UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

PARTICIPAÇÃO DA ISOFORMA PROTEÍNA QUINASE C β II NA
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Julio Cesar Batista Ferreira

SÃO PAULO
2009

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

Ang II	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
CaCl ₂	cloreto de cálcio
DAB	3,3-diaminobenzidina tetra-hidrocloreto
DAG	diacilglicerol
DDiaVE	diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
dP	derivada de pressão
dt	derivada de tempo
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FE	fração de encurtamento
FURA-2	<i>fura2-acetoxymethyl ester</i>
HT-IC	modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva
IM-IC	modelo de insuficiência cardíaca etiologia isquêmica
KCl	cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
MBP	proteína básica de mielina
MC	mastócitos cardíacos
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
PAGE	gel de eletroforese de poliacrilamida
PBS-T	solução tampão fosfato salina com Tween 20
pH	potencial hidrogeniônico
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PKC α	proteína quinase C α
PKC γ	proteína quinase C γ

PKC ξ	proteína quinase C ξ
PKC τ	proteína quinase C τ
PKC λ	proteína quinase C λ
PKC β I	proteína quinase C β I
PKC β II	proteína quinase C β II
PMA	ester de forbol
PPDia	parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole
PPSis	parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole
RACKs	receptores de PKC ativada
$\psi\epsilon$ RACK	pseudo- ϵ RACK
RICK	receptores de PKC inativa
RIPA	tampão usado para ensaio de imunoprecipitação
SDS	sulfato lauril de sódio
SIVDia	espessura do septo interventricular na diástole
SIVSis	espessura do septo interventricular na sístole
TAT	seqüência de peptídeos carreadores
TBS	solução salina trizma-tamponada
TGF β 1	fator de crescimento tumoral β 1
Tris-HCl	trizma ácido clorídrico
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Inibidores farmacológicos de PKCs disponíveis no mercado e seus respectivos IC ₅₀ para cada isoforma específica	12
TABELA 2 - Distribuição amostra.....	da 19
TABELA 3 - Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DsVE) e diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DdVE) dos grupos <i>sham</i> e insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC) pré-e pós- seis semanas de tratamento com TAT ou β IV5-3 (peptídeo inibidor da isoforma PKC β II)	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Modelo ilustrativo de ativação e inibição da isoforma PKC β II	14
FIGURA 2 - Caracterização fenotípica do modelo de insuficiência cardíaca etiologia isquêmica (IM-IC)	36
FIGURA 3 - Caracterização das diferentes isoformas de PKC cardíacas no modelo de insuficiência cardíaca etiologia isquêmica (IM-IC).	39
FIGURA 4 - Efeito da inibição da isoforma PKC β II na função cardíaca e remodelamento cardíaco no modelo de insuficiência cardíaca etiologia isquêmica	42
FIGURA 5 - Efeito da terapia com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II (β IIV5-3) no remodelamento cardíaco em modelo de insuficiência cardíaca etiologia isquêmica (IM-IC)	45
FIGURA 6 - Efeito da inibição sustentada da PKC β II nas diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca etiologia isquêmica (IM-IC)	47
FIGURA 7 - Efeito da terapia com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II (β IIV5-3) no perfil de inflamação cardíaca em modelo de insuficiência cardíaca etiologia isquêmica (IM-IC)	50
FIGURA 8 - Efeito da inibição aguda da PKC β II na função cardíaca em modelo na insuficiência cardíaca etiologia isquêmica (IM-IC): ensaio com coração isolado	54
FIGURA 9 - Efeito da inibição aguda e crônica da PKC β II na contratilidade de cardiomiócitos isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio (IM-IC)	57
FIGURA 10 Efeito da inibição sustentada da PKC β II na expressão e	

-	fosforilação da troponina I, e interação entre troponina I e PKC β II em ratos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio (IM-IC)	59
FIGURA 11-	Efeito da inibição aguda e crônica da PKC β II no transiente de cálcio de cardiomiócitos isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio	62
FIGURA 12-	Efeito da inibição das isoformas PKC β II ou PKC β I na sobrevida e função ventricular no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva (HT-IC)	64
FIGURA 13-	Efeito da inibição das isoformas PKC β II ou PKC β I no remodelamento cardíaco e ativação das diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca etiologia hipertensiva função ventricular no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva (HT-IC)	66
FIGURA 14-	Modelo esquemático da transdução do sinal intracelular. Possíveis alvos de terapias farmacológicas	73

RESUMO

PARTICIPAÇÃO DA ISOFORMA PROTEÍNA QUINASE C β II NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Autor: JULIO CESAR BATISTA FERREIRA

Orientador: PROF.DR. PATRICIA CHAKUR BRUM

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica de mau prognóstico caracterizada por disfunção cardíaca associada à intolerância aos esforços, retenção de fluído e redução da longevidade. Dentre as serina/treonina quinases associadas às alterações funcionais e estruturais cardíacas observadas na progressão da insuficiência cardíaca, a família das proteínas quinase C (PKC) composta por 12 diferentes isoformas parece modular a contratilidade miocárdica e o remodelamento cardíaco. No presente estudo, caracterizamos o fenótipo cardíaco e o perfil de ativação das diferentes isoformas de PKC na progressão da insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica em ratos. Além disso, estudamos o efeito da inibição sustentada da isoforma PKC β II sobre a sobrevida, o remodelamento cardíaco e a função ventricular em modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica. Consequente, identificamos possíveis substratos cardíacos da PKC β II envolvidos na progressão da insuficiência cardíaca. Para isso, avaliamos os efeitos agudo e crônico da inibição da PKC β II sobre o transiente de cálcio e a contratilidade de cardiomiócito isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca. Por fim, testamos as inibições específicas das PKC β II e PKC β I na progressão da hipertrofia cardíaca compensada para a insuficiência cardíaca em modelo animal de hipertensão arterial sustentada. Nossos resultados sugerem que a inibição sustentada da PKC β II reverte o quadro de insuficiência cardíaca, melhorando a função ventricular, o remodelamento cardíaco e a sobrevida dos diferentes modelos de insuficiência cardíaca estudados, constituindo-se em uma estratégia terapêutica celular promissora.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca, proteína quinase C e terapia farmacológica.

ABSTRACT

INVOLVEMENT OF PROTEIN KINASE C β II IN HEART FAILURE

Author: JULIO CESAR BATISTA FERREIRA

Adviser: PROF.DR. PATRICIA CHAKUR BRUM

Heart failure is a common endpoint for many forms of cardiovascular disease and a significant cause of morbidity and mortality worldwide. Protein kinase C isozymes emerge as important potential therapeutic targets in chronic cardiovascular disease. However, individual PKC isozymes play different roles in the pathogenesis of cardiac diseases. Here, we characterized the cardiac phenotype as well as the different PKC isozyme activation profile during myocardial-induced heart failure progression in rat. Furthermore, we evaluated the role of selective PKC β II inhibition on survival, left ventricle remodeling and cardiac function in myocardial-induced heart failure. Moreover, we identified the cardiac PKC β II substrates related to heart failure. Finally, PKC β II and PKC β I specific inhibitors were chronically delivered to hypertensive-induced heart failure rats and the cardiac phenotype was evaluated. Our data suggest that 6-wks of PKC β II inhibition, but not PKC β I, improved animal survival by restoring cardiac function and promoting cardiac anti-remodeling effect in both myocardial infarction-induced heart failure and hypertensive-induced heart failure rats. The improved cardiac function and anti-remodeling effect of PKC β II inhibition seems to be associated with increased contractility of cardiac myocytes, improved miofilaments/ Ca^{2+} sensitivity and decreased cardiac inflammatory response. Altogether, the results provide evidence for beneficial effects of PKC β II specific intracellular inhibition on cardiac function and remodeling, which may be a promising cellular therapy for heart failure treatment.

Keywords: heart failure, protein kinase C and pharmacological therapy.

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da insuficiência cardíaca é consequência da incapacidade dos ventrículos em bombear quantidades adequadas de sangue para manter as necessidades periféricas do organismo (COLUCCI, 1998). Essa síndrome era descrita primariamente como um distúrbio hemodinâmico associado à diminuição do débito cardíaco com consequente baixo fluxo renal, levando à retenção de sódio, água e o surgimento de edemas periférico e pulmonar que acabavam por levar o paciente ao óbito. Atualmente, a insuficiência cardíaca tem sido vista como uma doença da circulação e não apenas do coração. Quando o débito cardíaco é reduzido após agressão miocárdica, mecanismos neuro-humorais são ativados com o objetivo de preservar a homeostase circulatória. Embora originalmente vista como uma resposta compensatória benéfica, a liberação endógena de neuro-hormônios vasoativos parece exercer papel deletério no desenvolvimento da insuficiência cardíaca, pelo aumento da sobrecarga de volume e da pós-carga do ventrículo com contratilidade já diminuída, levando à progressão da insuficiência cardíaca já existente. Esses neuro-hormônios podem exacerbar as anormalidades metabólicas já existentes, contribuindo para o remodelamento ventricular e ocasionando o aparecimento de arritmias cardíacas. Por essa razão, a ativação neuro-humoral contribui de maneira significativa para os sintomas da síndrome, assim como para a alta mortalidade associada.

Decorrente da hiperativação de fatores neuro-hormonais na insuficiência cardíaca, a progressão da síndrome é caracterizada por uma série de anormalidades celulares associadas ao remodelamento cardíaco e disfunção ventricular. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos celulares responsáveis pelo agravamento da função cardíaca na progressão da insuficiência cardíaca é atualmente um importante foco de estudo, onde a ativação e inibição de proteínas quinases específicas são capazes de reverter as alterações estruturais e funcionais cardíacas decorrentes da insuficiência cardíaca. Dentre as proteínas quinases ativadas na progressão da insuficiência cardíaca, a família da proteína quinase C (PKC) parece

exercer importante papel no controle do remodelamento cardíaco e função ventricular esquerda.

Alguns estudos sugerem que a utilização de inibidores não específicos de PKC é capaz de regredir a hipertrofia cardíaca induzida por estímulos neuro-hormonais. Entretanto, pouco se sabe sobre a função específica de cada isoenzima no controle da função e remodelamento cardíaco na insuficiência cardíaca. Segundo WILKINSON & HALLAM (1994), embora a família das PKCs seja um importante foco de estudo, o entendimento do papel das diferentes isoformas de PKC é limitado devido à grande homologia entre as isoenzimas e a falta de inibidores e ativadores específicos para cada isoforma. Portanto, um estudo mais detalhado da participação das diferentes isoenzimas de PKCs na insuficiência cardíaca por meio da utilização de inibidores e ativadores específicos, bem como o melhor entendimento das vias de sinalização intracelulares ativadas durante o desenvolvimento da insuficiência cardíaca será de grande valia para posterior emprego de novas terapias celulares capazes de controlar especificamente a atividade de proteínas quinases relacionadas ao agravamento da disfunção cardíaca na insuficiência cardíaca. Discorreremos a seguir em maior detalhe sobre o papel das diferentes isoformas de PKC na insuficiência cardíaca e possíveis formas de terapias utilizando drogas quinase-seletivas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca é a via final comum da maioria das cardiomiopatias e representa importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e os altos índices de hospitalização associados (GHEORGHIADÉ & BONOW, 1998). Atualmente, estima-se que cerca de 4,6 milhões de pacientes nos Estados Unidos tenham insuficiência cardíaca, sendo 550 mil novos casos a cada ano¹. No Brasil, segundo DATASUS², do Ministério da Saúde, existem cerca de dois milhões de pacientes com insuficiência cardíaca e incidência de 240 mil novos casos ao

ano. A mortalidade anual oscila em torno de 10% para pacientes nas diferentes classes de insuficiência cardíaca e de 30 a 40% para enfermos em classe funcional IV da *New York Heart Association* (BROWN, 1994).

A insuficiência cardíaca é uma síndrome clínica de alta incidência e mau prognóstico, caracterizada por alterações morfofuncionais cardíacas, fadiga, dispnéia e grande limitação aos esforços físicos, além da diminuição da expectativa de vida (BRUM, ROLIM, BACURAU & MEDEIROS, 2006; KATZ, 2002). Apesar dos grandes avanços no entendimento e no tratamento da insuficiência cardíaca nos últimos anos, a mortalidade dos pacientes permanece elevada. Essa mortalidade é conseqüente à progressão da disfunção ventricular que culmina em choque cardiogênico ou, subitamente, em arritmias ventriculares graves (KATZ, 2003).

No estágio inicial da insuficiência cardíaca, a hiperativação neuro-hormonal, caracterizada pela ativação do sistema nervoso simpático e sistema renina angiotensina, desencadeia respostas compensatórias como taquicardia, aumento da contratilidade miocárdica, hipertrofia cardíaca (excessivo crescimento celular) e remodelamento cardíaco (alteração na razão volume/espessura da parede do VE) na tentativa de manter o débito cardíaco necessário para suprir as demandas energéticas e metabólicas do organismo (FRANCHINI, 1998). Entretanto, cronicamente, estas alterações neuro-hormonais acarretam em disfunção ventricular, aumento do consumo de oxigênio pelo miocárdio, aumento da resistência vascular e aumento da frequência e gravidade de arritmias cardíacas (FRANCHINI, 1998; STEIN, KARAGOUNIS, ANDERSON, KLIGFIELD & LERMAN, 1995). Por essa razão, a ativação neuro-hormonal contribui de maneira significativa para os sintomas da síndrome, assim como para a alta mortalidade associada.

¹ Fonte: *American Heart Association*. Dados disponíveis no site www.americanheart.org

² Fonte: MS/Funasa/Cenepi-Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Dados disponíveis no site do DATA-SUS: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/sim/obtmmap.htm>

Em detrimento a hiperativação de fatores neuro-hormonais na insuficiência cardíaca, a progressão da síndrome também é caracterizada por uma série de anormalidades celulares associadas à disfunção ventricular. Desde meados da década de 80, quando Paul Simpson inicialmente demonstrou que a estimulação neuro-hormonal em cultura de cardiomiócitos resultava em hipertrofia dos mesmos (SIMPSON, 1983), reprogramação gênica e ativação de proteínas quinases, o estudo de anormalidades celulares associadas à disfunção ventricular tornou-se grande foco de interesse para o entendimento dos mecanismos celulares responsáveis pela deterioração cardíaca na progressão da insuficiência cardíaca (SADOSHIMA & IZUMO, 1993; SHUBEITA, MCDONOUGH, HARRIS, KNOWLTON, GLEMBOTSKI, BROWN & CHIEN, 1990).

2.2 Amplificação do sinal celular

A função contrátil e estrutura do cardiomiócito são moduladas pela ativação de cascatas de sinalizações intracelulares reguladas por estímulos mecânicos e neuro-hormonais tais como estiramento do cardiomiócito, adrenalina, noradrenalina, angiotensina II e aldosterona (DORN & FORCE, 2005). Estas vias amplificam sinais extracelulares captados por receptores de membrana por meio da ativação de uma série de proteínas acopladas à membrana celular, resultando em clivagem de fosfolipídios de membrana e ativação de proteínas quinases e fosfatases. Estas vias de regulação em cadeia são capazes de controlar processos de diferenciação, desenvolvimento e crescimento do músculo cardíaco (NISHIZUKA, 1992; RYBIN & STEINBERG, 1994; STEINBERG, GOLDBERG & RYBIN, 1995). Além disso, durante a progressão e agravamento das doenças do sistema cardiovascular, a ativação de cascatas de sinalização intracelular modula a contratilidade miocárdica, o remodelamento cardíaco e a reprogramação gênica (DORN & FORCE, 2005). Cabe ressaltar que essas vias de sinalização são reguladas por fosforilação de seus componentes por diferentes proteínas quinases.

As proteínas quinases são proteínas intracelulares capazes de fosforilar resíduos serina/treonina de substratos celulares como receptores, canais, trocadores, proteínas estruturais, contráteis e fatores de transcrição presentes no cardiomiócito (MALHOTRA, KANG, OPAWUMI, BELIZARE & MEGGS, 2001; MOCHLY-ROSEN & GORDON, 1998). A atividade das quinases é dependente da localização, estado de fosforilação e expressão dos substratos na célula. A fosforilação de substratos intracelulares por quinases específicas é um processo primordial para a transdução de sinais extracelulares mediados por hormônios, neurotransmissores e estresse mecânico. Dessa forma, a regulação de substratos por fosforilação é essencial na manutenção da homeostase do cardiomiócito (BRAZ, GREGORY, PATHAK, ZHAO, SAHIN, KLEVITSKY, KIMBALL, LORENZ, NAIRN, LIGGETT, BODI, WANG, SCHWARTZ, LAKATTA, DEPAOLI-ROACH, ROBBINS, HEWETT, BIBB, WESTFALL, KRANIAS & MOLKENTIN, 2004).

Durante a progressão da insuficiência cardíaca, o comprometimento da função contrátil cardíaca dado pela deficiência no controle da liberação e captação de cálcio, desorganização sarcomérica, hipertrofia do cardiomiócito e acúmulo de tecido fibroso é mediado e propagado pela ativação de diferentes proteínas quinases. Dentre as proteínas quinases relacionadas às alterações funcionais e estruturais cardíacas decorrentes da progressão da insuficiência cardíaca, a família das PKCs destaca-se uma vez que diferentes isoformas de PKC parecem exercer efeitos antagônicos no desenvolvimento e progressão da disfunção ventricular esquerda e remodelamento cardíaco observados na insuficiência cardíaca (PALANIYANDI, SUN, FERREIRA & MOCHLY-ROSEN, 2009).

2.3 Proteína Kinase C

A família das PKCs é constituída de serina/treonina quinases com ampla homologia no sítio catalítico (região C-terminal). Estas isoenzimas estão envolvidas em eventos de transdução de sinais respondendo a estímulos hormonais, neuronais e fatores de crescimento específicos. A

família das PKCs constitui-se de 12 isoformas, classificadas em três diferentes subfamílias de acordo com a afinidade do domínio regulatório (região N-terminal) pelo substrato ativador. As isoformas clássicas (PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ) são reguladas por Ca⁺⁺, fosfatidilserina, diacilglicerol (DAG) e éster de forbol (PMA). As isoformas novas (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ) são reguladas por fosfatidilserina, DAG e PMA, ou seja, não são ativadas por Ca²⁺. Por fim, as isoformas atípicas (PKC ξ , PKC τ , PKC λ) são reguladas por ceramida e fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato. As diferentes isoformas de PKC estão distribuídas em diversos tecidos, demonstrando diferenças funcionais de acordo com sua localização intracelular (MOCHLY-ROSEN & GORDON, 1998).

Alguns anos atrás foi descoberta a presença de diferentes isoformas de PKC no tecido cardíaco (DORN & FORCE, 2005), sugerindo que cada isoforma exerce uma função específica no cardiomiócito devido a sua localização intracelular, disponibilidade de substratos e interação com as proteínas ancoradoras de PKC (MOCHLY-ROSEN, 1995). Estudos utilizando microscopia confocal demonstraram uma distribuição diversificada e específica das diferentes isoformas de PKC no cardiomiócito (MOCHLY-ROSEN & GORDON, 1998). Na forma inativa, a maior parte das PKCs localiza-se no citossol, ancoradas a estruturas subcelulares. Quando ativadas, estas se translocam para distintas regiões celulares. Por exemplo, a PKC β II inativa está associada a estruturas miofibrilares do cardiomiócito e se transloca para o perinúcleo e membrana celular quando ativada (DISATNIK, BURAGGI & MOCHLY-ROSEN, 1994). Na mesma célula, a PKC ϵ na forma inativa localiza-se na região nuclear, translocando-se para estruturas miofibrilares, perinúcleo e regiões de interação célula-célula quando ativada (CSUKAI, CHEN, DE MATTEIS & MOCHLY-ROSEN, 1997).

Atualmente, sabe-se que a ativação de diferentes isoformas de PKC está relacionada a uma série de processos fisiológicos e patológicos, tais como: diferenciação e proliferação celular, apoptose, ativação de macrófagos, desenvolvimento de resistência à insulina, regulação da contratilidade miocárdica, disfunção ventricular e hipertrofia cardíaca.

2.4 Receptores de PKC ativada (RACK)

A localização seletiva e ativação das PKCs são essenciais para a fosforilação de substratos específicos e amplificação do sinal intracelular. Mochly-Rosen foi a primeira a propor que as PKCs ligam-se seletivamente às diferentes proteínas ancoradoras de PKC ativadas (RACKs - receptores de PKC ativada), conferindo maior atividade catalítica e especificidade ao seu substrato (MOCHLY-ROSEN, KHANER & LOPEZ, 1991). As RACKs são proteínas localizadas na membrana celular e região perinuclear capazes de ligar-se às PKCs ativadas por ligações fosfatidilserinas e interações proteína-proteína. A RACK e sua isoforma de PKC correspondente são facilmente co-imunoprecipitadas na presença de ativadores de PKC.

Até o presente momento duas RACKs já foram clonadas e caracterizadas. A RACK1 está co-localizada com a PKC β II ativada na região perinuclear do cardiomiócito. Já a RACK2, está co-localizada com a PKC ϵ ativada nas regiões de interação célula-célula, miofibrilas e perinúcleo do cardiomiócito. Uma vez ligada a RACK, a PKC tem maior facilidade em fosforilar seu substrato e propagar um sinal celular específico. No entanto, vale ressaltar que as RACKs não são substratos das PKCs.

A quebra da interação seletiva proteína-proteína entre a PKC e sua RACK específica altera o posicionamento intracelular da isoenzima e resulta em inibição da propagação do sinal. Dessa forma, uma maneira eficaz de inibir ou ativar uma quinase específica é alterar sua capacidade de ligação a sua proteína ancoradora.

2.5 Ativação das diferentes isoformas de PKC na insuficiência cardíaca

Atualmente, sabe-se que isoformas específicas de PKCs estão ativadas e hiper-expressas em modelos de isquemia, cardiomiopatia dilatada e hipertrofia cardíaca induzida por fenilefrina (DORN & FORCE, 2005). Entretanto, devido à elevada homologia entre as diferentes isoformas de PKC, torna-se difícil avaliar a participação individual destas na progressão da

insuficiência cardíaca. Sendo assim, modelos transgênicos de camundongos foram desenvolvidos para tentar elucidar melhor a participação destas isoformas na função e estrutura cardíaca.

BRAZ, BUENO, DE WINDT & MOLKENTIN (2002), utilizando estudo *in vitro*, constataram que cardiomiócitos transfectados com adenovírus contendo atividade constitutiva para a isoforma PKC α desenvolveram hipertrofia com aumento da expressão de genes marcadores de hipertrofia, como fator natriurético atrial. Em contraste, o mesmo grupo de pesquisadores dois anos mais tarde observou que camundongos com inativação gênica ou hiperexpressão da isoforma PKC α apresentaram hipertrofia cardíaca de magnitude comparável a dos camundongos controle frente ao estímulo de sobrecarga pressórica (BRAZ, GREGORY, PATHAK, ZHAO, SAHIN, KLEVITSKY, KIMBALL, LORENZ, NAIRN, LIGGETT, BODI, WANG, SCHWARTZ, LAKATTA, DEPAOLI-ROACH, ROBBINS, HEWETT, BIBB, WESTFALL, KRANIAS & MOLKENTIN, 2004). Além disso, a inativação e hiperexpressão da isoforma PKC α apresentaram efeitos antagônicos no controle da contratilidade cardíaca, resultando em melhora e prejuízo da função contrátil, respectivamente. Este estudo sugere que a isoforma PKC α não controla o remodelamento cardíaco, entretanto, modula a função contrátil cardíaca por meio da regulação da atividade da SERCA (cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático) pelo eixo fosfolambam/fosfatase1 (BRAZ, GREGORY, PATHAK, ZHAO, SAHIN, KLEVITSKY, KIMBALL, LORENZ, NAIRN, LIGGETT, BODI, WANG, SCHWARTZ, LAKATTA, DEPAOLI-ROACH, ROBBINS, HEWETT, BIBB, WESTFALL, KRANIAS & MOLKENTIN, 2004).

Para estudar o papel das isoformas PKC β I/II no coração, diferentes modelos de animais transgênicos foram descritos até o presente momento na literatura. WAKASAKI, KOYA, SCHOEN, JIROUSEK, WAYS, HOIT, WALSH & KING (1997) observaram que camundongos transgênicos que hiperexpressam a isoforma PKC β II no miocárdio desenvolvem cardiomiopatia dilatada com hipertrofia cardíaca, disfunção ventricular e aumento reativação da expressão de genes fetais. BOWMAN, STEINBERG, JIANG, GEENEN,

FISHMAN & BUTTRICK (1997) descreveram que a hiperexpressão da isoforma PKC β II ativada na fase neonatal é letal. Já na fase adulta, essa hiperexpressão resulta em hipertrofia cardíaca, disfunção ventricular e reprogramação gênica. INAGAKI, IWANAGA, SARAI, ONOZAWA, TAKENAKA, MOCHLY-ROSEN & KIHARA (2002a) observaram que ratos com sobrecarga pressórica apresentavam aumento da expressão e atividade da isoforma PKC β II durante a hipertrofia cardíaca descompensada e, após oito semanas de tratamento com antagonista do receptor de Ang II, subtipo AT₁, esses valores voltavam ao normal com melhora da função ventricular esquerda. GU & BISHOP (1994) observaram que a expressão protéica da isoforma PKC β II está aumentada em modelo de cardiomiopatia induzida por coartação da aorta. BOWLING, WALSH, SONG, ESTRIDGE, SANDUSKY, FOUTS, MINTZE, PICKARD, RODEN, BRISTOW, SABBAH, MIZRAHI, GROMO, KING & VLAHOS (1999) constataram aumento da atividade e expressão das isoformas dependente de cálcio (PKC β I/II) em coração de humanos em estágio final de cardiomiopatia dilatada. Em contrapartida, ROMAN, GEENEN, LEITGES & BUTTRICK (2001) observaram que camundongos com inativação gênica das isoformas PKC β I/II submetidos a dois diferentes modelos de estresse cardiovascular, infusão de fenilefrina e coartação da aorta, não apresentaram diferença significativa na hipertrofia e função cardíacas comparados ao grupo de camundongos controle, sugerindo que as isoformas PKC β I/II não participam no processo de remodelamento cardíaco observado em diferentes modelos de estresse cardiovascular. Dessa forma, os dados da literatura baseados em estudos *in vitro*, modelos de animais geneticamente modificados e modelos de cardiomiopatia induzida por estresse cardiovascular apresentam resultados bastante controversos em relação à participação das isoformas PKC β I/II no remodelamento e função cardiovascular. Além disso, há escassez de trabalhos que elucidem os mecanismos celulares pelos quais as diferentes isoformas de PKC participam da regulação da função cardíaca e desenvolvimento da hipertrofia cardíaca na insuficiência cardíaca.

Camundongos transgênicos para a isoforma PKC δ ainda não foram descritos na literatura. Entretanto, já está bem caracterizado na literatura a hiperexpressão e participação da isoforma PKC δ na isquemia cardíaca, onde a administração de peptídeos inibidores da isoforma PKC δ após o processo de isquemia é capaz de diminuir a área infartada e melhorar a função contrátil cardíaca pela inibição de vias pró-apoptóticas cardíaca (MURRIEL, CHURCHILL, INAGAKI, SZWEDA & MOCHLY-ROSEN, 2004). Ao contrário da miocardiopatia isquêmica, pouco se sabe sobre a participação da isoforma PKC δ na insuficiência cardíaca (DORN & FORCE, 2005). Trabalhos realizados com animais transgênicos que expressam peptídeos capazes de ativar ou inibir a isoenzima PKC δ demonstram um efeito pró-hipertrófico desta em corações sem estímulos neuro-hormonais ou mecânicos (CHEN, HAHN, WU, CHEN, LIRON, SCHECHTMAN, CAVALLARO, BANCI, GUO, BOLLI, DORN & MOCHLY-ROSEN, 2001). Entretanto, ainda há necessidade de um maior número de estudos para que o papel da isoenzima PKC δ no remodelamento cardíaco seja melhor compreendido.

A isoenzima PKC ϵ é a isoforma mais bem caracterizada na hipertrofia cardíaca. Ativada por uma série de fatores neuro-humorais e mecânicos como ativação de receptores acoplados à proteína Gq, receptores tirosina quinase e estiramento do cardiomiócito, a isoforma PKC ϵ parece participar no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca na fase compensada da cardiomiopatia. TAKEISHI, PING, BOLLI, KIRKPATRICK, HOIT & WALSH (2000) constataram que camundongos transgênicos que hiperexpressavam a isoforma PKC ϵ desenvolveram hipertrofia cardíaca com função ventricular normal. MOCHLY-ROSEN, WU, HAHN, OSINSKA, LIRON, LORENZ, YATANI, ROBBINS & DORN (2000), observaram as mesmas alterações na ultraestrutura cardíaca em modelo de camundongos transgênicos que hiperexpressavam peptídeos ativadores da isoforma PKC ϵ . Em contrapartida, camundongos transgênicos que hiperexpressavam peptídeos inibidores da isoforma PKC ϵ desenvolveram insuficiência cardíaca perinatal letal com hipoplasia miocárdica, sugerindo dessa forma, a participação imprescindível da isoforma PKC ϵ no crescimento cardíaco fisiológico (MOCHLY-ROSEN,

WU, HAHN, OSINSKA, LIRON, LORENZ, YATANI, ROBBINS & DORN, 2000). WU, TOYOKAWA, HAHN & DORN (2000) observaram que a hiperexpressão da isoforma PKC ϵ revertia o remodelamento cardíaco patológico e a disfunção ventricular esquerda desenvolvida por camundongos transgênicos que co-expressavam a proteína Gq. INAGAKI, IWANAGA, SARAI, ONOZAWA, TAKENAKA, MOCHLY-ROSEN & KIHARA (2002a) observaram que ratos com sobrecarga pressórica apresentavam aumento da expressão e atividade da isoforma PKC ϵ durante a hipertrofia cardíaca compensada com manutenção da função ventricular esquerda e, após oito semanas de tratamento com antagonista do receptor de Ang II, subtipo AT $_1$, os valores referentes à expressão e atividade da isoforma PKC ϵ foram semelhantes ao grupo controle. Além disso, os ratos com sobrecarga pressórica tratados com valsartan não desenvolveram hipertrofia cardíaca, sugerindo dessa forma que a hipertrofia cardíaca observada na fase inicial da insuficiência cardíaca poderia ser mediada pela translocação da isoforma PKC ϵ via ativação do sistema renina-angiotensina. BOWLING, WALSH, SONG, ESTRIDGE, SANDUSKY, FOUTS, MINTZE, PICKARD, RODEN, BRISTOW, SABBAH, MIZRAHI, GROMO, KING & VLAHOS (1999) não observaram alteração da atividade e expressão da isoforma PKC ϵ em coração de humanos com insuficiência cardíaca grave. Dessa forma, a isoforma PKC ϵ parece estar relacionada ao crescimento cardíaco fisiológico e a hipertrofia cardíaca compensada, onde se observa aumento da massa cardíaca sem prejuízo na função contrátil.

2.6 Inibidores e ativadores das diferentes isoformas de PKC

A grande limitação no entendimento das diferentes isoformas de PKC e sua contribuição na sinalização celular de diferentes processos fisiopatológicos consiste na falta de inibidores e ativadores específicos para cada PKC, uma vez que as diferentes isoenzimas apresentam elevada homologia. Sendo assim, grande parte dos estudos publicados na literatura referentes às PKCs em respostas celulares não diferenciam o papel das

diferentes PKCs, uma vez que não consideram a variedade e a particularidade de cada isoforma. Atualmente, uma série de inibidores farmacológicos de PKCs está disponível no mercado. Entretanto, como se pode depreender da TABELA 1, esses fármacos não são seletivos para PKC-isoforma específica, além de apresentarem grande efeito citotóxico.

Tabela 1 - Inibidores farmacológicos de PKCs disponíveis no mercado e seus respectivos IC₅₀ para cada isoforma específica

Inibidores de Proteína quinase C (IC₅₀ valores estão em nM)										
Inibidores	PKC _α	PKC _{βI}	PKC _{βII}	PKC _γ	PKC _δ	PKC _ε	PKC _ξ	PKC _η	PKC _μ	Referências
Bisindolylmaleimide I	0.008	0.018	-	-	0.21	0.132	5.8	-	-	Martiny-Baron G. et al. 1993. <i>JBC</i> 268
GSP41251	0.024	0.017	0.032	0.018	0.360	4.50	>100	0.060	-	Maria, B. et al. 1994. <i>Cell Growth Differ</i> , 5
Gö 6976	0.002	0.006	-	-	-	-	-	-	0.02	Martiny-Baron G. et al. 1993. <i>JBC</i> 268
Gö 6983	0.007	-	-	0.006	0.01	-	0.06	-	20	Gochowitz, M. et al. 1994. <i>FEBS</i> 77
LY333531	0.360	0.004	0.005	0.400	0.250	0.600	>10 ³	0.052	-	Jirasek, M.R. et al. 1994. <i>JMC</i> 39
PKCβ inhibitor	0.331	0.021	0.005	>10	-	2.8	-	-	-	Tamkin, M. et al. 2004. <i>BMJ</i> 14
Ro-31-7549	0.053	0.195	0.163	0.213	-	0.175	-	-	-	Wilkinson, S. et al. 1993. <i>Stochim. J.</i> , 294
Ro-31-8220	0.005	0.024	0.014	0.027	-	0.024	-	-	-	Wilkinson, S. et al. 1993. <i>Stochim. J.</i> , 294
Ro-31-8425	0.008	0.008	0.014	0.013	-	0.039	-	-	-	Wilkinson, S. et al. 1993. <i>Stochim. J.</i> , 294
Ro-32-0432	0.009	0.028	0.031	0.037	-	0.108	-	-	-	Wilkinson, S. et al. 1993. <i>Stochim. J.</i> , 294
Rottlerin	30	-	-	40	3-6	100	100	-	-	Gochowitz, M. et al. 1994. <i>BBR</i> 5, 199
Staurosporine	0.028	0.013	0.011	0.032	0.028	0.025	>1.5	-	-	Wilkinson, S. et al. 1993. <i>Stochim. J.</i> , 294
UCN01	0.029	0.034	-	0.030	0.590	0.530	-	-	-	Seymour, C. et al. 1994. <i>Mol. Pharmacol</i> 46

Após a identificação das RACKs e de sua especificidade na interação com a PKC, assim como a identificação de regiões auto-regulatória nas diferentes isoenzimas, tornou-se possível desenhar peptídeos ativadores e inibidores das diferentes isoformas de PKC com grande seletividade e especificidade, o que propiciará melhor compreensão do papel de cada isoforma em diferentes processos patológicos.

A identificação de domínios conservados ao longo da evolução e a detecção de regiões auto-regulatória no domínio regulatório da PKC foram ferramentas-chave para o melhor entendimento das adaptações conformacionais da PKC nos estados ativo e inativo. A descrição de seqüências conhecidas como pseudo-substratos foi primordial para se entender a interação intramolecular entre os domínios regulatório e catalítico das diferentes isoformas de PKC responsável pela manutenção das quinases no estado ativo e inativo (KOBÉ, HEIERHORST & KEMP, 1997). Mochly-Rosen foi a primeira a desenvolver peptídeos sintéticos correspondentes à seqüência pseudo-substrato da PKC capazes de ativar ou inibir a atividade da quinase.

Peptídeos que desestabilizam a interação entre o pseudo-substrato e o sítio de ligação da RACK na PKC promovem um desalinhamento conformacional em que o domínio catalítico torna-se desbloqueado, resultando em ativação da PKC. Um exemplo é o pseudo- ϵ RACK ($\psi\epsilon$ RACK), um octapeptídeo agonista seletivo da isoforma PKC ϵ . DORN, SOUROUJON, LIRON, CHEN, GRAY, ZHOU, CSUKAI, WU, LORENZ & MOCHLY-ROSEN (1999) observaram que corações isolados de camundongos que hiperexpressavam o $\psi\epsilon$ RACK aumentavam em 20% a atividade da PKC ϵ e promoviam cardioproteção após isquemia cardíaca. Além disso, o $\psi\epsilon$ RACK não alterou a expressão protéica da isoforma PKC ϵ e não modificou a atividade das outras isoformas de PKC, comprovando a grande seletividade do peptídeo.

Ao contrário dos peptídeos ativadores, peptídeos que bloqueiam a interação entre PKC e sua respectiva RACK são capazes de inibir seletivamente a atividade da isoenzima. STEBBINS & MOCHLY-ROSEN (2001) descreveram que a região V5 da isoforma PKC β II apresenta um sítio específico de ligação à RACK1 e a utilização de peptídeos sintéticos referentes à região V5 foram capazes de inibir a translocação da isoforma PKC β II em cardiomiócitos tratados com PMA (ativador de PKC) (FIGURA 1). Cabe ressaltar que estes peptídeos inibiam somente a translocação da isoforma PKC β II, não alterando a atividade das outras isoformas de PKC.

FIGURA 1 - Modelo ilustrativo de ativação e inibição da isoforma PKCβII. (A) Ativada por éster de forbol (PMA), fosfatidilserina (PS) ou diacilglicerol (DAG), a isoforma PKCβII altera sua estrutura conformacional para a forma ativa, expõe o sítio de interação com a RACK1, interage com a RACK1, e facilita a fosforilação dos substratos. (B) A utilização de peptídeos inibidores específicos para a PKCβII (semelhantes à sequência de aminoácidos presentes na PKCβII que se liga à RACK) inibe a interação PKCβII – RACK1. Essa interação resulta na diminuição da fosforilação dos substratos pela PKCβII e redução na propagação do sinal celular. (C) Domínios regulatórios e catalíticos das isoformas de PKC βI e βII. Uma vez que as isoformas de PKC βI e βII são produtos de *splicing* do mesmo gene e diferem somente no domínio V5 da região C-terminal, a única forma de desenhar inibidores seletivos para cada isoforma foi descobrir seqüências nessa região responsáveis pela interação PKCβII – RACK1. Adaptado de E.

Stebbins, D. Mochly-Rosen e col., 2001 (STEBBINS & MOCHLY-ROSEN, 2001).

A vantagem de utilizar peptídeos inibidores e ativadores de diferentes isoformas de PKC é a possibilidade de estudar cada isoenzima isoladamente em situações patológicas, como na insuficiência cardíaca. Além disso, ao contrário dos modelos de camundongos transgênicos para as diferentes isoformas de PKC, onde se observa aumento da expressão e atividade das isoenzimas em até 20 vezes além de balanços contra-regulatórios na expressão de outros genes, os peptídeos inibidores e ativadores regulam a atividade das isoformas de PKC em faixas denominadas fisiológicas.

Considerando-se o fato de que os níveis e a atividade da isoforma PKC β II estão elevados em humanos portadores de insuficiência cardíaca e em diferentes modelos experimentais de cardiomiopatia, e que animais transgênicos que hiperexpressam essa isoforma desenvolvem insuficiência cardíaca, hipotetizamos que a utilização de peptídeos inibidores específicos para as isoformas PKC β II (β II_{V5-3}) no tratamento da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio melhoraria a função ventricular e reverteria o quadro de insuficiência cardíaca. Para isso, utilizamos um modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, uma vez que 70% dos casos de insuficiência cardíaca em humanos são decorrentes desta etiologia (GHEORGHIADÉ & BONOW, 1998). Além disso, testamos a inibição específica das PKC β II ou PKC β I em outro modelo de insuficiência cardíaca decorrente da hipertensão arterial em ratos. Vale a pena ressaltar que a utilização de peptídeos inibidores específicos para cada isoforma de PKC se faz interessante e necessária, pois poderá contribuir para futuras estratégias de prevenção e terapia da insuficiência cardíaca.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o efeito da administração de peptídeo inibidor da isoforma PKC β II na função e estrutura cardíaca de ratos com insuficiência cardíaca de diferentes etiologias: isquêmica e hipertensiva.

3.2 Específicos

3.2.1 Caracterizar a progressão da disfunção cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos. Para isso avaliamos:

3.2.1.1 A função ventricular por ecocardiograma 3, 7, 14, 28, 42 e 70 dias após a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior;

3.2.1.2 O remodelamento cardíaco 28 dias após a isquemia do miocárdio;

3.2.1.3 A função ventricular por canulação do ventrículo esquerdo 28 dias após a isquemia do miocárdio;

3.2.1.4 A tolerância à realização de esforço físico 28 dias após a isquemia do miocárdio;

3.2.1.5 O consumo de oxigênio 28 dias após a isquemia do miocárdio;

3.2.2 Caracterizar as diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica. Para isso avaliaremos em animais dos grupos *sham* e insuficiência cardíaca:

3.2.2.1 A expressão protéica das diferentes isoformas de PKC no coração;

3.2.2.2 A translocação das diferentes isoformas de PKC no coração;

3.2.2.3 A atividade da PKC β II no coração;

3.2.3 Estudar em ratos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, tratados com TAT ou inibidor da isoforma PKC β II, e ratos *sham* tratados com TAT:

3.2.3.1 A curva de sobrevida no período do experimento;

3.2.3.2 A tolerância à realização de esforço físico;

3.2.3.3 A função ventricular *in vivo* e *ex vivo*;

3.2.3.4 O diâmetro dos cardiomiócitos e acúmulo de colágeno cardíaco;

3.2.3.5 A infiltração de células inflamatórias e degranulação de mastócitos;

3.2.3.6 A expressão protéica das diferentes isoformas de PKC no coração;

3.2.3.7 A translocação das diferentes isoformas de PKC no coração;

3.2.3.8 A atividade da PKC β II no coração;

3.2.3.9 A contratilidade de cardiomiócitos isolados;

3.2.3.10 A interação entre a PKC β II e a troponina I cardíaca;

3.2.3.11 O transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados;

3.2.4 Estudar em ratos com insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva tratados com TAT, ou inibidor da isoforma PKC β I ou inibidor da isoforma PKC β II, e ratos controle:

3.2.4.1 A curva de sobrevida no período do experimento;

3.2.4.2 A função ventricular *in vivo*;

3.2.4.3 A pressão arterial;

3.2.4.4 A morfometria cardíaca;

3.2.4.5 A expressão protéica das diferentes isoformas de PKC;

3.2.4.6 A translocação das diferentes isoformas de PKC;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostra

Para os estudos realizados com o modelo animal de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos entre oito e 12 semanas de vida provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para os estudos realizados com o modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos entre seis e 27 semanas de vida provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Stanford, EUA.

Os ratos utilizados foram mantidos em Biotério, com temperatura controlada entre 22 e 25°C, ciclo claro-escuro 12: 12 horas. A inversão do ciclo claro-escuro foi realizada através de um *timer* instalado na sala do Biotério. Água e comida foram administradas *ad libitum*. O controle ponderal

foi acompanhado semanalmente através de balança *Gehaka* durante o período do estudo.

A divisão dos grupos utilizados nesse projeto está descrita na TABELA 2. Como o tratamento dos grupos *sham* e controle com o peptídeo inibidor β IIIV5-3 não houve diferença em relação aos grupos *sham* e controle tratados com TAT, decidimos apresentar somente os dados dos grupos *sham* e controle tratados com TAT.

TABELA 2 - Distribuição da amostra

	Sham	Isquemia
Caracterização da disfunção cardíaca no modelo de isquemia do miocárdio	n=6	n=35

Etiologia isquêmica	Sham	IM-IC
TAT (controle)	n=20	n=20
Inibidor PKCbII (β IIIV5-3)		n=20

Etiologia hipertensiva	Controle	HT-IC
TAT (controle)	n=15	n=20
Inibidor PKCbII (β IIIV5-3)		n=25
Inibidor PKCbII (β IV5-3)		n=25

Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal³. Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da EEFÉUSP (nº 2007/16).

³Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br)

4.2 Modelo de insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio

O infarto do miocárdio foi induzido por meio da técnica descrita por JOHNS & OLSON (1954), em que a artéria coronária esquerda foi ligada provocando importante isquemia miocárdica no ventrículo esquerdo.

4.3 Modelo de insuficiência cardíaca induzida por hipertensão arterial

Para estudar a contribuição das diferentes isoformas de PKC no desenvolvimento da insuficiência cardíaca induzida por hipertensão arterial, ratos sensíveis ao sal (ratos *Dahl Salt*) foram submetidos a uma dieta rica em sal (9% NaCl) a partir da sexta semana de idade por todo o período experimental (sexta – vigésima sétima semana). Está bem caracterizado na literatura que esse modelo animal desenvolve hipertensão arterial logo após o início da dieta rica em sal, apresentando hipertrofia cardíaca compensada com 11 semanas de vida e insuficiência cardíaca com 17 semanas de vida (INAGAKI, IWANAGA, SARAI, ONOZAWA, TAKENAKA, MOCHLY-ROSEN & KIHARA, 2002b). O grupo controle também eram ratos *Dahl salt*, porém tratados com dieta pobre em sal (0,3% NaCl). Os experimentos com esse modelo animal foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen, Depto de Química e Sistemas Biológicos da Universidade de Stanford, CA, EUA como parte do doutorado (doutorado sanduíche programa PDEE-CAPES).

4.4 Tratamento farmacológico

A administração da TAT (controle) e dos peptídeos inibidores das isoformas PKC β I ou PKC β II foi realizada por meio da implantação de mini-bombas osmóticas subcutâneas (Alzet, modelo 2ml2, 50 μ l/hora) no dorso dos ratos. Os peptídeos inibidores da isoforma PKC β I ou PKC β II foram conjugados a uma sequência de peptídeos carreadores (TAT) que facilita a

biodistribuição do peptídeo-alvo subcelularmente (BEGLEY, LIRON, BARYZA & MOCHLY-ROSEN, 2004). A ligação entre a TAT e o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II ocorre por pontes dissulfeto. Uma vez que o meio intracelular é redutor, após o complexo TAT-peptídeo penetrar na célula a ligação entre a TAT e o peptídeo é clivada, liberando o peptídeo para o meio intracelular e eliminando a TAT da célula. Para um controle mais fino nesse projeto, utilizamos como tratamento controle a administração da TAT isolada.

No grupo insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio, o início do tratamento realizou-se quatro semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio, fase em que a insuficiência cardíaca já está estabelecida. No grupo insuficiência cardíaca induzida por hipertensão arterial, o início do tratamento deu-se seis semanas após o início da dieta com 9% de cloreto de sódio em modelo de ratos sensíveis ao sal (*Dahl Salt*). Nesse período, os animais ainda não apresentavam disfunção cardíaca. Os peptídeos e a TAT foram administrados durante seis semanas de tratamento em concentração de 3 mM. As minibombas osmóticas foram trocadas a cada duas semanas de tratamento. Vale a pena ressaltar que os peptídeos foram sintetizados e doados pela Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen, Departamento de Química e Biologia de Sistemas, Universidade de Stanford, CA, USA, a qual foi colaboradora deste projeto.

4.5 Avaliação da função ventricular

A avaliação da função ventricular do grupo insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio foi realizada pré- e pós-período experimental por ecocardiograma em colaboração com a Dra. Jeane Tsutsui e Dr. Wilson Mathias Jr. da Unidade de Ecocardiografia do Instituto do Coração (InCor FM-USP). Já as análises ecocardiográficas dos animais com insuficiência cardíaca induzida por hipertensão arterial foram realizadas na faculdade de Medicina da Universidade de Stanford. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M (monodimensional) da Sociedade Americana de Ecocardiografia

(SAHN, DEMARIA, KISSLO & WEYMAN, 1978). É importante salientar que a acurácia e reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar o tamanho e a função do ventrículo esquerdo em roedores tem sido confirmada em uma série de estudos (SCHERRER-CROSBIE, 2006).

Todos os grupos de animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica transtorácica. Os exames foram realizados por um único observador muito bem treinado em realizar ecocardiograma em ratos. Para cada exame realizado foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média dessas medidas.

O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com isoflurano, mantendo a frequência cardíaca em valores semelhantes entre os grupos para evitar influência da mesma sobre os índices de contratilidade cardíaca. O animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. Imagens do modo-M foram adquiridas a partir do eixo curto-longo paraesternal. Foi utilizado o equipamento Apogee Cx Ultrasound System (ATL Inc., Ambler, PA, USA) com transdutor de 7,5 MHz e três centímetros de profundidade. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultra-som de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA). As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete (Sony SVO-9500 MD), em discos ópticos (Sony 128Mb) e em papel fotográfico gerados através da impressão colorida (Sony, Color Video Printer Mavigraph UP-5600 MDU).

A partir da visualização do ventrículo esquerdo (corte transversal) em três diferentes níveis: basal (nível da valva mitral), médio (nível dos músculos papilares) e apical (acima dos músculos papilares) foi realizado o modo M e obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDiaVE) e sistólico (DSisVE) do ventrículo esquerdo, a espessura do septo interventricular na diástole (SIVDia), a espessura do septo interventricular na sístole (SIVSis) e da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole (PPSis) e diástole (PPDia). Essas medidas foram utilizadas para calcular a fração de encurtamento (FE).

4.6 Cateterização do ventrículo esquerdo

Além das análises ecocardiográficas, avaliamos a função cardíaca dos animais 28 dias após a cirurgia de ligadura da artéria coronária por meio da cateterização do ventrículo esquerdo. Esses experimentos foram realizados para a melhor caracterização da evolução da disfunção cardíaca decorrente da isquemia do miocárdio. Os ratos foram anestesiados com ketamina e xilazina, e colocados em decúbito dorsal. Em seguida realizamos uma incisão no terço inferior da região cervical anterior para a localização da artéria carótida direita e a implantação da cânula de polietileno até o ventrículo esquerdo com contínuo monitoramento da onda pressórica. Os sinais pressóricos foram digitalizados numa frequência de amostragem de 1000 Hz e gravados em sistema data Q. As funções sistólica e diastólica foram avaliadas pelas dP/dt positiva e dP/dt negativa, respectivamente.

4.7 Teste de tolerância ao esforço

Algumas anormalidades cardíacas podem ser aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão. Em trabalhos anteriores de nosso laboratório foi observada uma excelente correlação entre os índices de disfunção cardíaca durante o exercício físico e a fração de encurtamento ventricular mesmo antes dos sinais clínicos em modelo de cardiomiopatia induzida por hiperatividade simpática.

A capacidade máxima de realização do exercício físico foi estimada por meio de um teste progressivo até a exaustão em esteira rolante. Foi realizado um exercício progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, onde a velocidade inicial da esteira foi de seis m/min sem haver inclinação da mesma. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de três m/min até a exaustão do animal. As variáveis medidas foram: tempo total e distância em metros percorrida por cada animal durante o teste máximo. Realizamos os testes pré-e pós-período experimental (tratamento).

4.8 Avaliação do consumo de oxigênio

A medida do consumo de oxigênio foi realizada por meio de um sistema de análise metabólica que consiste na utilização de uma caixa metabólica conectada a um analisador de oxigênio que fornece a concentração de oxigênio no interior da caixa (BROOKS & WHITE, 1978). Foi utilizada uma caixa metabólica (9,5 x 32,5 x 11,5 cm), subdividida internamente na sua porção superior (0,9 cm) por uma placa que possui 64 furos (0,3 cm de diâmetro) e que serve como uma câmara de mistura de gases. A essa câmara foi conectado um tubo na forma de “Y” de onde parte da amostra foi retirada por uma bomba (FANEM, MOD. CAL) e, outra parte, com menor fluxo, por uma bomba do analisador de gases (Sable Systems Subsamplers Version 3, SS-3). A parte da frente da caixa possui uma abertura de 0,2 cm da superfície que permite a entrada de um fluxo de ar unidirecional sugado pelas bombas aspiradoras. Para a determinação do consumo de oxigênio durante a realização do exercício físico, a caixa metabólica foi posicionada sobre uma esteira rolante.

4.9 Sacrifício e coleta de tecidos

Vinte e quatro horas após o último experimento, os animais foram sacrificados por método rápido e livre de sofrimentos prolongados, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br). Após o sacrifício dos ratos, foi realizada a excisão do coração para ulterior pesagem. As amostras foram mantidas em freezer - 70°C para ulterior processamento e realização dos experimentos.

Uma parte dos ratos de cada grupo teve os corações reservados para a análise da expressão protéica e atividade das diferentes isoformas de PKC, e outra parte para a análise morfológica cardíaca. Nestes últimos, os corações foram submetidos à separação das câmaras em átrios, ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE), sendo que o septo ventricular em sua

totalidade fez parte do ventrículo esquerdo. Em seguida, as câmaras foram pesadas separadamente, entretanto, apenas os átrios serão pesados conjuntamente. Logo em seguida, os ventrículos esquerdos foram imediatamente imersos em formalina tamponada (10%) por 48 horas, para posterior processamento histológico. Com exceção da avaliação da área de infarto, todas as análises bioquímicas e morfológicas foram realizadas na área cardíaca livre de infarto.

4.10 Análise da expressão protéica das diferentes isoformas de PKC cardíacas

A análise da expressão cardíaca das diferentes isoformas de PKC foi realizada pela técnica de *Western Blot*. Para isso, as amostras de tecido cardíaco coletadas foram imediatamente homogeneizadas em tampão de extração (150mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 0.1% Triton X100, pH 7.4). Os homogeneizados foram centrifugados por 20 min, a 12000 rpm em temperatura de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar a concentração total de proteínas (BRADFORD, 1976). Então, cada amostra foi diluída em tampão Laemmli (LAEMMLI, 1970) na proporção de 1:1. Cada amostra contendo o Laemmli mais o precipitado foi submetida a uma rotação (spin) de 30 segundos e 20ug de proteína do sobrenadante foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) no aparelho para minigel (Mini-Protean).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose e durou por volta de uma hora sob 120 volts (TOWBIN, OZBEY & ZINGEL, 2001). A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi minimizada pela incubação destas com 10 ml de solução bloqueadora a 4°C por 2 horas na temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas com os anticorpos primários anti-PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ , PKC δ and PKC ϵ na diluição 1:500 (*Santa Cruz Biotechnology, CA, USA*) diluídos em solução bloqueadora a temperatura ambiente por duas horas. Em seguida as mesmas foram lavadas três vezes por dez minutos com solução PBS-T (solução tampão com fosfato e *tween*). As bandas existentes nas membranas

incubadas foram visualizadas por auto-radiografia pós-reação de quimiluminescência. O método da quimiluminescência consiste nos seguintes passos: após incubação da membrana com o anticorpo primário, a membrana é novamente incubada por uma hora com o anticorpo anti-IgG marcado com peroxidase em solução bloqueadora (1:5000). Em seguida, as membranas são lavadas novamente três vezes com solução PBS-T e incubadas com um ml de cada um dos dois reagentes do kit por um minuto, e a seguir os filmes de raio-X são expostos às membranas. Esta exposição pode durar entre meio e dez minutos, dependendo da concentração de proteína da amostra e da sensibilidade do filme de raio-X. Para quantificar a densidade das bandas nas auto-radiografias, as bandas escaneadas foram analisadas utilizando o programa de análise de densitometria óptica *Image J*, fornecido gratuitamente pela *NIH* (USA) via internet.

4.11 Análise da translocação das diferentes isoformas de PKC cardíaca

A análise da translocação cardíaca das diferentes isoformas de PKC foi realizada por meio da técnica de *Western Blot*, conforme descrito acima. Para isso, separamos as frações solúveis e não solúveis ao Triton por ultracentrifugação e avaliamos a concentração protéica das diferentes isoformas de PKC nessas frações. A fração solúvel ao Triton refere-se a fração que contém as membranas celulares. A PKC na forma inativa está ligada aos receptores de PKC inativa (RICK) localizados no citossol. Quando ativada, as diferentes isoformas de PKC translocam-se para a membrana celular e ligam-se aos RACKs, aumentando a afinidade de ligação ao seu substrato. Portanto, na presente tese, a ativação das enzimas foi indiretamente avaliada de acordo com sua localização na membrana em relação ao citossol.

4.12 Imunoprecipitação e avaliação da atividade da PKC β II no lisado cardíaco

Além da avaliação da translocação das diferentes isoformas de PKC para a fração de membrana da célula (triton solúvel), decidimos analisar a atividade da PKC β II no lisado cardíaco dos ratos com insuficiência cardíaca. Para isso, utilizamos um anticorpo PKC β II isoenzima específica (1:100; Santa Cruz *Biotech*). A isoenzima PKC β II foi imunoprecipitada durante três horas (4°C). Em seguida, a mistura foi incubada com *beads* de proteína agarose-G por uma hora (4°C). Na sequência, os imunocomplexos foram lavados três vezes com tampão RIPA (150mM NaCl, 5mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 0.1% Triton X100, pH 7.4) e uma vez com o tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 1 mM DTT e 25 mM ATP). A atividade da isoenzima PKC β II na fração imunoprecipitada foi avaliada adicionando 40 μ L do tampão de ligação contendo 5 μ Ci [γ 32P]ATP (5000 Ci/mole, Amersham) e 10 μ g de *Myelin Basic Protein* (MBP). Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente o ensaio foi bloqueado adicionando o tampão Laemmli. As amostras foram então carregadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 10-12%, e os níveis de fosforilação da MBP foram analisados pela exposição do gel a um filme auto-radiográfico. As bandas foram quantificadas usando o programa *Bio-Rad Fluor-S Multilmager*.

4.13 Avaliação morfométrica cardíaca

Após 48 horas de fixação, o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico habitual, com cortes de quatro micra e coloração por hematoxilina-eosina, tricoma de Masson e picrossírius *red*. A análise morfométrica cardíaca foi realizada através da determinação do tamanho da área infartada, medida do diâmetro dos cardiomiócitos e avaliação do grau de fibrose do miocárdio.

A determinação do tamanho da área de infarto foi realizada em três distintos cortes do ventrículo esquerdo: basal, médio e apical (PFEFFER, PFEFFER, FISHBEIN, FLETCHER, SPADARO, KLONER & BRAUNWALD,

1979; SPADARO, FISHBEIN, HARE, PFEFFER & MAROKO, 1980). A medida do diâmetro transverso dos cardiomiócitos foi realizada em sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500) acoplado a um microscópio óptico com aumento de 400x. Os cardiomiócitos utilizados para medida estavam localizados na área remanescente, ou seja, livre de infarto na parede livre do ventrículo esquerdo e orientados em corte longitudinal. O diâmetro dos cardiomiócitos foi considerado a partir de uma média de 10 valores medidos para cada animal, para determinação do grau de hipertrofia dos mesmos.

Outra parte dos ventrículos esquerdos armazenados em formalina foi destinada à análise quantitativa de colágeno. Os ventrículos esquerdos foram cortados em cinco porções eqüidistantes (anéis) de 5 μ m ao longo de seu eixo maior. Os anéis foram embebidos em parafina e corados com Picrossírius *red*. A seguir, o grau de fibrose do miocárdio foi avaliado pelo método de volumetria de pontos utilizando microscópio óptico. Esta análise teve como objetivo identificar possíveis alterações histopatológicas decorrentes da insuficiência cardíaca e do tratamento com os peptídeos inibidores da isoforma PKC β II.

4.14 Avaliação da infiltração de células inflamatórias, densidade e degranulação de mastócitos

Paralelo a avaliação do remodelamento cardíaco, decidimos analisar a migração de células inflamatórias (leucócitos) para o tecido cardíaco na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, bem como o efeito da inibição sustentada da PKC β II.

Os cortes histológicos, processados conforme descrito acima, foram submetidos à coloração por hematoxilina-eosina para a determinação de infiltração de células inflamatórias. Para a avaliação da densidade de degranulação de mastócitos no tecido cardíaco, os cortes histológicos foram desparafinizados utilizando xileno e etanol, posteriormente reidratados, incubados com 0,05% azul de toluidina por 30 minutos e contra-corados com 0,001% hematoxilina-eosina por um minuto. A densidade de mastócitos foi

quantificada pela contagem do número de células positivas marcadas com azul de toluidina por campo. A degranulação de mastócitos foi avaliada pela diminuição da intensidade da marcação violeta observada em mastócitos, bem como o aumento da marcação ao redor do mastócito, conforme descrito por (PALANIYANDI, INAGAKI & MOCHLY-ROSEN, 2008).

4.15 Reação de imunohistoquímica para fosfo-SMAD2/3

Avaliamos a fosforilação da SMAD2/3 no tecido cardíaco devido ao fato desta proteína estar diretamente relacionada à ativação de vias inflamatórias e aumento da síntese de colágeno cardíaco na insuficiência cardíaca (BUJAK, REN, KWEON, DOBACZEWSKI, REDDY, TAFFET, WANG & FRANGOIANNIS, 2007).

Para a quantificação da SMAD2/3 cardíaca na forma fosforilada utilizamos a técnica de imunohistoquímica. Utilizamos um anticorpo específico para a identificação da SMAD2/3 fosforilada do tipo policlonal coelho (*Santa Cruz Biotechnology, CA, USA*) na diluição 1:100. O controle negativo do método foi realizado omitindo-se o anticorpo primário. A seguir, a técnica será descrita em detalhes.

Preparação dos cortes

Os blocos de tecido cardíaco foram cortados em micrótomo com navalhas descartáveis com espessura de quatro micra e aderidos em lâminas gelatinizadas. As lâminas com os cortes permaneceram na estufa (Fabber-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por duas horas e em seguida foram armazenadas a temperatura ambiente.

Processo de gelatinização das lâminas

Para o preparo da gelatina que serviu de revestimento para as lâminas, 2,5 gramas de gelatina purificada tipo A (*Sigma Chemical Co, St Louis, EUA*) foram adicionados em 500 ml de água destilada a 50°C. Quando esta solução atingiu 30°C, adicionou-se 0,25 gramas de sulfato de potássio crômico (*Sigma Chemical Co, St Louis, EUA*). Em seguida esta solução foi filtrada.

As lâminas foram previamente lavadas em solução de álcool/éter (1:1). Para gelatinizar, as lâminas foram mergulhadas por alguns segundos na solução de gelatina. Para retirar o excesso da solução de gelatina, as lâminas foram inclinadas sobre papel toalha e posteriormente acondicionadas a 4°C.

Desparafinização para reações de imunohistoquímica

Antes de realizar a técnica de imunohistoquímica, as lâminas passaram por um processo de desparafinização. Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol durante nove minutos (três vezes). A seguir, as lâminas foram mergulhadas em álcool absoluto por cinco minutos (duas vezes) e em seguida, em álcool 96% por três minutos (duas vezes). Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada por duas vezes.

Banho em tampão citrato e técnica de micro-ondas

A técnica de micro-ondas foi utilizada para aumentar a exposição antigênica, uma vez que o processo de parafinização pode ocorrer o mascaramento de antígenos no tecido, dificultando assim sua detecção. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1 grama de ácido cítrico mono hidratado dissolvidos em 1000 ml de água destilada, pH 6.0) e levadas para o forno micro-ondas com potência de 2400 watts. Este procedimento foi realizado uma vez durante dez minutos seguido de mais cinco minutos. Finalizando este processo, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS) pH 7.6.

Reação de imunohistoquímica (estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina)

Após a técnica de micro-ondas, foi realizado o bloqueio da avidina endógena por 15 minutos seguido do bloqueio da biotina endógena por 15 minutos e do bloqueio de ligações inespecíficas com soro não-imune de cavalo (*Vector, Burlingame*, EUA) na diluição de 1:70 por 30 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário durante a noite a 4°C. A seguir foram incubados com imunoglobulina biotilina de cabra anti-coelho (*Vector, Burlingame*, EUA) por 30 minutos. Finalmente a coloração foi revelada utilizando 3,3-diaminobenzidina tetra-hidrocloreto (DAB) e a contra-

coloração foi feita com hematoxilina-eosina. As células positivas neste tipo de reação apresentaram cor marrom.

4.16 Avaliação da função ventricular em modelo de coração isolado

Vinte e quatro horas após o período experimental, os animais dos grupos *sham* e insuficiência cardíaca foram heparinizados (2000U/kg IP) e anestesiados com pentobarbital sódico (100mg/kg i.p.). Os corações foram rapidamente retirados e então perfundidos com solução de Krebs-Henseleit oxigenada (120mM NaCl, 5.8mM KCl, 25mM NaHCO₃, 1.2mM NaH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 1.0mM CaCl₂ e 10mM destrose, pH 7.4) em sistema de perfusão coronariana Langendorff. O fluxo coronariano foi mantido constante durante o período do experimento (10 mL/min). Um balão fino de látex foi inserido no ventrículo esquerdo e conectado ao transdutor de pressão (PowerLab/8SP, AD Instruments) para a medida da pressão isovolumétrica do ventrículo esquerdo. O volume do ventrículo esquerdo foi ajustado inicialmente para uma pressão diastólica final de cinco mmHg. O experimento iniciou-se cinco minutos após o equilíbrio, e a pressão ventricular esquerda foi monitorada durante todo o experimento. O efeito da TAT ou β IIIV5-3 no desenvolvimento de pressão cardíaca foi avaliado durante quinze minutos após a administração da TAT (1 μ M) ou β IIIV5-3 (1 μ M) nos animais com insuficiência cardíaca. O grupo *sham* foi avaliado sem administração de peptídeo.

4.17 Isolamento dos cardiomiócitos de ratos adultos

Após o período experimental, os cardiomiócitos ventriculares foram isolados do coração dos ratos do grupo insuficiência cardíaca induzida por isquemia miocárdica e ratos *sham* utilizando um procedimento de digestão enzimática já estabelecido na literatura (BUDAS, SUKHODUB, ALESSI & JOVANOVIC, 2006). Após o sacrifício dos animais, o coração foi rapidamente

perfundido com a solução 1 (2mM EGTA, 100mM NaCl, 10mM KCl, 1.2mM KH_2PO_4 , 5 MgSO_4 , 20mM glicose, 50mM Taurina, 10mM HEPES and 100 μM CaCl_2), seguida pela solução 2 (solução 1 contendo pronase E (8 mg/100 ml), proteinase K (1.7 mg/100 ml), albumina bovina (0.1g/100 ml) e 200 μM CaCl_2). Seguindo a digestão, o coração foi cortado em pequenos cubos (2-5mm³) na solução 1 em temperatura ambiente. Os fragmentos cardíacos foram então transferidos para um *becker* de 50ml contendo a solução 2 suplementada com colagenase (0,5mg/ml) e as células foram isoladas por agitação do tecido por 10 minutos 37°C. As células suspensas foram então filtradas e centrifugadas por um minuto (400xg). O pelete foi então lavado por três vezes na solução um.

4.17.1 Ensaio de contratilidade do cardiomiócito isolado

As propriedades contráteis dos cardiomiócitos foram avaliadas utilizando um sistema de aquisição *video-based sarcomere spacing* (*SarcLen*, *IonOptix*, *Milton*, *MA*). Miócitos quiescentes com a disposição clara das estriações foram escolhidos para as análises contráteis. As células foram colocadas numa câmara de cultura com sistema próprio de estimulação (*Cell MicroControls*, *Norfolk*, *VA*, *EUA*) acoplado ao microscópio invertido (*Nikon TE2000U*, *Nikon*, *Melville*, *NY*, *EUA*), eletricamente estimuladas com voltagem supralimiar de 0.5 Hz e perfundidas com solução tampão HEPES (1mM CaCl_2 , 137mM NaCl, 5.4mM KCl, 15mM destrose, 1.3mM MgSO_4 , 1.2mM NaH_2PO_4 , 20mM HEPES, pH 7.4) a 25°C, conforme descrito anteriormente. Alterações no comprimento do sarcômeros foram gravadas e posteriormente analisadas utilizando o *software Íon Wizard* (*IonOptix*, *Milton*, *MA*, *EUA*).

4.17.2 Avaliação do transiente de cálcio no cardiomiócito isolado

Para a análise do transiente de cálcio, um grupo separado de cardiomiócitos foi carregado com 0,5mM do indicador de fluorescência para cálcio Fura2-acetoxymethyl ester (*Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA*) por 15 minutos, lavado e mantido em temperatura ambiente livre de luz por 40 minutos, com o intuito de permitir a de-esterificação da FURA-2 éster. Os miócitos foram eletricamente estimulados com voltagem supralimiar de 0.5 Hz e perfundidos com solução tampão HEPES (1mM CaCl₂, 137mM NaCl, 5.4mM KCl, 15mM destrose, 1.3mM MgSO₄, 1.2mM NaH₂PO₄, 20mM HEPES, pH 7.4) a 25⁰C. As células foram alternadamente excitadas nos comprimentos de onda 340 e 380nm em freqüências acima de 250 pares/segundo utilizando o sistema *HyperSwitch (IonOptix, Milton, MA, EUA)*. Essa freqüência é independente da geometria celular e intensidade da freqüência de excitação, e reflete as concentrações intracelulares de cálcio. As freqüências de FURA-2 coletadas no comprimento de onda 510nm foram utilizadas para corrigir o *background*.

4.18 Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo estão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média e comparados pela análise de variância de um ou dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. A escolha da análise estatística foi específica para cada experimento. Maiores descrições se encontram nas legendas de cada figura. A porcentagem de sobrevida foi analisada pelo teste de Mantel-Haenszel logrank e modelo de regressão de Cox. Para todas as análises, foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Para o melhor entendimento temporal e causal dos resultados, essa seção será apresentada em três diferentes subseções: 5.1. Caracterização funcional, estrutural e o perfil de expressão e ativação das

diferentes isoformas de PKC no modelo animal de insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio; 5.2. Efeito da terapia com o inibidor da isoforma PKC β II (β IIV5-3) na sobrevida, função cardíaca, remodelamento ventricular e ativação das diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica; e 5.3. Efeito da terapia com os inibidores das isoformas PKC β II (β IIV5-3) ou PKC β I (β IV5-3) na sobrevida, função cardíaca, remodelamento ventricular e ativação das diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva.

5.1 Caracterização fenotípica do modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Uma vez que optamos pelo modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, decidimos realizar, *a priori*, uma caracterização da evolução da disfunção cardíaca após a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior nesse modelo. Para isso, analisamos parâmetros funcionais e morfológicos ao longo de dez semanas subsequentes à cirurgia de ligadura da coronária. Realizamos essa análise para determinar em que momento após a cirurgia, os animais manifestam sinais clínicos de insuficiência cardíaca.

5.1.1 Alterações funcionais e estruturais cardíacas ao longo de 70 dias após isquemia do miocárdio

A FIGURA 2A ilustra o modelo esquemático utilizado para a caracterização da evolução da disfunção cardíaca após a cirurgia de ligadura da artéria coronária. A FIGURA 2B apresenta a progressão da disfunção cardíaca ao longo do tempo nesse modelo de cardiomiopatia induzida por ligadura da coronária. Os animais já apresentavam redução significativa da função contrátil cardíaca, avaliada por ecocardiograma, aos três dias após a

cirurgia. Essa redução foi agravando-se ao longo dos 70 dias. Na FIGURA 2C pode-se observar nitidamente a dilatação ventricular apresentada por um animal 28 dias após a cirurgia quando comparado com o animal do grupo controle (*sham*). Além disso, observamos um significativo aumento do peso ventricular esquerdo, hipertrofia dos cardiomiócitos, acúmulo de colágeno cardíaco (FIGURA 2D), e disfunções inotrópica e lusitrópica cardíacas (FIGURA 2E) aos 28 dias após a cirurgia. Constatamos também nesse período, outros sinais clínicos de insuficiência cardíaca como intolerância ao esforço físico e diminuição significativa do consumo máximo de oxigênio (FIGURA 2F). Com base nesses achados, sugerimos que quatro semanas após a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior, os animais apresentam insuficiência cardíaca.

* Diferença significativa vs. dia 0; * diferença vs. sham.

Diferença significativa vs. dias 3 e 7.

FIGURA 2 - Caracterização fenotípica do modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC). A, Modelo esquemático utilizado na caracterização da insuficiência cardíaca; B, Fração de encurtamento dos animais durante os diferentes dias após a cirurgia de oclusão da artéria descendente anterior esquerda; C, Ilustração ecocardiográfica de dois animais (*Sham*, esquerda e insuficiência cardíaca, direita); D, Avaliação morfológica cardíaca aos 28 dias após a cirurgia de infarto do miocárdio; E, Análise das funções sistólica (dP/dt positiva, derivada da pressão positiva/derivada do tempo) e diastólica (dP/dt negativa, derivada da pressão negativa/derivada do tempo) cardíacas através da canulação direta do ventrículo esquerdo dos ratos aos 28 dias após a cirurgia de infarto; F, Avaliação da distância total percorrida e do consumo de oxigênio máximo obtido no teste progressivo de esforço físico em esteira rolante dos ratos aos 28 dias após a cirurgia de infarto. Utilizamos para todas as avaliações no mínimo quatro animais por grupo. Para a análise estatística do painel B utilizamos análise de variância de um caminho (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey. Para as outras análises utilizamos teste *t* de *Student* para dados não pareados. Diferença significativa $P < 0,05$.

5.1.2 Caracterização das diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Após a constatação do agravamento da disfunção cardíaca ao longo do tempo em ratos que sofreram a cirurgia de ligadura da artéria coronária, decidimos realizar uma caracterização da expressão e translocação das diferentes isoformas de PKC no tecido cardíaco desses animais.

A FIGURA 3 reúne os resultados encontrados nessa caracterização. Como se pode observar na FIGURA 3A, 70 dias após a cirurgia de ligadura da artéria coronária, os animais apresentaram a

expressão das isoformas clássicas e novas de PKC semelhantes às das respectivas isoformas do grupo *sham*.

Além de avaliar a expressão das diferentes isoformas de PKC, analisamos também a translocação dessas isoformas para a fração membranar da célula. Quando ativadas por fosfatidilserinas, as diferentes isoformas de PKC translocam-se do citoplasma para regiões específicas da célula, como microdomínios presentes nas membranas, e fosforilam seus respectivos substratos. Utilizando ultracentrifugação, realizamos o fracionamento do tecido cardíaco em fração total e fração solúvel ao triton (detergente) e analisamos os níveis de translocação das diferentes isoformas de PKC. A razão entre os níveis presentes na fração triton solúvel e os níveis totais reflete a translocação das PKCs, uma vez que a fração solúvel ao triton acumula todas as membranas celulares.

Como se pode observar na FIGURA 3A, dentre as diferentes isoformas de PKC analisadas, somente a isoforma PKC β II apresentou aumento significativo da translocação para a membrana celular no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica. Mesmo a isoforma PKC β I, que apresenta 90% de homologia com a isoforma PKC β II, não apresentou alteração na translocação para a membrana. Esses dados corroboram os dados da literatura avaliados em outros modelos de IC, demonstrando que a translocação da isoforma PKC β II está elevada na insuficiência cardíaca. As FIGURAS 3B e C mostram que a expressão total da isoforma PKC β II não está alterada nesse modelo, entretanto sua translocação está aumentada em 2,4 vezes em relação ao grupo *sham*.

Para confirmarmos que a translocação da PKC β II para a fração de membrana reflete uma maior ativação desta isoenzima, resultando em aumento da fosforilação dos seus substratos, decidimos avaliar a atividade da isoforma PKC β II na fração membranar. Para isso, utilizamos o método de imunoprecipitação e ensaio de atividade para a PKC β II. Resumidamente, a atividade da PKC β II foi avaliada no tecido cardíaco de ratos 70 dias após a cirurgia de ligadura da artéria coronária. 250 μ g de proteínas presentes na fração triton solúvel foram usadas para imunoprecipitar a isoforma PKC β II.

Como demonstrado na FIGURA 3D, os animais com insuficiência cardíaca apresentaram significativo aumento da atividade da isoforma PKC β II na fração membranaar, refletindo os dados de translocação. Dessa forma, baseado nos dados apresentados na FIGURA 3, pode-se sugerir que o modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica apresenta elevada translocação e atividade da isoforma PKC β II, sem alteração dos níveis cardíacos totais. Dessa forma, a utilização do peptídeo inibidor da isoforma PKC β II durante a insuficiência cardíaca propiciará o melhor entendimento da participação desta isoenzima na progressão da doença.

* Diferença significativa vs. sham.

FIGURA 3 - Caracterização das diferentes isoformas de PKC cardíacas no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC). As análises foram realizadas 70 dias após a cirurgia de ligadura da artéria coronária. A, Expressão protéica e translocação das diferentes isoformas de PKC, a translocação foi avaliada pela razão PKC triton solúvel/total, a linha tracejada representa o grupo sham; B, Expressão protéica e translocação da isoforma PKC β II; C, Imagem ilustrativa dos níveis totais e triton solúvel da PKC β II; D, Atividade da PKC β II localizada na fração triton solúvel, avaliada pela fosforilação *in vitro* do substrato MBP (*Myelin Basic Protein*). Utilizamos para todas as avaliações no mínimo quatro animais por grupo. Para a análise estatística utilizamos teste *t* de *Student* para dados não pareados. Diferença significativa $P < 0,05$.

5.2 Efeito da inibição sustentada da isoforma PKC β II na função cardíaca e remodelamento ventricular em modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Após investigarmos a distribuição subcelular das diferentes isoformas de PKC no tecido cardíaco em modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e verificarmos o aumento da atividade da isoforma PKC β II, decidimos investigar o efeito do tratamento com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II (β IIV5-3) sobre a sobrevida, função e estrutura cardíacas. O tratamento foi iniciado quatro semanas após a cirurgia de ligadura da coronária, uma vez que nesta faixa etária os animais apresentam sinais clínicos de insuficiência cardíaca. O tratamento teve seis semanas de duração (FIGURA 4A), sendo que após esse período os animais foram mortos e os tecidos coletados para a realização das análises descritas na seção de métodos. Vale a pena ressaltar que selecionamos para o grupo insuficiência cardíaca somente os animais que apresentaram valores de

fração de encurtamento iguais ou inferiores a 25% antes do período inicial de tratamento.

Como se pode observar na FIGURA 4B, o grupo de animais com insuficiência cardíaca tratados com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II apresentou significativa diminuição na taxa de mortalidade ao longo do período de tratamento comparado ao grupo insuficiência cardíaca tratado com TAT (controle), onde o grupo insuficiência cardíaca TAT apresentou em torno de 40% de mortalidade ao longo do período de tratamento. Quando avaliamos a função cardíaca, utilizando a ecocardiografia, constatamos que os animais com insuficiência cardíaca de ambos os grupos apresentaram valores de fração de encurtamento, índice de função sistólica, próximos a 20% antes do início do tratamento. Seis semanas de tratamento foi capaz de aumentar significativamente os valores de fração de encurtamento do grupo tratado com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II (FE: 27%), enquanto o grupo tratado com TAT apresentou agravamento progressivo da função cardíaca. Basicamente, os dados de fração de encurtamento refletem os diâmetros diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo aumentados nos animais com insuficiência cardíaca tratados com TAT (TABELA 3). O tratamento com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II foi capaz de reverter parcialmente esses valores. Não esperávamos uma recuperação total da função contrátil, bem como do remodelamento cardíaco dos animais com insuficiência cardíaca tratados com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II dado ao modelo animal utilizado. A dilatação cardíaca observada nos animais tratados com TAT foi mais um sinal de insuficiência cardíaca constatado nesse modelo animal. Além da disfunção cardíaca, observamos intolerância ao esforço nos grupos insuficiência cardíaca TAT e insuficiência cardíaca β IV5-3 previamente ao período de tratamento. Após seis semanas de tratamento os animais do grupo insuficiência cardíaca tratados com o peptídeo β IV5-3 apresentaram significativo aumento da tolerância ao esforço quando comparados ao grupo insuficiência cardíaca TAT, entretanto essa resposta foi parcial, pois ainda era inferior aos valores encontrados no grupo *sham* (FIGURA 4D). Os dados apresentados nessa figura sugerem que seis semanas de tratamento com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II recupera

parcialmente a função cardíaca e melhora a sobrevivência dos animais tratados comparados aos animais tratados com TAT na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica.

* Diferença significante vs. sham.

† Diferença significante vs. Pós IM-IC TAT.

‡ Diferença significante vs. Pré-tratamento.

FIGURA 4 - Efeito da inibição da isoforma PKC β II na sobrevivência e função cardíaca no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC). A, Esquema ilustrativo da terapia com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica; B, Curva de sobrevivência dos

animais com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica ao longo do período de tratamento com o peptídeo β IIV5-3 ou TAT; C, Fração de encurtamento dos animais pré-e pós o período do tratamento; D, Avaliação da tolerância ao esforço físico dos animais pré-e pós o período do tratamento. Utilizamos para todas as avaliações, no mínimo seis animais por grupo. Para a análise estatística da curva de sobrevida utilizamos o teste estatístico de Mantel-Haenszel logrank e modelo de regressão de Cox. Para as outras variáveis utilizamos a análise de variância de dois caminhos (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

TABELA 3 - Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DsVE) e diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DdVE) dos grupos sham e insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC) pré-e pós- seis semanas de tratamento com TAT ou β IIV5-3 (peptídeo inibidor da isoforma PKC β II)

	Pré-tratamento		Pós-tratamento	
	DsVE (mm)	DdVE (mm)	DsVE (mm)	DdVE (mm)
Sham TAT	43 $\pm$ 3	72 $\pm$ 3	47 $\pm$ 3	74 $\pm$ 4
IM-IC TAT	71 $\pm$ 4*	86 $\pm$ 3*	82 $\pm$ 8*	98 $\pm$ 4*
IM-IC β IIV5-3	75 $\pm$ 5*	91 $\pm$ 5*	62 $\pm$ 3*†	80 $\pm$ 2†

* Diferença significativa vs. sham

† diferença significativa vs. IM-IC-TAT.

Para a análise estatística utilizamos análise de variância de dois caminhos (ANOVA) para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

Além das avaliações funcionais e estruturais cardíacas realizadas pelo ecocardiograma, decidimos avaliar o efeito do tratamento com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II na massa do ventrículo esquerdo, diâmetro dos cardiomiócitos e acúmulo de colágeno cardíaco. Efetuamos essas análises, com o intuito de estudar o papel da isoforma PKC β II no remodelamento cardíaco observado na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica.

Como se pode constatar na FIGURA 5A, os animais do grupo insuficiência cardíaca TAT apresentaram significativo aumento do peso do ventrículo esquerdo quando comparados com o grupo *sham*, sendo que a inibição da isoforma PKC β II diminuiu o peso do ventrículo esquerdo para valores próximos do grupo *sham*. A FIGURA 5B, mostra que o tratamento com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II não exerceu nenhum efeito sobre a área cardíaca infartada dos animais com insuficiência cardíaca. Os animais de ambos os grupos insuficiência cardíaca TAT e insuficiência cardíaca β IIV5-3 apresentaram valores de área infartada próximos a 25% da área total cardíaca. Quando avaliamos o efeito da inibição da PKC β II sobre o diâmetro de cardiomiócitos, encontramos uma diminuição significativa da área de secção transversa dos cardiomiócitos do grupo insuficiência cardíaca β IIV5-3 comparado ao grupo insuficiência cardíaca TAT (FIGURA 5C). Cabe ressaltar que o grupo insuficiência cardíaca TAT apresentou um aumento de 25% no diâmetro dos cardiomiócitos quando comparado ao grupo *sham*. Por fim, os animais com insuficiência cardíaca TAT apresentaram aumento de 3x na deposição de colágeno cardíaco quando comparados ao grupo *sham* (FIGURA 5D). A inibição da isoforma PKC β II foi capaz de amenizar esse grande acúmulo de colágeno cardíaco. Os animais tratados com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II apresentaram um aumento de 0,6x quando comparados ao grupo *sham*.

* Diferença significativa vs. sham.

† Diferença significativa vs. IM-IC β IIV5-3.

FIGURA 5 - Efeito da terapia com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II (β IIV5-3) no remodelamento cardíaco em modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC). Todas as avaliações foram realizadas após seis semanas de tratamento. A, Massa do ventrículo esquerdo (VE) corrigida pela massa corporal; B, Área cardíaca infartada dos animais que sofreram cirurgia de ligadura da artéria coronária esquerda descendente anterior; C, Diâmetro dos cardiomiócitos avaliado na área não infartada; D, acúmulo de colágeno cardíaco avaliado na área remota. Utilizamos para todas as avaliações no mínimo seis animais por grupo. Para a análise estatística utilizamos teste *t* de Student para dados não pareados ou a análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

5.3 Efeito da inibição da PKC β II nas diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Para confirmar a eficácia e especificidade do peptídeo inibidor da isoforma PKC β II, avaliamos os níveis totais e translocação das diferentes isoformas de PKC no tecido cardíaco dos diferentes grupos experimentais após as seis semanas de tratamento (FIGURA 6A). Como observado na FIGURA 6B, a inibição da isoforma PKC β II não exerceu nenhum efeito nos níveis totais e translocação das outras isoformas de PKC avaliadas. Além disso, o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II foi capaz de reverter os níveis de translocação dessa isoenzima para os observados no grupo *sham* (FIGURAS 6C e 6D). Concomitante a redução da translocação da isoforma PKC β II para a fração membranar, observamos uma diminuição significativa da atividade da isoenzima, avaliada pela fosforilação *in vitro* do substrato MBP (FIGURA 6E).

* Diferença significativa vs. sham e IM-IC β IIv5-3.

FIGURA 6 - Efeito da inibição sustentada da PKC β II nas diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC). A, Esquema ilustrativo da terapia com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC); B, Efeito de seis semanas de tratamento com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II (β II_{v5-3}) na expressão e translocação das diferentes isoformas de PKC, onde a translocação foi avaliada pela razão PKC triton solúvel/total; C, Expressão protéica e

translocação da isoforma PKC β II após o período de tratamento (semana 22); D, Imagem ilustrativa dos níveis totais e triton solúvel da PKC β II; E, Efeito do peptídeo inibidor da β II_{V5-3} na atividade da PKC β II localizada na fração triton solúvel, avaliada pela fosforilação in vitro do substrato MBP (*Myelin Basic Protein*). Utilizamos para todas as avaliações, no mínimo seis animais por grupo. Para a análise estatística utilizamos a análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

Baseado nos dados expostos acima, sugerimos que o tratamento dos ratos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II por seis semanas foi capaz de diminuir significativamente a translocação e atividade da isoforma PKC β II sem alterar os níveis totais da isoenzima. Essa diminuição resultou em melhora tanto da sobrevida dos animais como da função cardíaca e do remodelamento cardíaco. Entretanto, os mecanismos pelos quais a inibição da PKC β II resulta em melhora da função contrátil e remodelamento cardíaco ainda não foram demonstrados. Levantamos a hipótese de que dois mecanismos participariam, pelo menos em parte, dessa alteração fenotípica estrutural e funcional cardíaca decorrente da inibição sustentada da PKC β II na insuficiência cardíaca. Seriam eles: diminuição da ativação de vias pró-inflamatórias cardíacas (item 5.4) e melhora no perfil contrátil do cardiomiócito (item 5.5). Mostraremos abaixo, os resultados obtidos referentes ao perfil inflamatório e aos aspectos contráteis cardíacos na tentativa de melhor entender a contribuição da PKC β II no desenvolvimento da insuficiência cardíaca.

5.4 Efeito da inibição da PKC β II na ativação de vias pró-inflamatórias na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Os animais com insuficiência cardíaca tratados com TAT apresentaram um aumento de 2x na razão TGF β I ativo / latente cardíaco comparado com os animais do grupo *sham*. O tratamento com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II foi capaz de diminuir a razão TGF β I ativo / latente cardíaco para os valores encontrados no grupo *sham* (FIGURA 7A). Paralelamente à maior ativação do TGF β 1, os animais do grupo insuficiência cardíaca TAT apresentaram aumento da fosforilação da SMAD2/3 no tecido cardíaco, sendo que a inibição sustentada da PKC β II reverteu a ativação da SMAD2/3 para valores próximos do grupo *sham* (FIGURA 7B). Como consequência da estimulação da via pró-inflamatória TGF β 1 – SMAD2/3, o coração dos animais insuficiência cardíaca TAT apresentou maior infiltração de células pró-inflamatórias comparado ao grupo *sham*, onde o tratamento com o inibidor da PKC β II minimizou a migração dessas células para o tecido cardíaco (FIGURA 7C).

Além da maior ativação de vias pró-inflamatórias e elevada migração leucocitária para o tecido cardíaco avaliada pela coloração com hematoxilina-eosina, os animais do grupo insuficiência cardíaca TAT apresentaram aumento significativo na degranulação de mastócitos tanto no endocárdio quanto no epicárdio (FIGURA 7D-F). A inibição sustentada da PKC β II diminuiu parcialmente tanto os níveis quanto a degranulação de mastócitos cardíacos. Esses dados sugerem que a inibição da PKC β II acarreta na menor ativação da via pró-inflamatória TGF β 1 – SMAD2/3, diminuição da infiltração cardíaca de células leucocitárias e redução na degranulação de mastócitos. Provavelmente, essa alteração no perfil pró-inflamatório cardíaco observado nos animais com insuficiência cardíaca tratados com o peptídeo β IIV5-3 contribui, ao menos em parte, para o efeito anti-remodelamento cardíaco patológico observado na insuficiência cardíaca pós-tratamento.

* Diferença significativa vs. sham.

† Diferença significativa vs. IM-IC β IIV5-3.

FIGURA 7 - Efeito da terapia com o peptídeo inibidor da isoforma PKC β II (β IIV5-3) no perfil de inflamação cardíaca em modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC). Todas as avaliações foram realizadas após seis semanas de tratamento. A, Razão TGF β I ativo / latente cardíaco; B, SMAD2/3 fosforilada no tecido cardíaco, avaliada por imunohistoquímica; C, Infiltração cardíaca de células inflamatórias (leucócitos); D,

Imagem ilustrativa do tecido cardíaco corado com azul de toluidina, onde pode-se observar a marcação de mastócitos (setas pretas) e degranulação de mastócitos (setas brancas); E. Quantificação do número de mastócitos cardíacos (MC); F. Quantificação dos focos de degranulação de mastócitos cardíacos (MC). Utilizamos para todas as avaliações, no mínimo cinco animais por grupo. Para a análise estatística utilizamos a análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

5.5 Efeito da inibição aguda da PKC β II na função cardíaca em modelo na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica: ensaio com coração isolado

Com o intuito de melhor compreender o papel da PKC β II na função cardíaca isolada dos efeitos hemodinâmicos e neuro-humorais, realizamos um série de experimentos em coração isolado. Os corações dos animais *sham* e insuficiência cardíaca foram retirados e perfundidos em sistema Langendorff (FIGURA 8A). Analisamos o efeito agudo da inibição da PKC β II sobre a função do coração isolado de animais com insuficiência cardíaca. O desenvolvimento de pressão ventricular foi avaliado por meio da implantação de um balão de látex no ventrículo esquerdo. O balão foi conectado ao transdutor de pressão.

O coração isolado de animais com insuficiência cardíaca perfundidos com TAT (1mM) por quinze minutos apresentou significativo prejuízo da dP/dt tanto positiva quanto negativa em relação ao grupo *sham* (FIGURA 7B e 7C). As dP/dts positiva e negativa são índices utilizados para estimar a função ventricular sistólica e diastólica, respectivamente. Quinze minutos de perfusão cardíaca com 1 μ M do inibidor β IIV5-3 minimizou a redução tanto na DP/dt+ como na DP/dt- observada no coração isolado dos ratos com insuficiência cardíaca (FIGURA 8B e 8C). Em relação à pressão ventricular, podemos observar que o grupo insuficiência cardíaca perfundido

com TAT apresentou queda significativa na pressão sistólica do ventrículo esquerdo quando comparado ao grupo *sham* (FIGURA 8C). Esse prejuízo também foi observado na pressão ventricular diastólica dos corações isolados dos animais com insuficiência cardíaca (FIGURA 8E). A inibição aguda da PKC β II foi capaz de aumentar as pressões ventriculares tanto sistólica como diastólica para valores próximos aos do grupo *sham* (FIGURA 8D e 8E). Simultâneo à melhora das pressões ventriculares, o coração isolado dos animais com insuficiência cardíaca que foram perfundidos com o peptídeo β IIV5-3 apresentou importante aumento no desenvolvimento de pressão ventricular esquerda quando comparado ao grupo insuficiência cardíaca perfundido com TAT, que por sua vez, apresentava prejuízo significativo no desenvolvimento de pressão ventricular (FIGURA 8F). Esses dados com coração isolado sugerem que, independente dos efeitos da PKC β II na regulação hemodinâmica e neuro-humoral, a atividade aumentada dessa isoenzima tem papel importante na diminuição da função cardíaca observada na insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio.

* Diferença significativa vs. sham.

† Diferença significativa vs. IM-IC β IIV5-3.

FIGURA 8 - Efeito da inibição aguda da PKC β II na função cardíaca em modelo na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (IM-IC): ensaio com coração isolado. Todas as avaliações foram realizadas 22 semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio. A, Esquema ilustrativo; B, dP/dt positiva; C, dP/dt negativa; D, Pressão sistólica final do ventrículo esquerdo; E, Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; F, Desenvolvimento de pressão ventricular esquerda. Utilizamos para todas as

avaliações, no mínimo quatro animais por grupo. Para a análise estatística utilizamos a análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

Com o objetivo de melhor compreender a regulação negativa da PKC β II na função contrátil cardíaca na insuficiência cardíaca, seguimos com as avaliações funcionais utilizando para os experimentos subsequentes, cardiomiócitos isolados de ratos adultos. Para isso, isolamos os miócitos cardíacos de ratos *sham* e com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica para avaliar o efeito agudo da inibição da PKC β II sobre a contratilidade dos cardiomiócitos e sobre o transiente de cálcio intracelular. Além disso, também isolamos cardiomiócitos de ratos com insuficiência cardíaca tratados cronicamente com TAT e β IIV5-3 para avaliar o efeito sustentado da inibição da PKC β II na contratilidade e transiente de cálcio do cardiomiócito.

5.6 Efeito da inibição aguda e crônica da PKC β II na contratilidade de cardiomiócitos isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio

A contratilidade dos cardiomiócitos foi avaliada inicialmente em células isoladas do coração de ratos adultos dos grupos *sham* e insuficiência cardíaca, onde analisamos o efeito agudo do tratamento com TAT ou com peptídeo β IIV5-3, conforme descrito na seção de métodos (item 4.15).

Conforme demonstrado na FIGURA 9B, os animais com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica apresentaram significativa diminuição no comprimento do sarcômero quando comparados ao grupo *sham*. Além disso, prejuízos na contratilidade intrasarcomérica, velocidade de contração, tempo para a aceleração máxima e velocidade de relaxamento do cardiomiócito também foram observados nos animais com insuficiência

em relação ao grupo *sham*. Quando tratamos os cardiomiócitos de ratos com insuficiência cardíaca com o peptídeo β IIV5-3 por quinze minutos antes e durante todo o tempo de registro dos dados, observamos que a inibição aguda da PKC β II apresentou efeitos benéficos ao menos em alguns dos parâmetros de contratilidade avaliados nos cardiomiócitos. A diminuição da atividade da PKC β II agudamente foi capaz de restabelecer o comprimento dos cardiomiócitos isolados dos ratos com insuficiência cardíaca para valores próximos aos do grupo *sham*. Além disso, observamos uma pequena, porém significativa, melhora da velocidade de contração, tempo para a aceleração máxima e velocidade de relaxamento dos cardiomiócitos isolados dos ratos com insuficiência cardíaca quando comparados aos cardiomiócitos isolados dos ratos com insuficiência cardíaca tratados com TAT. Cabe ressaltar que a melhora desses parâmetros contráteis foi parcial, o que corrobora a melhora parcial da função contrátil observada nos ensaios com os corações isolados dos ratos com insuficiência cardíaca tratados com o peptídeo β IIV5-3 ou TAT.

Uma vez constatada melhora na sobrevida e função cardíaca dos ratos com insuficiência cardíaca tratados cronicamente com o inibidor da PKC β II, decidimos avaliar se estas alterações poderiam estar diretamente relacionadas à melhora da contratilidade do cardiomiócito desses animais, pois sabemos que a melhora da função ventricular pode ocorrer não somente pela melhora da contratilidade do cardiomiócito, mas em decorrência da reversão do remodelamento cardíaco patológico. Para isso, isolamos cardiomiócitos de ratos com insuficiência cardíaca tratados cronicamente com TAT ou β IIV5-3 (FIGURA 9A) e avaliamos alguns índices de contratilidade do cardiomiócito isolado.

Como se pode observar na FIGURA 9, a inibição sustentada da PKC β II por seis semanas foi capaz recuperar totalmente o comprimento do cardiomiócito, a velocidade de contração, o tempo para a aceleração máxima e a velocidade de relaxamento do cardiomiócitos isolados, previamente reduzidos nos ratos com insuficiência cardíaca para valores semelhantes aos observados nos cardiomiócitos isolados dos ratos *sham*. Baseados nesses dados, sugerimos que a melhora da função cardíaca dos ratos com

insuficiência cardíaca tratados cronicamente com o peptídeo β IIIV5-3 decorre, pelo menos em parte, da significativa melhora da contratilidade dos cardiomiócitos pós-tratamento.

* Diferença significativa vs. sham.

† Diferença significativa vs. IM-IC β IIIV5-3 crônico.

‡ Diferença significativa vs. IM-IC β IIIV5-3 agudo.

FIGURA 9 - Efeito da inibição aguda e crônica da PKC β II na contratilidade de cardiomiócitos isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio (IM-IC). Todas as avaliações foram realizadas 22 semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio. Foram utilizados em média 30 cardiomiócitos por grupo. A, Esquema ilustrativo; B, Comprimento do sarcômero; C, Contratilidade intrasarcomérica; D, Velocidade de contração; E, Tempo para a aceleração máxima (TAM); F, Velocidade de relaxamento. Para a análise estatística utilizamos a análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

Como a contração dos cardiomiócitos está relacionada à sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao cálcio, decidimos avaliar o efeito da inibição crônica da PKC β II sobre a expressão, fosforilação da troponina I, e interação entre troponina I e PKC β II. Para isso utilizamos lisados cardíacos de ratos sham e ratos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica tratados com o peptídeo β IIV5-3 e TAT (FIGURA 10A).

Como se pode observar na FIGURA 10B, os animais com insuficiência cardíaca TAT apresentaram aumento significativo na fosforilação da troponina I cardíaca, sítios ser23/24, sem alteração nos níveis totais de troponina I cardíaca. Sabemos que essa região é sítio alvo de fosforilação tanto de PKA quanto PKC. De fato, a interação entre PKC β II e troponina I parece estar significativamente aumentada no lisado cardíaco dos ratos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica (FIGURA 10C). Após o tratamento sustentado dos ratos com insuficiência cardíaca com o peptídeo β IIV5-3, tanto a fosforilação da troponina I quanto a interação entre PKC β II e troponina I diminuíram significativamente para valores próximos ao do grupo *sham*. De fato, dados da literatura mostram que a fosforilação aumentada da

troponina I diminui drasticamente a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio e a atividade da miosina ATPase (MARSTON & DE TOMBE, 2008).

* Diferença significativa vs. sham.

† Diferença significativa vs. IM-IC βIIV5-3.

FIGURA 10 - Efeito da inibição sustentada da PKCβII na expressão e fosforilação da troponina I, e interação entre troponina I e PKCβII em ratos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio (IM-IC). Todas as avaliações foram realizadas 22 semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio. Foram utilizados em média cinco animais por grupo. A, Esquema ilustrativo; B, Razão dos níveis de troponina I

fosforilada nas serinas 23/24 pelos níveis totais de troponina I cardíaca; C. Imunoprecipitação da PKC β II e avaliação da interação entre troponina I e PKC β II no lisado cardíaco. Para a análise estatística utilizamos a análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

Em virtude da contração dos cardiomiócitos estar relacionada à dinâmica celular do cálcio, decidimos avaliar o papel da inibição aguda e crônica da PKC β II no transiente de cálcio em cardiomiócitos isolados dos ratos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e compará-los com o do grupo *sham*.

5.7 Efeito da inibição aguda e crônica da PKC β II no transiente de cálcio de cardiomiócitos isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio

A dinâmica do cálcio foi avaliada inicialmente em cardiomiócitos isolados de ratos adultos dos grupos *sham* e insuficiência cardíaca, onde analisamos o efeito agudo do tratamento com TAT ou peptídeo β IIV5-3, conforme descrito na seção de métodos (item 4.17.2).

Como demonstrado na FIGURA 11A, os cardiomiócitos dos ratos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica apresentaram o traçado da dinâmica do cálcio diferente do grupo *sham*. Nitidamente os animais com insuficiência cardíaca TAT tiveram o pico do transiente de cálcio aumentado (FIGURA 11B) além de se observar um prolongamento do tempo para se alcançar este pico em relação ao grupo *sham* (tracejado FIGURA 11A). Em paralelo, o grupo insuficiência cardíaca TAT apresentou significativa elevação e diminuição das velocidades de liberação e captação de cálcio, respectivamente, comparado ao *sham*. Os cardiomiócitos dos ratos com

insuficiência cardíaca tratados agudamente com o peptídeo inibidor β IIV5-3 demonstraram uma significativa redução no pico do transiente de cálcio sem alteração no tempo para se alcançar este pico em relação ao grupo insuficiência cardíaca TAT. Concomitante à redução no pico de cálcio, os cardiomiócitos tratados com β IIV5-3 também apresentaram redução e aumento das velocidades de liberação e captação de cálcio, respectivamente, quando comparados aos cardiomiócitos do grupo insuficiência cardíaca TAT. Esses dados sugerem que a inibição aguda da atividade da PKC β II é importante para o controle da dinâmica do cálcio em cardiomiócitos isolados de ratos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica.

Na tentativa de avaliar o efeito crônico da inibição da PKC β II sobre a dinâmica do cálcio em ratos com insuficiência cardíaca, isolamos o cardiomiócito desses ratos e comparamos com os grupos insuficiência cardíaca TAT e *sham*. Interessantemente, a inibição sustentada da PKC β II não alterou de forma significativa o padrão da dinâmica do cálcio nos cardiomiócitos isolados dos animais tratados com β IIV5-3 comparados com o grupo TAT. As variáveis: pico do transiente de cálcio, tempo para se alcançar o pico do transiente de cálcio, velocidades de liberação e captação de cálcio apresentaram comportamentos semelhantes entre os cardiomiócitos dos ratos com insuficiência cardíaca tratados com β IIV5-3 e TAT (FIGURA 11A-D).

* Diferença significativa vs. sham.

† Diferença significativa vs. IM-IC $\beta\text{IIV5-3}$ agudo.

FIGURA 11 - Efeito da inibição aguda e crônica da PKC βII no transiente de cálcio de cardiomiócitos isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio. Todas as avaliações foram realizadas 22 semanas após a cirurgia de infarto do miocárdio. Foram utilizados em média, 30 cardiomiócitos por grupo. A, Traçado da dinâmica do cálcio na contração; B, Pico do transiente de cálcio; C, Velocidade de liberação de cálcio; D, Velocidade de captação de cálcio. Para a

análise estatística utilizamos a análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

5.8 Efeito da inibição das isoformas PKC β II ou PKC β I na função cardíaca, remodelamento cardíaco e ativação das diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva

Conforme demonstrado até o momento, a inibição sustentada da PKC β II foi capaz de reverter, ao menos parcialmente, o fenótipo cardíaco observado na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, melhorando a sobrevida dos animais e re-estabelecendo parcialmente a função cardíaca destes animais. Com o intuito de avaliar se a eficácia e especificidade da inibição sustentada da PKC β II é influenciada pela etiologia da insuficiência cardíaca, utilizamos outro modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva bem como outra terapia, no caso a inibição sustentada da isoforma PKC β I, na qual apresenta 90% de homologia com a PKC β II (FIGURA 12A). Nossa hipótese era de que os efeitos benéficos do tratamento com inibidor específico para PKC β II na etiologia isquêmica se estenderiam para a insuficiência cardíaca hipertensiva.

O tratamento iniciou-se na décima primeira semana de vida dos animais sensíveis ao sal (*Dahl Salt*), cinco semanas após o início da dieta rica em sal. Nesse período os animais apresentam hipertrofia cardíaca compensada (INAGAKI, IWANAGA, SARAI, ONOZAWA, TAKENAKA, MOCHLY-ROSEN & KIHARA, 2002a). Já com 17 semanas de vida os animais apresentam disfunção cardíaca com sinais clínicos de insuficiência cardíaca (INAGAKI, IWANAGA, SARAI, ONOZAWA, TAKENAKA, MOCHLY-ROSEN & KIHARA, 2002a). Como observado na FIGURA 12B, a inibição sustentada da PKC β II melhorou a sobrevida dos animais com insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva, tanto no período do tratamento quanto nas

dez semanas consecutivas ao tratamento, quando comparados ao grupo insuficiência cardíaca TAT. Além disso, a inibição da isoforma da PKC β I não teve impacto sobre a sobrevivência dos animais nos períodos tratamento e pós-tratamento. Concomitante à melhora da sobrevivência dos animais, a inibição da PKC β II evitou a redução na função cardíaca após seis semanas de tratamento (FIGURA 12B). Já os animais *Dahl salt* submetidos à dieta rica em sal e tratados com TAT ou β IV5-3 apresentaram significativa redução da função cardíaca na décima sétima semana de vida.

* Diferença significativa vs. controle.

† Diferença significativa vs. HT-IC TAT.

‡ Diferença significativa vs. HT-IC β IV5-3.

FIGURA 12 - Efeito da inibição das isoformas PKC β II ou PKC β I sobre a sobrevivência e a função ventricular no modelo de insuficiência

cardíaca de etiologia hipertensiva (HT-IC). A, Esquema ilustrativo da terapia com os peptídeos inibidores das isoformas PKC β II (β IIV5-3) e PKC β I (β IV5-3) no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva (HT-IC) (ratos *Dahl salt*); B, Curva de sobrevida dos animais com insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva tratados com TAT, β IIV5-3 e β IV5-3 ao longo de 16 semanas; C, Fração de encurtamento dos animais pré-e pós o período do tratamento; Utilizamos para todas as avaliações no mínimo seis animais por grupo. Para a análise estatística da curva de sobrevida utilizamos o teste estatístico de Mantel-Haenszel logrank e modelo de regressão de Cox. Para as outras variáveis utilizamos a análise de variância de dois caminhos (ANOVA) para medidas repetidas com post-hoc de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

Além das alterações funcionais cardíacas, os animais *Dahl salt* tratados com dieta rica em sal apresentaram um aumento na razão do peso ventricular esquerdo/ peso corporal comparados ao grupo controle (FIGURA 13A). A inibição sustentada da PKC β II reverteu o remodelamento cardíaco patológico. Já a inibição da PKC β I não acarretou em regressão da hipertrofia cardíaca. Também avaliamos a pressão arterial sistólica desses animais, uma vez que esse é um modelo de insuficiência cardíaca induzida por hipertensão. De fato, os animais *Dahl salt* tratados com TAT apresentaram um significativo aumento da pressão arterial quando comparados com o grupo controle (ratos *Dahl salt* tratados com dieta pobre em sal, 0,3 NaCl) (FIGURA 13B). O tratamento sustentado com o peptídeo β IIV5-3 foi capaz de reduzir parcialmente a pressão arterial dos animais tratados com dieta rica em sal. A inibição sustentada da PKC β I não exerceu efeito de atenuação da hipertensão arterial nos animais tratados com dieta rica em sal.

As FIGURA 13C e 13D demonstram a especificidade e eficácia dos peptídeos β IIV5-3 e β IV5-3 em reduzir a atividade da PKC β II e PKC β I,

respectivamente, para valores próximos do grupo controle. Baseado nos dados apresentados acima, sugerimos que a inibição da PKC β II também apresenta efeito benéfico na reversão, ou prevenção, do fenótipo cardíaco associado à insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva.

* Diferença significativa vs. controle.

† Diferença significativa vs. HT-IC TAT.

FIGURA 13 - Efeito da inibição das isoformas PKC β II ou PKC β I no remodelamento cardíaco e ativação das diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia

hipertensiva função ventricular no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva (HT-IC). A, Razão da massa do ventrículo esquerdo/massa corporal dos animais dos grupos controle (CTL) e com insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva (HT-IC) (ratos *Dahl salt*) tratados com TAT, β IIV5-3 e β IV5-3 (pós-tratamento – 17^a semana); B, Pressão arterial sistólica dos animais dos grupos controle e com insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva tratados com TAT, β IIV5-3 e β IV5-3 (pós-tratamento, 17^a semana); C, Efeito de seis semanas de tratamento com os peptídeos inibidores das isoformas PKC β II (β II_{V5-3}) e PKC β I (β I_{V5-3}) na expressão e translocação das diferentes isoformas de PKC, a translocação foi avaliada pela razão PKC triton solúvel/total; D, Imagem ilustrativa dos níveis totais e triton solúvel da PKC β II. Para a análise estatística utilizamos a análise de variância de um ou dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey. Diferença significativa $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram pela primeira vez que, dentre as diferentes isoformas de PKC, a PKC β II tem uma participação marcante no agravamento da insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio e na progressão da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca em modelo de hipertensão arterial sustentada em ratos. Além disso, mostramos que a inibição seletiva da PKC β II, utilizando peptídeos específicos, foi eficaz de minimizar os efeitos deletérios cardíacos na insuficiência cardíaca.

De acordo com a hipótese inicial, comprovou-se o aumento da ativação da PKC β II cardíaca durante a progressão da insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio, onde sua inibição sustentada por seis

semanas, na fase em que os animais apresentavam sinais clínicos de insuficiência cardíaca, foi capaz de melhorar tanto a sobrevida como a função cardíaca e a tolerância aos esforços físicos. Além disso, demonstramos que os efeitos benéficos da inibição da PKC β II estão diretamente relacionados à reversão parcial do remodelamento ventricular esquerdo patológico e à melhora da contratilidade do cardiomiócito. Por fim, mostramos que a inibição específica da PKC β II, ao contrário da PKC β I, foi capaz de evitar a progressão da hipertrofia cardíaca compensada para a insuficiência cardíaca em modelo de hipertensão arterial em ratos. Sendo assim, os resultados supracitados contribuem para uma compreensão mais detalhada da participação da isoforma PKC β II na insuficiência cardíaca por meio da utilização de inibidores específicos.

6.1 Caracterização fenotípica do modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Com a escolha do modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, devido à elevada incidência desta etiologia na insuficiência cardíaca em humanos (DE CAMPOS LOPES, YAMADA, ARAUJO, PEREIRA BARRETO & MANSUR, 2006), decidimos realizar, *a priori*, uma caracterização fenotípica do modelo nas semanas subseqüentes à cirurgia. Para isso, avaliamos parâmetros funcionais e estruturais cardíacos ao longo de dez semanas pós-cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior.

6.1.1 Alterações funcionais e estruturais cardíacas ao longo de 70 dias após a isquemia do miocárdio

Inicialmente, avaliamos as alterações morfofuncionais cardíacas decorrentes da isquemia do miocárdio em ratos pelo ecocardiograma. As análises ecocardiográficas foram feitas aos 3, 7, 14, 28, 42 e 70 dias após a cirurgia de ligadura da artéria coronária. Conforme observado nos resultados, os animais apresentaram significativa redução da função contrátil cardíaca

aos três dias após a cirurgia. Essa redução foi agravando-se ao longo dos 70 dias, sendo que no vigésimo oitavo dia, os animais já apresentavam dilatação ventricular esquerda caracterizando o remodelamento cardíaco neste modelo.

Atualmente, a utilização do exame ecocardiográfico na avaliação morfofuncional cardíaca é extremamente recomendada para fins de prognóstico e como indicadores de progressão da insuficiência cardíaca (FRIGERIO & ROUBINA, 2005). Os parâmetros funcionais fração de encurtamento e fração de ejeção; e os parâmetros estruturais: diâmetro ventricular esquerdo, espessura do septo intraventricular e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo observados na avaliação ecocardiográfica são as medidas mais utilizadas no diagnóstico da insuficiência cardíaca em humanos (DE SIMONE & PALMIERI, 2002; WANG, YIP, WANG, ZHANG, HO, TSE, YU & SANDERSON, 2005). Além disso, esses parâmetros também são utilizados na detecção de alterações morfofuncionais cardíacas de roedores (NIENABER, TACHIBANA, NAGA PRASAD, ESPOSITO, WU, MAO & ROCKMAN, 2003; SANTOS, CASTRO, GAVA, PINHEIRO, ALMEIDA, PAULA, CRUZ, RAMOS, ROSA, IRIGOYEN, BADER, ALENINA, KITTEN & FERREIRA, 2006).

Paralelo ao prejuízo da fração de encurtamento e dilatação cardíaca, constatamos significativa diminuição de índices de função sistólicos (dP/dt positiva) e diastólicos (dP/dt negativa) avaliados pela cateterização direta do ventrículo esquerdo dos animais com 28 dias após a isquemia do miocárdio. Essas análises reproduziram os dados obtidos no ecocardiograma. Acreditamos que a progressão da disfunção ventricular esquerda observada nesses animais foi consequência da perda exacerbada de tecido contrátil cardíaco decorrente do processo isquêmico. Os animais apresentaram uma área infartada em torno de 30% de área cardíaca total. Além disso, é sabido que hiperativação dos sistemas neuro-humorais desencadeada inicialmente pela lesão do miocárdio contribui significativamente para a disfunção contrátil cardíaca e hipertrofia ventricular esquerda ao longo do tempo (GONZALEZ, SEROPIAN, KRIEGER, PALLEIRO, LOPEZ VERRILLI, GIRONACCI, CAVALLERO, WILENSKY, TOMASI, GELPI & MORALES, 2009). De fato, quando avaliamos o

remodelamento cardíaco no vigésimo oitavo dia após a cirurgia de ligadura da artéria coronária, constatamos uma hipertrofia cardíaca patológica nesses animais. Concomitante ao prejuízo da função cardíaca, observamos intolerância a realização de exercício físico e diminuição no consumo pico de oxigênio aos 28 dias após a cirurgia que são testes clínicos reconhecidos e utilizados para o diagnóstico e classificação dos pacientes com insuficiência cardíaca segundo a NYHA.

Portanto, os resultados obtidos nesse estudo preliminar de caracterização fenotípica do modelo nos permitem afirmar que após a ligadura da artéria coronária, há progressiva disfunção cardíaca ao longo das dez semanas avaliadas, com hipertrofia ventricular patológica e sinais clínicos de insuficiência cardíaca após a quarta semana de infarto do miocárdio.

A partir da caracterização fenotípica do modelo e determinação da fase em que os animais apresentam manifestação de sinais clínicos de insuficiência cardíaca, nosso próximo objetivo foi avaliar o perfil de expressão e ativação das diferentes isoformas de PKC cardíacas na insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio.

6.1.2 Caracterização das diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Dois artigos publicados recentemente (CHURCHILL, BUDAS, VALLENTIN, KOYANAGI & MOCHLY-ROSEN, 2008; PALANIYANDI, SUN, FERREIRA & MOCHLY-ROSEN, 2009) reportaram a importância das diferentes isoformas de PKC na regulação de uma série de respostas cardíacas mediante lesões agudas e crônicas como: isquemia aguda do miocárdio e insuficiência cardíaca pós-hipertensão, respectivamente. De acordo com estes estudos, as isoformas de PKC clássicas e novas foram significativamente alteradas pós-lesão aguda e crônica do miocárdio. INAGAKI, IWANAGA, SARAI, ONOZAWA, TAKENAKA, MOCHLY-ROSEN & KIHARA (2002a) observaram que ratos com sobrecarga pressórica apresentavam aumento da expressão da isoforma PKC ϵ durante a hipertrofia

cardíaca compensada e aumento tanto da expressão quanto da atividade da isoforma PKC β II durante a progressão para a insuficiência cardíaca.

Baseados nesses estudos, decidimos avaliar o perfil de expressão e ativação das PKCs clássicas e novas em nosso modelo de insuficiência cardíaca. Conforme apresentado nos resultados, dentre as diferentes isoformas de PKC expressas no tecido cardíaco, somente a PKC β II apresentou aumento significativo na translocação para a fração de membrana e atividade no lisado cardíaco de animais com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, corroborando os dados de INAGAKI, IWANAGA, SARAI, ONOZAWA, TAKENAKA, MOCHLY-ROSEN & KIHARA (2002a). Cabe esclarecer que quando ativadas por fosfatidilserinas, as diferentes isoformas de PKCs translocam-se do citoplasma para regiões específicas da célula, como microdomínios presentes nas membranas, e fosforilam seus respectivos substratos. Portanto, o aumento da translocação da isoforma PKC β II para a fração membranar sugere sua ativação, mesmo mantendo-se os níveis totais da PKC β II cardíaca no modelo de isquemia estudado. A especificidade desta ativação foi comprovada quando observamos a não alteração da translocação da isoforma PKC β I, pois a mesma apresenta 90% de homologia com a isoforma PKC β II.

Nossos achados mostram uma correlação positiva entre a ativação da PKC β II e a insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica. Entretanto, até o presente momento, não se havia demonstrado uma relação mais estreita entre o aumento da atividade da PKC β II e o desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Em colaboração com a Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen da Universidade de Stanford, que desenvolveu peptídeos inibidores e ativadores específicos para cada isoforma de PKC, por meio da regulação da interação entre a PKC β II e sua RACK (MOCHLY-ROSEN, 1995), investigamos o efeito da inibição sustentada da PKC β II no fenótipo da insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica.

6.2 Efeito da inibição sustentada da isoforma PKC β II na função cardíaca e remodelamento ventricular em modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Conforme apresentado nos resultados, mostramos pela primeira vez que a inibição sustentada da PKC β II em ratos com insuficiência cardíaca melhorou significativamente a função ventricular e a tolerância à realização de esforços físicos, bem como promoveu um efeito anti-remodelamento cardíaco patológico. Essas alterações foram acompanhadas pela melhora na sobrevida dos animais comparados ao grupo insuficiência cardíaca TAT. Nossos resultados corroboram os dados da literatura utilizando outros modelos animais. Camundongos transgênicos que hiperexpressam PKC β II apresentavam hipertrofia ventricular patológica e fibrose cardíaca, onde o tratamento com o inibidor de PKC β não seletivo (LY333531) preveniu a hipertrofia cardíaca (WAKASAKI, KOYA, SCHOEN, JIROUSEK, WAYS, HOIT, WALSH & KING, 1997). BOWMAN, STEINBERG, JIANG, GEENEN, FISHMAN & BUTTRICK (1997) observaram hipertrofia de cardiomiócitos adultos em modelo de hiperexpressão transiente da forma ativa da PKC β II. Além disso, alguns estudos já sugeriam que a PKC β II poderia ser uma quinase envolvida nos efeitos deletérios decorrentes da hiperatividade dos sistemas neuro-humorais, uma vez que a mesma integra a cascata de sinalização intracelular de agonistas do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina (BOGOYEVITCH, PARKER & SUGDEN, 1993; PASS, ZHENG, WEAD, ZHANG, LI, BOLLI & PING, 2001; TAKEISHI, PING, BOLLI, KIRKPATRICK, HOIT & WALSH, 2000).

Nossos achados, em conjunto com os da literatura, confirmam a contribuição relativa da PKC β II na fisiopatologia da insuficiência cardíaca. Sendo assim, estratégias terapêuticas que inibam a hiperativação da PKC β II poderão ter grande impacto clínico e auxiliarão na redução dos reconhecidos efeitos deletérios da hiperativação dos sistemas neuro-humorais na síndrome. De fato, nossos resultados apontam para um efeito da inibição sustentada da PKC β II na mortalidade, função cardíaca e remodelamento ventricular similar aos efeitos de fármacos que inibem a ativação de sistemas neuro-humorais como: β -bloqueadores, inibidores da enzima conversora de

angiotensina e antagonistas dos receptores de angiotensina II apresentados na literatura (GONZALEZ, SEROPIAN, KRIEGER, PALLEIRO, LOPEZ VERRILLI, GIRONACCI, CAVALLERO, WILENSKY, TOMASI, GELPI & MORALES, 2009; MCALISTER, WIEBE, EZEKOWITZ, LEUNG & ARMSTRONG, 2009). No entanto, os efeitos obtidos pela inibição seletiva da PKC β II por meio do uso de pequenos peptídeos permeáveis à membrana celular foram mediados pela redução na fosforilação de substratos específicos da PKC β II, o que tem um efeito mais pontual e específico, enquanto que o bloqueio de receptores de membrana celular, por ser menos específico e mais abrangente, pode inibir mais vias celulares com efeitos divergentes em suas ações intracelulares, assim como pode desencadear mecanismos de retroalimentação que potencializem ou antagonizem as respostas celulares almejadas (FIGURA 14).

FIGURA 14 - Modelo esquemático da transdução do sinal intracelular. Possíveis alvos de terapias farmacológicas. Adaptado de CHURCHILL, BUDAS, VALLENTIN, KOYANAGI & MOCHLY-ROSEN (2008).

6.3 Efeito da inibição da isoforma PKC β II sobre as diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Após a caracterização dos efeitos benéficos da inibição sustentada da PKC β II na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, demonstramos a elevada seletividade e eficácia do peptídeo β IIV5-3 em inibir a PKC β II na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica. O peptídeo foi capaz de diminuir a translocação e atividade da PKC β II no grupo insuficiência cardíaca para valores próximos do grupo *sham*. Além disso, o peptídeo não exerceu nenhum efeito na expressão protéica e translocação das demais isoformas de PKC cardíacas.

Uma série de trabalhos publicados na literatura utilizando peptídeos inibidores de diferentes isoformas de PKC mostra a especificidade destes em diferentes tecidos, bem como em diferentes patologias. QI, INAGAKI, SOBEL & MOCHLY-ROSEN (2008) observaram que a administração crônica do peptídeo δ V1-1 inibiu a atividade da PKC δ cerebral em modelo animal de encefalopatia hipertensiva. Inagaki et al. (2008) demonstraram que o tratamento farmacológico sustentado com o peptídeo ϵ V1-2 (inibidor específico da PKC ϵ) diminuiu a atividade da PKC ϵ cardíaca em modelo animal de hipertensão arterial (INAGAKI, KOYANAGI, BERRY, SUN & MOCHLY-ROSEN, 2008). KIM, CHOI, VALLENTIN, HUNRICHS, HELLERSTEIN, PEEHL & MOCHLY-ROSEN (2008) constataram que a utilização do peptídeo β IIV5-3 inibiu seletivamente a atividade da PKC β II em células endoteliais e cancerígenas.

Sendo assim, nossos resultados corroboram os dados da literatura mostrando a seletividade e eficácia da inibição aguda e sustentada das diferentes isoformas de PKC no tratamento de doenças degenerativas.

6.4 Efeito da inibição da PKC β II na fibrose cardíaca e ativação de vias pró-inflamatórias na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

O remodelamento cardíaco é um componente essencial na progressão da insuficiência cardíaca. Esse processo envolve mudanças adaptativas e não adaptativas na morfologia do cardiomiócito, fibrose cardíaca e inflamação (TAKANO, HASEGAWA, NAGAI & KOMURO, 2003). Conforme demonstrado anteriormente, nosso modelo animal apresenta hipertrofia ventricular patológica com significativa deposição de colágeno cardíaco. Quando avaliamos o perfil inflamatório do tecido cardíaco dos animais com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, constatamos infiltração leucocitária e degranulação de mastócitos, bem como o aumento na razão TGF β 1 ativo/latente e na fosforilação das proteínas SMAD2/3 na região cardíaca não infartada. A inibição sustentada da PKC β II minimiza todas essas alterações observadas na insuficiência cardíaca, mostrando-se eficaz na diminuição de respostas inflamatórias no tecido cardíaco em modelo animal de insuficiência cardíaca, entretanto, não podemos ainda estabelecer uma relação causa-efeito entre a inibição da PKC β II e o efeito anti-inflamatório local. WAKASAKI, KOYA, SCHOEN, JIROUSEK, WAYS, HOIT, WALSH & KING (1997) demonstraram que camundongos transgênicos que hiperexpressavam a isoforma PKC β II apresentavam infiltração de células mononucleadas inflamatórias e elevada expressão de TGF β 1. Esses dados corroboram nossos achados em modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, sendo que a inibição da PKC β II demonstrou-se eficaz em diminuir o quadro inflamatório cardíaco.

Fibrose e inflamação estão diretamente envolvidas na patogênese da insuficiência cardíaca, um processo complexo que resulta em disfunção cardíaca, hipertrofia e ulterior dilatação ventricular. Entretanto, os mecanismos mediadores das respostas inflamatórias e da deposição de tecido fibrótico ainda são desconhecidos. Utilizando um modelo de camundongo com inativação gênica da SMAD3, BUJAK, REN, KWEON, DOBACZEWSKI, REDDY, TAFFET, WANG & FRANGOIANNIS (2007)

constatarem que essa proteína tem papel importante no processo pró-fibrótico induzido pelo TGF β I cardíaco após isquemia do miocárdio. Além disso, os autores observaram repressão significativa de genes pró-inflamatórios e diminuição da migração e infiltração leucocitária cardíaca nesses animais após isquemia. Esses dados corroboram nossos achados com a inibição crônica da PKC β II em modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica. Entretanto, futuros estudos são necessários para identificar possíveis substratos da PKC β II envolvidos nos processos inflamatórios e fibróticos cardíacos durante a progressão da insuficiência cardíaca.

6.5 Efeito da inibição aguda e crônica da PKC β II na contratilidade de cardiomiócitos isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica

Após as análises morfológicas cardíacas e celulares realizadas com o intuito de melhor entender a participação da PKC β II no remodelamento cardíaco, bem como tentar identificar novos substratos da PKC β II como potenciais candidatos no envolvimento dos processos de inflamação e deposição de colágeno cardíaco, iniciamos algumas avaliações funcionais utilizando coração e cardiomiócito isolados dos animais com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica tratados com TAT ou β IIV5-3. Essas análises tiveram o propósito de verificar a participação da PKC β II na contratilidade cardíaca. Cabe ressaltar que além das alterações estruturais, os animais com insuficiência cardíaca apresentaram importante prejuízo na função cardíaca, avaliada pelo ecocardiograma e cateterização direta do ventrículo esquerdo, onde seis semanas de tratamento com o inibidor β IIV5-3 melhorou significativamente a função cardíaca comparada com o período pré-tratamento.

Os experimentos avaliados em coração isolado (*ex vivo*) dos ratos com insuficiência cardíaca mostraram que o peptídeo β IIV5-3, quando administrado agudamente quinze minutos antes do início e durante toda a coleta dos dados, foi capaz de aumentar significativamente parâmetros

contráteis cardíacos como o desenvolvimento de pressão ventricular e a dP/dt positiva cardíaca. As respostas observadas eram específicas uma vez que as mesmas eram abolidas cinco minutos após a remoção do peptídeo da solução de perfusão. Esses resultados sugerem que, além dos possíveis efeitos do peptídeo em diferentes órgãos e no sistema circulatório, a inibição da PKC β II modula a função inotrópica e lusitrópica cardíaca na insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, que resultam em melhor função contrátil dos cardiomiócitos. Entretanto, com os experimentos realizados até o momento, não podemos afirmar uma relação causal. Sendo assim, com o intuito de melhor compreender os efeitos agudo e crônico da inibição da PKC β II sobre a função contrátil dos cardiomiócitos de ratos adultos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, isolamos as células e avaliamos o perfil contrátil destas.

A deterioração da contratilidade cardíaca durante a progressão da insuficiência cardíaca está diretamente relacionada ao prejuízo funcional dos cardiomiócitos isolados, possivelmente por sua contratilidade reduzida (MORK, SJAASTAD, SEJERSTED & LOUCH, 2009). Além disso, a redução da contratilidade miocárdica é uma característica importante da insuficiência cardíaca em humanos. Cardiomiócitos isolados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca apresentaram reduções na resposta contrátil e de relaxamento (HASENFUSS & PIESKE, 2002). De fato, quando avaliamos a contratilidade dos cardiomiócitos isolados dos animais com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, observamos um significativo prejuízo nos índices contráteis avaliados, conforme apresentado na seção de resultados. A inibição aguda da PKC β II melhorou parcialmente a resposta contrátil dos cardiomiócitos isolados dos ratos com insuficiência cardíaca, sendo que cronicamente, sua inibição resgatou totalmente as características contráteis apresentadas no grupo *sham*. Baseados nesses dados, sugerimos que a somatória dos efeitos agudos da inibição da PKC β II na contratilidade do cardiomiócito pode resultar cronicamente em melhora significativa da função contrátil do cardiomiócito. Não podemos descartar os efeitos benéficos da inibição da PKC β II sobre o remodelamento cardíaco, que também contribui de maneira significativa para a melhora da função cardíaca.

Uma vez que encontramos um efeito positivo da inibição da PKC β II sobre a contratilidade do cardiomiócito isolado, levantamos duas possíveis hipóteses. A primeira estaria relacionada ao aumento da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao cálcio decorrente da menor fosforilação da troponina I pela PKC β II; e a segunda relacionaria-se à melhora da dinâmica intracelular do cálcio. Para testar a primeira hipótese, avaliamos primeiramente os níveis totais e fosforilados da troponina I no lisado cardíaco dos ratos com insuficiência cardíaca tratados com TAT e β IIV5-3. Como descrito na seção dos resultados, observamos hiperfosforilação da troponina I cardíaca nos resíduos serinas 23/24 nos animais com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica. A inibição sustentada da PKC β II diminuiu significativamente a fosforilação da troponina I, sem modificações em seus níveis totais.

Na insuficiência cardíaca, o aumento na fosforilação das serinas 23/24 ou serinas 43/45, sítios de fosforilação pelas PKCs, reduz drasticamente tanto a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio quanto a atividade da MgATPase (LAYLAND, SOLARO & SHAH, 2005; NOLAND, GUO, RAYNOR, JIDEAMA, AVERYHART-FULLARD, SOLARO & KUO, 1995; ROMAN, GOLDSPIK, SPAITE, URBONIENE, MCKINNEY, GEENEN, SOLARO & BUTTRICK, 2004), prejudicando a função contrátil do cardiomiócito. Entretanto, não se sabe ao certo qual isoforma de PKC regula diretamente essa resposta. Na tentativa de melhor compreender o papel da isoforma PKC β II na regulação da contratilidade cardíaca, imunoprecipitamos a PKC β II no lisado cardíaco dos animais com insuficiência cardíaca tratados com TAT e β IIV5-3 e avaliamos a interação entre a PKC β II e a troponina I. De fato, parece haver uma maior interação entre a PKC β II e a troponina I na insuficiência cardíaca, onde a inibição sustentada da PKC β II minimizou essa interação para valores próximos do grupo *sham*. Nossos dados mostrando maior fosforilação da troponina I nas serinas 23/24, bem como a maior interação entre a PKC β II e a troponina I sugerem que a troponina I cardíaca é substrato da PKC β II e está hiperfosforilada na insuficiência cardíaca. Entretanto, não podemos demonstrar uma relação causal desta interação no desenvolvimento da insuficiência cardíaca, uma vez que não avaliamos a

sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao cálcio nos animais com insuficiência cardíaca TAT e β IIV5-3.

Para testar a segunda hipótese descrita acima, avaliamos os efeitos dos tratamentos agudo (inibição da PKC β II durante o ensaio celular) e crônico (inibição sustentada da PKC β II por seis semanas) na dinâmica do cálcio nos cardiomiócitos isolados dos grupos com insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica.

6.6 Efeito da inibição aguda e crônica da PKC β II no transiente de cálcio de cardiomiócitos isolados de ratos adultos com insuficiência cardíaca induzida por isquemia do miocárdio

Conforme descrito acima, cardiomiócitos isolados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca apresentam contratilidade prejudicada. A redução na contratilidade pode ser mediada por dois processos distintos: a menor sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, ou o prejuízo no transiente celular do cálcio. Uma série de estudos na literatura aponta para um prejuízo no transiente de cálcio em corações insuficientes. Esse prejuízo está relacionado à diminuição da liberação de cálcio pelos canais de rianodina, menor recaptação desse íon pela SERCA e maior extrusão pelo trocador sódio/cálcio (HASENFUSS & PIESKE, 2002; SIPIDO, 2000), refletindo na diminuição do pico de cálcio sistólico e acúmulo de cálcio na diástole.

Ao contrário do sugerido pela literatura, nossos resultados apontam para um aumento no pico de cálcio sistólico, bem como na velocidade de liberação de cálcio, o que nos surpreendeu em princípio. Os cardiomiócitos oriundos dos animais com insuficiência cardíaca também apresentavam um atraso para alcançar o pico de cálcio quando comparados com o grupo *sham*. A inibição aguda da PKC β II reverteu a dinâmica do cálcio que passava a apresentar um perfil próximo ao do grupo *sham*. Já o tratamento crônico pareceu não exercer nenhum efeito quando comparado com os animais com insuficiência cardíaca tratados com TAT. Recentemente, MORK, SJAASTAD, SEJERSTED & LOUCH (2009) avaliaram a dinâmica do cálcio em cardiomiócitos isolados de camundongos 10 semanas após a ligadura da

artéria coronária. Interessantemente, os autores observaram um aumento da dinâmica do cálcio celular nessa fase. Além disso, os autores encontraram um prolongamento do tempo para alcançar o pico do transiente de cálcio semelhante ao encontrado em nosso estudo. Utilizando ensaios de eletrofisiologia, os autores constataram que o aumento da dinâmica do cálcio intracelular nos animais com insuficiência cardíaca decorreu-se do maior influxo de cálcio pelos canais de cálcio do tipo L presentes na membrana celular (sarcolema) como consequência do prolongamento do potencial de ação celular. Mesmo com essas alterações na dinâmica do cálcio, os animais apresentavam disfunção cardíaca semelhante à encontrada em nosso estudo. Esses dados sugerem que o comportamento da dinâmica do cálcio pode variar de acordo com o modelo estudado e a fase em que a doença se encontra, podendo não refletir diretamente o perfil contrátil do cardiomiócito.

6.7 Efeito da inibição das isoformas PKC β II ou PKC β I na função cardíaca, remodelamento cardíaco e ativação das diferentes isoformas de PKC no modelo de insuficiência cardíaca etiologia hipertensiva

Utilizando o modelo de insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva, conseguimos reproduzir o mesmo fenótipo cardíaco observado no modelo de insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica, ou seja sinais clínicos como contratilidade cardíaca reduzida, fibrose cardíaca e redução na sobrevida também foram observados na insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva. Os animais tratados com o inibidor β IIV5-3 apresentaram significativa melhora na sobrevida comparados com o grupo insuficiência cardíaca TAT tanto durante o período do tratamento quanto nas semanas seguintes ao término deste. Além disso, os animais tratados com β IIV5-3 apresentaram uma manutenção da função cardíaca comparados ao período pré-tratamento. Cabe destacar que quando o tratamento iniciou-se, os animais apresentavam hipertrofia cardíaca com manutenção da função cardíaca. Dessa forma, podemos sugerir que a inibição da PKC β II foi capaz

de prevenir a progressão da hipertrofia cardíaca compensada para a insuficiência cardíaca nesse modelo animal. Os animais tratados com o peptídeo β IV5-3 apresentaram significativa diminuição da pressão arterial ao longo do período do estudo. Esse resultado levanta a hipótese de possíveis ações da PKC β II na regulação da pressão arterial, seja por modulação central (regulação do débito cardíaco), ou pela modulação periférica (regulação direta do tônus vascular).

A inibição da PKC β I utilizando o peptídeo β IV5-3, específico para essa isoenzima conforme demonstrado nos resultados, não exerceu nenhum efeito benéfico sobre a função cardíaca, o remodelamento ventricular e a sobrevida dos animais com insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva, o que destaca a especificidade da PKC β II nesse processo, considerando-se a alta homologia entre essas duas isoformas de PKC.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a PKC β II cardíaca está com sua atividade aumentada na progressão da insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica e contribui de maneira significativa para o remodelamento cardíaco patológico e o agravamento da disfunção cardíaca. Além disso, a inibição seletiva da PKC β II, por meio da utilização de pequenos peptídeos moduladores de interação proteína-proteína, foi capaz de reverter o fenótipo da insuficiência cardíaca e melhorar a sobrevida dos animais. A reversão do remodelamento cardíaco e da disfunção ventricular foi mediada pela menor fosforilação e ativação de substratos específicos da PKC β II no coração. Por fim, demonstramos que a inibição sustentada da PKC β II foi eficaz em evitar a progressão do remodelamento cardíaco compensado para a insuficiência cardíaca em modelo animal de hipertensão arterial. Dessa forma, concluímos que a ativação da PKC β II está envolvida na fisiopatologia e progressão da insuficiência cardíaca. Portanto, uma compreensão mais detalhada da participação das isoforma PKC β II na insuficiência cardíaca por meio da utilização de inibidores específicos será de crucial importância para testar o

impacto clínico de terapias celulares direcionadas para quinases-alvo no tratamento da insuficiência cardíaca.

REFERÊNCIAS

BEGLEY, R.; LIRON, T.; BARYZA, J.; MOCHLY-ROSEN, D. Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. Biochemical and Biophysical Research Communication, New York, v.318, n.4, p.949-54, 2004

BOGOYEVITCH, M. A.; PARKER, P. J.; SUGDEN, P. H. Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-epsilon is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. Circulation Research, Dallas, v.72, n.4, p.757-67, 1993

BOWLING, N.; WALSH, R. A.; SONG, G.; ESTRIDGE, T.; SANDUSKY, G. E.; FOUTS, R. L.; MINTZE, K.; PICKARD, T.; RODEN, R.; BRISTOW, M. R.; SABBAH, H. N.; MIZRAHI, J. L.; GROMO, G.; KING, G. L.; VLAHOS, C. J. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. Circulation, Dallas, v.99, n.3, p.384-91, 1999

BOWMAN, J. C.; STEINBERG, S. F.; JIANG, T.; GEENEN, D. L.; FISHMAN, G. I.; BUTTRICK, P. M. Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. Journal of Clinical Investigation, London, v.100, n.9, p.2189-95, 1997

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochemistry, New York, v.72, p.248-54, 1976

BRAZ, J. C.; BUENO, O. F.; DE WINDT, L. J.; MOLKENTIN, J. D. PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). Journal of Cell Biology, New York, v.156, n.5, p.905-19, 2002

BRAZ, J. C.; GREGORY, K.; PATHAK, A.; ZHAO, W.; SAHIN, B.; KLEVITSKY, R.; KIMBALL, T. F.; LORENZ, J. N.; NAIRN, A. C.; LIGGETT, S. B.; BODI, I.; WANG, S.; SCHWARTZ, A.; LAKATTA, E. G.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; ROBBINS, J.; HEWETT, T. E.; BIBB, J. A.; WESTFALL, M. V.; KRANIAS, E. G.; MOLKENTIN, J. D. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. Nature Medicine, London, v.10, n.3, p.248-54, 2004

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. Journal of Applied Physiology, Bethesda, v.45, n.6, p.1009-15, 1978

BROWN, L. The Criteria Committee of New York Heart Association. Boston. 1994. 253-256 p.

BRUM, P. C.; ROLIM, N. P.; BACURAU, A. V.; MEDEIROS, A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. Anais Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v.78, n.3, p.485-503, 2006.

BUDAS, G. R.; SUKHODUB, A.; ALESSI, D. R.; JOVANOVIC, A. 3'Phosphoinositide-dependent kinase-1 is essential for ischemic preconditioning of the myocardium. FASEB Journal, Bethesda, v.20, n.14, p.2556-8, 2006

BUJAK, M.; REN, G.; KWEON, H. J.; DOBACZEWSKI, M.; REDDY, A.; TAFFET, G.; WANG, X. F.; FRANGOGIANNIS, N. G. Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. Circulation, Dallas, v.116, n.19, p.2127-38, 2007

CHEN, L.; HAHN, H.; WU, G.; CHEN, C. H.; LIRON, T.; SCHECHTMAN, D.; CAVALLARO, G.; BANCI, L.; GUO, Y.; BOLLI, R.; DORN, G. W., 2ND; MOCHLY-ROSEN, D. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.98, n.20, p.11114-9, 2001

CHURCHILL, E.; BUDAS, G.; VALLENTIN, A.; KOYANAGI, T.; MOCHLY-ROSEN, D. PKC isozymes in chronic cardiac disease: possible therapeutic targets? Annu Rev Pharmacol Toxicol, Palo Alto, v.48, p.569-99, 2008

COLUCCI, W. S. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. Clinical Cardiology, New York, v.21, n.12 Suppl 1, p.120-4, 1998

CSUKAI, M.; CHEN, C. H.; DE MATTEIS, M. A.; MOCHLY-ROSEN, D. The coatamer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase C epsilon. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v.272, n.46, p.29200-6, 1997

DE CAMPOS LOPES, C. B.; YAMADA, A. T.; ARAUJO, F.; PEREIRA BARRETO, A. C.; MANSUR, A. J. Socioeconomic factors in the prognosis of heart failure in a Brazilian cohort. International Journal of Cardiology, Sydney, v.113, n.2, p.181-7, 2006

DE SIMONE, G.; PALMIERI, V. [Echocardiographic evaluation of ventricular hypertrophy]. Recent Progression Medicine, Dallas, v.93, n.1, p.58-62, 2002

DISATNIK, M. H.; BURAGGI, G.; MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. Experimental Cell Research, San Francisco, v.210, n.2, p.287-97, 1994

DORN, G. W., 2ND; FORCE, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. Journal of Clinical Investigation, London, v.115, n.3, p.527-37, 2005

DORN, G. W., 2ND; SOUROUJON, M. C.; LIRON, T.; CHEN, C. H.; GRAY, M. O.; ZHOU, H. Z.; CSUKAI, M.; WU, G.; LORENZ, J. N.; MOCHLY-ROSEN, D. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.96, n.22, p.12798-803, 1999

FRANCHINI, K. G. Função e disfunção autonômica na doença cardiovascular. Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo, v.2, p.285-97, 1998

FRIGERIO, M.; ROUBINA, E. Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. American Journal of Cardiology, Dallas, v.96, n.12A, p.10L-18L, 2005

GHEORGHIAD, M.; BONOW, R. O. Chronic heart failure in the United States: a manifestation of coronary artery disease. Circulation, Dallas, v.97, n.3, p.282-9, 1998

GONZALEZ, G. E.; SEROPIAN, I. M.; KRIEGER, M. L.; PALLEIRO, J.; LOPEZ VERRILLI, M. A.; GIRONACCI, M. M.; CAVALLERO, S.; WILENSKY, L.; TOMASI, V. H.; GELPI, R. J.; MORALES, C. Effect of Early vs Late AT1 Receptor Blockade with Losartan on Post-Myocardial Infarction Ventricular Remodeling in Rabbits. American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology, Bethesda, 2009

GU, X.; BISHOP, S. P. Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. Circulation Research, Dallas, v.75, n.5, p.926-31, 1994

HASENFUSS, G.; PIESKE, B. Calcium cycling in congestive heart failure. Journal of Molecular Cell Cardiology, Cincinnati, v.34, n.8, p.951-69, 2002

INAGAKI, K.; IWANAGA, Y.; SARAI, N.; ONOZAWA, Y.; TAKENAKA, H.; MOCHLY-ROSEN, D.; KIHARA, Y. Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. Journal of Molecular Cell Cardiology, Cincinnati, v.34, n.10, p.1377-85, 2002a

_____. Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. Journal of molecular and cellular cardiology, Cincinnati, v.34, n.10, p.1377-85, 2002b

INAGAKI, K.; KOYANAGI, T.; BERRY, N. C.; SUN, L.; MOCHLY-ROSEN, D. Pharmacological inhibition of epsilon-protein kinase C attenuates cardiac fibrosis and dysfunction in hypertension-induced heart failure. Hypertension, Dallas, v.51, n.6, p.1565-9, 2008

JOHNS, T. N.; OLSON, B. J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. Annals of Surgery, Palo Alto, v.140, n.5, p.675-82, 1954

KATZ, A. M. Proliferative signaling and disease progression in heart failure. Circulation Journal, Dallas, v.66, n.3, p.225-31, 2002

_____. Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptive proliferative responses. Journal of Cell Molecular Medicine, Bethesda, v.7, n.1, p.1-10, 2003. New York.

KIM, J.; CHOI, Y. L.; VALLENTIN, A.; HUNRICHS, B. S.; HELLERSTEIN, M. K.; PEEHL, D. M.; MOCHLY-ROSEN, D. Centrosomal PKC β and pericentrin are critical for human prostate cancer growth and angiogenesis. Cancer Research, New York, v.68, n.16, p.6831-9, 2008

KOBE, B.; HEIERHORST, J.; KEMP, B. E. Intrasteric regulation of protein kinases. Advances in Second Messenger Phosphoprotein Research, New York, v.31, p.29-40, 1997

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, v.227, n.5259, p.680-5, 1970

LAYLAND, J.; SOLARO, R. J.; SHAH, A. M. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. Cardiovascular Research, London, v.66, n.1, p.12-21, 2005

MALHOTRA, A.; KANG, B. P.; OPAWUMI, D.; BELIZAIRE, W.; MEGGS, L. G. Molecular biology of protein kinase C signaling in cardiac myocytes. Molecular Cell Biochemistry, Bethesda, v.225, n.1-, p.97-107, 2001

MARSTON, S. B.; DE TOMBE, P. P. Troponin phosphorylation and myofilament Ca²⁺-sensitivity in heart failure: increased or decreased? Journal of molecular and cellular cardiology, Cincinnati, v.45, n.5, p.603-7, 2008

MCALISTER, F. A.; WIEBE, N.; EZEKOWITZ, J. A.; LEUNG, A. A.; ARMSTRONG, P. W. Meta-analysis: beta-blocker dose, heart rate reduction, and death in patients with heart failure. Annals of Internal Medicine, Palo Alto, v.150, n.11, p.784-94, 2009

MOCHLY-ROSEN, D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. Science, London, v.268, n.5208, p.247-51, 1995

MOCHLY-ROSEN, D.; GORDON, A. S. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. FASEB Journal, Bethesda, v.12, n.1, p.35-42, 1998

MOCHLY-ROSEN, D.; KHANER, H.; LOPEZ, J. Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.88, n.9, p.3997-4000, 1991

MOCHLY-ROSEN, D.; WU, G.; HAHN, H.; OSINSKA, H.; LIRON, T.; LORENZ, J. N.; YATANI, A.; ROBBINS, J.; DORN, G. W., 2ND. Cardioprotective effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. Circulation Research, Dallas, v.86, n.11, p.1173-9, 2000

MORK, H. K.; SJAASTAD, I.; SEJERSTED, O. M.; LOUCH, W. E. Slowing of cardiomyocyte Ca²⁺ release and contraction during heart failure progression in postinfarction mice. American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology, Bethesda, v.296, n.4, p.H1069-79, 2009

MURRIEL, C. L.; CHURCHILL, E.; INAGAKI, K.; SZWEDA, L. I.; MOCHLY-ROSEN, D. Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. Journal of Biology Chemistry, Bethesda, v.279, n.46, p.47985-91, 2004

NIENABER, J. J.; TACHIBANA, H.; NAGA PRASAD, S. V.; ESPOSITO, G.; WU, D.; MAO, L.; ROCKMAN, H. A. Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function and ameliorates pressure overload heart failure. Journal of Clinical Investigation, London, v.112, n.7, p.1067-79, 2003. London.

NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science, London, v.258, n.5082, p.607-14, 1992

NOLAND, T. A., JR.; GUO, X.; RAYNOR, R. L.; JIDEAMA, N. M.; AVERYHART-FULLARD, V.; SOLARO, R. J.; KUO, J. F. Cardiac troponin I mutants. Phosphorylation by protein kinases C and A and regulation of Ca(2+)-stimulated MgATPase of reconstituted actomyosin S-1. Journal of Biology Chemistry, Bethesda, v.270, n.43, p.25445-54, 1995

PALANIYANDI, S. S.; INAGAKI, K.; MOCHLY-ROSEN, D. Mast cells and epsilonPKC: a role in cardiac remodeling in hypertension-induced heart failure. Journal of molecular and cellular cardiology, Cincinnati, v.45, n.6, p.779-86, 2008

PALANIYANDI, S. S.; SUN, L.; FERREIRA, J. C.; MOCHLY-ROSEN, D. Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? Cardiovascular Research, London, v.82, n.2, p.229-39, 2009

PASS, J. M.; ZHENG, Y.; WEAD, W. B.; ZHANG, J.; LI, R. C.; BOLLI, R.; PING, P. PKCepsilon activation induces dichotomous cardiac phenotypes and modulates PKCepsilon-RACK interactions and RACK expression. American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology, Bethesda, v.280, n.3, p.H946-55, 2001

PFEFFER, M. A.; PFEFFER, J. M.; FISHBEIN, M. C.; FLETCHER, P. J.; SPADARO, J.; KLONER, R. A.; BRAUNWALD, E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circulation Research, Dallas, v.44, n.4, p.503-12, 1979

QI, X.; INAGAKI, K.; SOBEL, R. A.; MOCHLY-ROSEN, D. Sustained pharmacological inhibition of deltaPKC protects against hypertensive encephalopathy through prevention of blood-brain barrier breakdown in rats. Journal of Clinical Investigation, London, v.118, n.1, p.173-82, 2008

ROMAN, B. B.; GEENEN, D. L.; LEITGES, M.; BUTTRICK, P. M. PKC-beta is not necessary for cardiac hypertrophy. American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology, Bethesda, v.280, n.5, p.H2264-70, 2001

ROMAN, B. B.; GOLDSPINK, P. H.; SPAITE, E.; URBONIENE, D.; MCKINNEY, R.; GEENEN, D. L.; SOLARO, R. J.; BUTTRICK, P. M. Inhibition of PKC phosphorylation of cTnI improves cardiac performance in vivo. American Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology, Bethesda, v.286, n.6, p.H2089-95, 2004

RYBIN, V. O.; STEINBERG, S. F. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. Circulation Research, Dallas, v.74, n.2, p.299-309, 1994

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. Circulation Research, Dallas, v.73, n.3, p.413-23, 1993

SAHN, D. J.; DEMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation, Dallas, v.58, n.6, p.1072-83, 1978

SANTOS, R. A.; CASTRO, C. H.; GAVA, E.; PINHEIRO, S. V.; ALMEIDA, A. P.; PAULA, R. D.; CRUZ, J. S.; RAMOS, A. S.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; BADER, M.; ALENINA, N.; KITTEN, G. T.; FERREIRA, A. J. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. Hypertension, New York, v.47, n.5, p.996-1002, 2006

SCHERRER-CROSBIE, M. Role of echocardiography in studies of murine models of cardiac diseases. Archieve of Mal Coeur Vaiss, Berlin, v.99, n.3, p.237-41, 2006

SHUBEITA, H. E.; MCDONOUGH, P. M.; HARRIS, A. N.; KNOWLTON, K. U.; GLEMBOTSKI, C. C.; BROWN, J. H.; CHIEN, K. R. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial

cell hypertrophy. Journal of Biology Chemistry, Bethesda, v.265, n.33, p.20555-62, 1990

SIMPSON, P. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. Journal of Clinical Investigation, London, v.72, n.2, p.732-8, 1983

SIPIDO, K. R. Local CA(2+) release in heart failure: timing is important. Circulation Research, Dallas, v.87, n.11, p.966-8, 2000

SPADARO, J.; FISHBEIN, M. C.; HARE, C.; PFEFFER, M. A.; MAROKO, P. R. Characterization of myocardial infarcts in the rat. Archieve of Pathology and Laboratory Medicine, Palo Alto, v.104, n.4, p.179-83, 1980

STEBBINS, E. G.; MOCHLY-ROSEN, D. Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. Journal of Biology Chemistry, Bethesda, v.276, n.32, p.29644-50, 2001

STEIN, K. M.; KARAGOUNIS, L. A.; ANDERSON, J. L.; KLIGFIELD, P.; LERMAN, B. B. Fractal clustering of ventricular ectopy correlates with sympathetic tone preceding ectopic beats. Circulation, Dallas, v.91, n.3, p.722-7, 1995

STEINBERG, S. F.; GOLDBERG, M.; RYBIN, V. O. Protein kinase C isoform diversity in the heart. Journal of Molecular Cell Cardiology, Cincinnati, v.27, n.1, p.141-53, 1995

TAKANO, H.; HASEGAWA, H.; NAGAI, T.; KOMURO, I. Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies. Internal Medicine, Palo Alto, v.42, n.6, p.465-9, 2003

TAKEISHI, Y.; PING, P.; BOLLI, R.; KIRKPATRICK, D. L.; HOIT, B. D.; WALSH, R. A. Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy. Circulation Research, Dallas, v.86, n.12, p.1218-23, 2000

TOWBIN, H.; OZBEY, O.; ZINGEL, O. An immunoblotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. Electrophoresis, Bethesda, v.22, n.10, p.1887-93, 2001

WAKASAKI, H.; KOYA, D.; SCHOEN, F. J.; JIROUSEK, M. R.; WAYS, D. K.; HOIT, B. D.; WALSH, R. A.; KING, G. L. Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unites States of America, Washington, v.94, n.17, p.9320-5, 1997

WANG, M.; YIP, G. W.; WANG, A. Y.; ZHANG, Y.; HO, P. Y.; TSE, M. K.; YU, C. M.; SANDERSON, J. E. Tissue Doppler imaging provides incremental prognostic value in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy. Journal of Hypertension, Dallas, v.23, n.1, p.183-91, 2005

WILKINSON, S. E.; HALLAM, T. J. Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated? Trends in Pharmacology Sciences, London, v.15, n.2, p.53-7, 1994

WU, G.; TOYOKAWA, T.; HAHN, H.; DORN, G. W., 2ND. Epsilon protein kinase C in pathological myocardial hypertrophy. Analysis by combined transgenic expression of translocation modifiers and Galphaq. Journal of Biology Chemistry, Bethesda, v.275, n.39, p.29927-30, 2000