]. Our results demonstrated an increase of approximately 25% of calpain-1 levels in septic hearts, 24 hours after

Fig 5. (A) Western blot analysis of cardiac mTOR protein levels after CLP. Cardiac mTOR protein levels in the SHAM, SSI, SHAM+ALLN and SSI+ALLN groups were measured 24 h after surgery and were expressed in arbitrary units (AUs). GAPDH was used to determine equivalent loading conditions. **(B)** Analysis of cardiac dystrophin mRNA expression. Dystrophin mRNA expression was measured 24 h after the CLP procedure and expressed in arbitrary units (AUs). GAPDH gene expression was used as the internal control for gene expression normalization. The results (n = 6 per group) are representative of three different experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0166839.g005

CLP. On the other hand, the cardiac calpain-1 levels were markedly reduced in septic-treated hearts indicating the effectiveness of ALLN treatment in the inhibition of both protein and genetic expression of this protease.

In cardiac muscle, dystrophin is part of a glycoprotein complex that works to provide muscle tensile strength and protect fibers from damage during muscle contraction and relaxation. Disruptions in the dystrophin-glycoprotein complex are associated with decreased stability and integrity of the sarcolemma. This weakens the connection between the structural framework of cells (cytoskeleton) with the lattice of proteins and the extracellular matrix [26–29] resulting in myocardial dysfunction and heart failure [30].

Cardiac myocytes of dystrophin-deficient mdx mice are abnormally vulnerable to mechanical stress and sarcolemmal injury accompanied by decreased systolic and diastolic left ventricular dysfunction [31], suggesting that dystrophin disruption could be associated with the progression of cardiomyopathy as a result of mechanical stress and damage induced by the overload [32,33]. In the present study, we demonstrate that severe sepsis induced a significant reduction in cardiac structural proteins dystrophin and β -dystroglycan examined 24 hours after induction of sepsis employing the CLP model. In addition, decreased amounts of contractile proteins, sarcomeric actin and myosin, in cardiac myocytes were followed by significant increases in calpain cardiac muscle levels. Treatment of septic mice with the calpain inhibitor-1 ALLN prevented the loss/reduction of the cardiac proteins.

The contribution of calpain to the proteolysis of cardiac proteins is of interest since calpain cannot completely degrade some proteins such as actin and myosin [7,34,35]. In this pathway, the UPS would be responsible for the achievement of proteolytic action initiated by calpain in situations of cellular catabolism [36]. One of the central components of proteolytic pathway of both nuclear and cytosolic compartments is the 20S proteasome since its action is considered a prerequisite for effective action of the ubiquitin pathway [37]. Interestingly, the structure of 20S proteasome presents 28 subunits and can be divided in α and β families [38,39]. The β subunits show a higher degree of sequence diversity than α subunits. Almost all β subunits initially possess an N-terminal pro sequence, which is cleaved off during particle formation. This step exposes, on most β subunits, a terminal threonine residue that is necessary for activity and several observations indicate that the β subunits are responsible for the proteolytic activities [40–42]. There are few data in the literature showing an association between calpain-1 and the UPS in cardiac dysfunction during sepsis, and there are no reports evaluating this relationship with structural and contractile protein expression in septic myocardium. Our results show increased levels of ubiquitin, Pa28 β and calpain-1 combined with reduced amounts of structural and contractile proteins in the hearts of septic mice. These observations demonstrate a combined action of these two proteolytic pathways in septic myocardium. In addition, the inhibition of calpain-1 confirmed the importance of this protease in the development of septic cardiomyopathy.

A previous study using neonatal cardiac myocytes after transfection with adenovirus demonstrated an increased calpain-1 expression associated with proteolysis of troponin I, desmin and protein kinase C α , without apoptosis. In addition, the transfection with adenovirus caused augmented levels of ubiquitinated proteins, which were inhibited by the co-expression of an endogenous inhibitor of calpain, the calpastatin [43]. The evaluation of cardiac overexpression of calpain-1 in transgenic mice showed high levels of protein ubiquitination and proteasomal activity with functional cardiac changes such as the reduction of the ejection fraction and dilatation of the cardiac chambers associated with lethality [44].

Analysis of dystrophin gene expression demonstrated the over-expression of dystrophin mRNA in the hearts of septic mice treated and not treated with ALLN, which was not consistent with the results found for the dystrophin protein levels assessed by immunoblotting and fluorescence. Herein, the results suggest reasonable alterations in protein synthesis in the heart of mice subjected to experimental sepsis. Based on these results, it has become essential to assess the mTOR protein levels involved in the control of protein synthesis, metabolism and cell cycle in an attempt to correlate these findings with calpain-1 activation during sepsis.

Recently, it has been suggested that calpain is capable of partially modulating cellular proliferative signals dependent on the PI3K/mTOR signaling pathway [22]. In cases of cardiac disease, where there is no effective process of neo-vascularization, repair and tissue regeneration may be limited or may not occur. Another important aspect is that during ischemic cardiac injury, the activation of the mTOR pathway may play a protective role against oxidant injury caused by ischemia/reperfusion in cardiac myocytes [45]. This occurs because during periods of post-ischemic injury, mTOR is necessary for preventing apoptosis in cardiac cells [45]. In studies that involve blocking the phosphorylation and activation of p70S6K, a component of the mTOR signaling pathway, the cardiac ischemic and scar areas are increased, demonstrating a cardioprotective role for mTOR [46]. In the present study, the protein levels of mTOR were reduced in the myocardium of septic mice, which could explain, at least in part, the unrecovered/reduced protein levels of dystrophin even with high mRNA expression. These results suggest that the decreased levels of mTOR could be associated with reduced protein synthesis in the myocardium of septic mice, which did not occur in animals treated with ALLN. In addition, our results demonstrate that calpain-1 also plays a key role in protein breakdown under

septic conditions, which would act as a mechanism of protein synthesis disruption, thus increasing the degree of cardiac dysfunction and injury due to sepsis.

Conclusions

In conclusion, our data provide an important insight into the role of calpain-1 in the development of septic cardiomyopathy because its inhibition reduced/mitigated the loss of key cardiac proteins. Furthermore, our results demonstrate a significant connection between two proteolytic pathways: calpain and the ubiquitin-proteasome system. Finally, breakdown of structural and contractile proteins would be associated with a possible reduction in protein synthesis through the inhibition of mTOR protein. These findings provide further important information about the use of a calpain inhibitor as a possible strategy to prevent the progression to heart failure in sepsis.

Author Contributions

Conceptualization: MRNC ACSF MJF SGR HBT.

Data curation: DFS ACSF.

Formal analysis: DFS ACSF MRNC.

Funding acquisition: MRNC SGR.

Investigation: ACSF MJF ECC DFS MRNC.

Methodology: ACSF MJF ECC DFS.

Project administration: MRNC.

Resources: MRNC SGR HBT.

Supervision: MRNC HBT SGR.

Validation: ACSF MJF ECC DFS MRNC.

Visualization: MRNC SGR HBT ACSF MJF DFS ECC.

Writing – original draft: MRNC ACSF MJF DFS.

Writing – review & editing: MRNC SGR HBT ACSF MJF DFS ECC.

References

1. Werdan K, Oelke A, Mueller-Werdan U. Myocardial Depression or Septic Cardiomyopathy in Vincent JL. Yearbook of intensive care and emergency medicine. Springer, Heidelberg 2009;pp 183–194.
2. Smeding L, Plötz FB, Groeneveld ABJ, Kneyber MCJ. Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock. Shock. 2012; 37: 449–56. doi: [10.1097/SHK.0b013e31824c3238](https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31824c3238) PMID: [22301606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22301606/)
3. Rossi MA, Celes MRN, Prado CM, Saggioro FP. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. Shock. 2007; 27: 10–8. doi: [10.1097/01.shk.0000235141.05528.47](https://doi.org/10.1097/01.shk.0000235141.05528.47) PMID: [17172974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17172974/)
4. Celes MRN, Torres-Dueñas D, Malvestio LM, Blefari V, Campos EC, Ramos SG, et al. Disruption of sarcolemmal dystrophin and beta-dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. Lab Invest. 2010; 90: 531–42. doi: [10.1038/labinvest.2010.3](https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.3) PMID: [20142806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20142806/)
5. Celes MRN, Torres-Dueñas D, Prado CM, Campos EC, Moreira JE, Cunha FQ, et al. Increased sarcolemmal permeability as an early event in experimental septic cardiomyopathy: a potential role for oxidative damage to lipids and proteins. Shock. 2010; 33: 322–31. doi: [10.1097/SHK.0b013e3181b38ef6](https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181b38ef6) PMID: [20160610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20160610/)

6. Celes MRN, Malvestio LM, Suadcani SO, Prado CM, Figueiredo MJ, Campos EC, et al. Disruption of calcium homeostasis in cardiomyocytes underlies cardiac structural and functional changes in severe sepsis. *PLoS One*. 2013; 8: e68809. doi: [10.1371/journal.pone.0068809](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068809) PMID: [23935889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23935889/)
7. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev*. 2003; 83: 731–801. doi: [10.1152/physrev.00029.2002](https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002) PMID: [12843408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12843408/)
8. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Siriwardena D, Serraino I, Dugo L, et al. Calpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation. *Am J Pathol*. 2000; 157: 2065–79. doi: [10.1016/S0002-9440\(10\)64845-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64845-6) PMID: [11106579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11106579/)
9. McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, Cuzzocrea S, Abdelrahman M, Harwood S, et al. Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEB J*. 2001; 15: 171–186. doi: [10.1096/fj.99-0645com](https://doi.org/10.1096/fj.99-0645com) PMID: [11149905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11149905/)
10. Maass DL, Hybki DP, White J, Horton JW. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. *Shock*. 2002; 17: 293–9. PMID: [11954829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11954829/)
11. Li Y, Li Y, Feng Q, Arnold M, Peng T. Calpain activation contributes to hyperglycaemia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2009; 84: 100–10. doi: [10.1093/cvr/cvp189](https://doi.org/10.1093/cvr/cvp189) PMID: [19505932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19505932/)
12. Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallàs M. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev*. 2006; 12: 135–48. doi: [10.1111/j.1527-3458.2006.00135.x](https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00135.x) PMID: [16958987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16958987/)
13. Mani SK, Balasubramanian S, Zavadzkas JA, Jeffords LB, Rivers WT, Zile MR, et al. Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H1744–51. doi: [10.1152/ajpheart.00338.2009](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00338.2009) PMID: [19734364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19734364/)
14. Müller AL, Dhalla NS. Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. *Heart Fail Rev*. 2012; 17: 395–409. doi: [10.1007/s10741-011-9269-8](https://doi.org/10.1007/s10741-011-9269-8) PMID: [21739365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21739365/)
15. Smith IJ, Dodd SL. Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle. *Exp Physiol*. 2007; 92: 561–73. doi: [10.1113/expphysiol.2006.035790](https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.035790) PMID: [17272355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17272355/)
16. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*. 1997; 328 (Pt 3): 721–32.
17. Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med*. 2001; 7: 355–62. PMID: [11516996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11516996/)
18. Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Calpain chronicle—an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2011; 87: 287–327. doi: [10.2183/pjab.87.287](https://doi.org/10.2183/pjab.87.287) PMID: [21670566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21670566/)
19. Huang J, Forsberg NE. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 12100–5. PMID: [9770446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9770446/)
20. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Degradation systems in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 84: 212–22. doi: [10.1016/j.yjmcc.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.05.004) PMID: [25981331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25981331/)
21. Willis MS, Bevilacqua A, Pulinilkunnit T, Kienesberger P, Tannu M, Patterson C. The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2014; 71: 43–53. doi: [10.1016/j.yjmcc.2013.11.008](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.008) PMID: [24262338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24262338/)
22. Beltran L, Chaussade C, Vanhaesebroeck B, Cutillas PR. Calpain interacts with class IA phosphoinositide 3-kinases regulating their stability and signaling activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 16217–22. doi: [10.1073/pnas.1107692108](https://doi.org/10.1073/pnas.1107692108) PMID: [21930956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21930956/)
23. Ruetten H, Thiemeermann C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I kappa B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol*. 1997; 121: 695–704. doi: [10.1038/sj.bjp.0701180](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701180) PMID: [9208136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9208136/)
24. Tissier S, Lancel S, Marechal X, Mordon S, Depontieu F, Scherpereel A, et al. Calpain inhibitors improve myocardial dysfunction and inflammation induced by endotoxin in rats. *Shock*. 2004; 21: 352–7. PMID: [15179136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15179136/)
25. Zafrani L, Gerotziakas G, Byrnes C, Hu X, Perez J, Lévi C, et al. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185: 744–55. doi: [10.1164/rccm.201109-1686OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201109-1686OC) PMID: [22268136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22268136/)
26. Ervasti JM, Campbell KP. Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser*. 1993; 3: 139–66. PMID: [8111538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8111538/)
27. Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol*. 1996; 135: 661–72. PMID: [8909541](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8909541/)
28. Prins KW, Lowe DA, Ervasti JM. Skeletal muscle-specific ablation of gamma(cyto)-actin does not exacerbate the mdx phenotype. *PLoS One*. 2008; 3: e2419. doi: [10.1371/journal.pone.0002419](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002419) PMID: [18545671](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18545671/)

29. Sequeira V, Nijenkamp LLAM, Regan JA, van der Velden J. The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838: 700–22. doi: [10.1016/j.bbame.2013.07.011](https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.07.011) PMID: [23860255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23860255/)
30. Yamaguchi O, Taneike M, Otsu K. Cooperation between proteolytic systems in cardiomyocyte recycling. *Cardiovasc Res*. 2012; 96: 46–52. doi: [10.1093/cvr/cvs236](https://doi.org/10.1093/cvr/cvs236) PMID: [22843702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22843702/)
31. Danialou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, Des Rosiers C, et al. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. *FASEB J*. 2001; 15: 1655–7. PMID: [11427517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427517/)
32. Toyo-Oka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, Masui F, et al. Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 7381–5. doi: [10.1073/pnas.0401944101](https://doi.org/10.1073/pnas.0401944101) PMID: [15128945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15128945/)
33. Kawada T, Masui F, Tezuka A, Ebisawa T, Kumagai H, Nakazawa M, et al. A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1751: 73–81. doi: [10.1016/j.bbapap.2005.01.001](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.01.001) PMID: [16054019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16054019/)
34. Portbury AL, Willis MS, Patterson C. Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere. *J Biol Chem*. 2011; 286: 9929–34. doi: [10.1074/jbc.R110.170571](https://doi.org/10.1074/jbc.R110.170571) PMID: [21257759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21257759/)
35. Duguez S, Bihan M-C Le, Gouttefangeas D, Féasson L, Freyssenet D. Myogenic and nonmyogenic cells differentially express proteinases, Hsc/Hsp70, and BAG-1 during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285: E206–15. doi: [10.1152/ajpendo.00331.2002](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00331.2002) PMID: [12791605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12791605/)
36. Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G, Spencer MJ. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet*. 2005; 14: 2125–34. doi: [10.1093/hmg/ddi217](https://doi.org/10.1093/hmg/ddi217) PMID: [15961411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15961411/)
37. Herskho A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 425–79. doi: [10.1146/annurev.biochem.67.1.425](https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425) PMID: [9759494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9759494/)
38. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65: 801–47. doi: [10.1146/annurev.bi.65.070196.004101](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.004101) PMID: [8811196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8811196/)
39. Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1999; 28: 295–317. doi: [10.1146/annurev.biophys.28.1.295](https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.295) PMID: [10410804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10410804/)
40. Hilt W, Heinemeyer W, Wolf DH. Studies on the yeast proteasome uncover its basic structural features and multiple in vivo functions. *Enzyme Protein*. 1993; 47: 189–201. PMID: [7697119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7697119/)
41. Zwickl P, Kleinz J, Baumeister W. Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol*. 1994; 1: 765–70. PMID: [7634086](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7634086/)
42. Song X, von Kampen J, Slaughter CA, DeMartino GN. Relative functions of the alpha and beta subunits of the proteasome activator, PA28. *J Biol Chem*. 1997; 272: 27994–8000. PMID: [9346951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9346951/)
43. Maekawa A, Lee J-K, Nagaya T, Kamiya K, Yasui K, Horiba M, et al. Overexpression of calpastatin by gene transfer prevents troponin I degradation and ameliorates contractile dysfunction in rat hearts subjected to ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35: 1277–84. PMID: [14519437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14519437/)
44. Li X, Li Y, Shan L, Shen E, Chen R, Peng T. Over-expression of calpastatin inhibits calpain activation and attenuates myocardial dysfunction during endotoxaemia. *Cardiovasc Res*. 2009; 83: 72–9. doi: [10.1093/cvr/cvp100](https://doi.org/10.1093/cvr/cvp100) PMID: [19318376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19318376/)
45. Hernández G, Lal H, Fidalgo M, Guerrero A, Zalvide J, Force T, et al. A novel cardioprotective p38-MAPK/mTOR pathway. *Exp Cell Res*. 2011; 317: 2938–49. doi: [10.1016/j.yexcr.2011.09.011](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.09.011) PMID: [22001647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22001647/)
46. Wagner C, Tillack D, Simonis G, Strasser RH, Weinbrenner C. Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2010; 339: 135–47. doi: [10.1007/s11010-009-0377-x](https://doi.org/10.1007/s11010-009-0377-x) PMID: [20054613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20054613/)