UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

**“Contribuição dos receptores β_2 -adrenérgicos na função e
dinâmica mitocondriais da musculatura esquelética em resposta ao
exercício físico aeróbico”**

Vanessa Azevedo Voltarelli

São Paulo
2016

VANESSA AZEVEDO VOLTARELLI

“Contribuição dos receptores β_2 -adrenérgicos na função e dinâmica mitocondriais da musculatura esquelética em resposta ao exercício físico aeróbico”

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

São Paulo

2016

VANESSA AZEVEDO VOLTARELLI

“Contribuição dos receptores β_2 -adrenérgicos na função e dinâmica mitocondriais da musculatura esquelética em resposta ao exercício físico aeróbico”

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

São Paulo

2016

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AZEVEDO VOLTARELLI, Vanessa

Título: Contribuição dos receptores β_2 -adrenérgicos na função e dinâmica mitocondriais da musculatura esquelética em resposta ao exercício físico aeróbico.

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Dedico este trabalho ao meu noivo, aos meus pais e ao meu irmão.

À minha amada família que sempre me apoiou incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À professora Patricia Brum, muito mais que uma mentora, uma mãe científica, pessoa que sempre me apoiou e acreditou em mim, além de ter sido ao longo de todos esses anos uma fonte de inspiração para a minha carreira científica.

Ao meu noivo, meu amor, meu amigo e companheiro Luiz Bechara, por todo apoio emocional e profissional, pelas inúmeras horas de sono, feriados e fins de semana que perdeu junto comigo para me dar suporte e me ajudar, e por ter sido uma das pessoas que mais colaborou para o meu amadurecimento como pessoa e cientista nesses quatro anos.

Aos meus pais Silvio e Elizabeth, minha base, meus exemplos de garra, simplicidade, determinação e honestidade, meus melhores e verdadeiros amigos, que sempre apoiaram minhas escolhas e estiveram presentes nos momentos bons e ruins da minha vida pessoal e profissional.

Ao meu irmão Fabrício, pela preocupação e carinho que tem por mim, por toda a torcida e ajuda pessoal e profissional, e por ter sido a principal inspiração para o início da minha carreira acadêmica.

Aos meus amigos, colegas de trabalho e *roomies* da república “Filhos de Patricia”, Carmão, Juliane, Bozi, Paulo, Ivy, e o agregado Ney, pelos bons anos de companheirismo e suporte emocional, e também pelas longas e divertidas discussões sobre ciência, sobre a vida, e sobre tudo, colaborando, direta ou indiretamente, para o meu amadurecimento como pesquisadora e ser humano.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Aline, Telma, Nathalie, Jana, Lari, Chris, Gabriel, Paulo, Rodrigo, Raphael, e também àqueles que já passaram pelo nosso laboratório e que fizeram parte da minha vida acadêmica, Andréa, Bianco, Bozi, Carmão, Dani, Fabi e Max, pela amizade maravilhosa, pela colaboração e ajuda, pelos momentos divertidos que passamos juntos, no laboratório ou fora dele e por tornarem o meu ambiente de trabalho agradável e prazeroso.

À minha primeira aluna de iniciação científica, Larissa, por ter me dado a oportunidade de iniciar o aprendizado da orientação científica, por ter tornado esse processo muito mais fácil e divertido, e por ter me ajudado na construção deste projeto de doutorado.

Aos técnicos, Ney, Katt, Úrsula, Marcele, Glória, Luciano, e também Alex que esteve alguns anos conosco, pela colaboração e ajuda essenciais ao desenvolvimento do meu projeto.

Ao professor Julio Ferreira e a todos os membros de seu laboratório, Juliane, Bozi, Luiz, Ricardo, Cintia, Vanessa, Kátia, Márcio, Laís e Rudá, por terem me dado a oportunidade de trabalhar e de aprender com eles, e por terem colaborado na concepção e na execução do meu projeto de doutorado.

Aos professores Paulo Ramires e Edilamar Menezes de Oliveira, e seus respectivos alunos, pela convivência, colaboração e aprendizado científico.

À Secretaria de Pós-Graduação da Escola de Educação Física e Esporte da USP, em especial aos secretários Márcio e Ilza, por sempre fornecerem o suporte necessário aos alunos de pós-graduação, pela compreensão e paciência conosco, e pelo profissionalismo que possuem.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO

VOLTARELLI, V.A. **Contribuição dos receptores β_2 -adrenérgicos na função e dinâmica mitocondriais da musculatura esquelética em resposta ao exercício físico aeróbico.** 2016. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

Os efeitos benéficos do exercício físico aeróbico (EFA) frente à prevenção e ao tratamento de doenças ocorrem por meio de adaptações agudas e crônicas em diversos tecidos e sistemas orgânicos, dentre os quais o tecido muscular esquelético assume papel de destaque. Considerando que a musculatura esquelética é rica em mitocôndrias, não surpreende o fato de que o aumento da capacidade e potência aeróbicas induzido pelo EFA ocorra principalmente em função das adaptações mitocondriais. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos nessas adaptações mitocondriais induzidas pelo EFA não são completamente compreendidos. Considerando-se que a atividade nervosa simpática aumenta consideravelmente durante a realização de uma sessão de EFA, parte das respostas mitocondriais ao EFA poderia ser mediada pela ativação dos receptores β -adrenérgicos (β -AR) na musculatura esquelética, representados predominantemente pelo subtipo β_2 (~ 90%). Com isso, na primeira parte do presente estudo, testou-se a hipótese de que a sinalização β_2 -AR contribuiria para as respostas de função e dinâmica mitocondriais induzidas pela ativação adrenérgica aguda na musculatura esquelética. Para isso, o agonista β -AR não seletivo isoproterenol foi administrado na presença ou ausência do antagonista β_2 -AR específico, ICI 118,551, tanto em miotúbulos diferenciados a partir da linhagem de células C2C12 como em camundongos da cepa FVB. Os dados demonstraram que a ativação β -AR aumentou significativamente a respiração mitocondrial em miotúbulos e em fibras musculares isoladas do músculo tibial anterior de camundongos, e que tal resposta foi dependente da ativação dos receptores β_2 -AR via eixo proteína $G\alpha_s$ -AMPc-PKA. Em relação à dinâmica mitocondrial, os dados obtidos demonstraram que a ativação dos receptores β_2 -AR aumentou a fusão mitocondrial na musculatura esquelética, e que esta resposta estava associada a um aumento da proteína de fusão Mfn1. Na segunda parte do

presente estudo, testou-se a hipótese de que a ativação β_2 -AR contribuiria para as respostas mitocondriais agudas induzidas pelo EFA na musculatura esquelética. Para isso, camundongos FVB foram submetidos a uma sessão de EFA em esteira rolante com e sem o bloqueio dos receptores β_2 -AR com o antagonista ICI 118,551, e parâmetros de função e dinâmica mitocondriais foram avaliados. O EFA foi capaz de aumentar a respiração máxima mitocondrial em fibras musculares isoladas, e este efeito foi parcialmente prevenido pelo bloqueio dos receptores β_2 -AR. Além disso, assim como observado com o tratamento com isoproterenol, o EFA promoveu aumento da fusão mitocondrial na musculatura esquelética, sendo que a ativação β_2 -AR estava associada a essa resposta, porém em uma menor magnitude em relação aos efeitos observados com o estímulo farmacológico. Assim como observado no tratamento com isoproterenol, a expressão de Mfn1 foi aumentada pela sessão de EFA, a qual não foi atenuada pelo bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que os receptores β_2 -AR têm papel importante no metabolismo muscular esquelético, modulando a função e a dinâmica mitocondriais. Essa resposta é evidente mediante ativação direta via agonistas β -AR no músculo esquelético, no entanto, os receptores β_2 -AR modulam parcialmente as respostas mitocondriais em resposta à uma sessão de EFA.

Palavras-chave: Exercício físico aeróbico; mitocôndria; receptores β_2 -adrenérgicos.

ABSTRACT

VOLTARELLI, V.A. **Role of β_2 -adrenoceptors in skeletal muscle mitochondrial function and dynamics in response to aerobic exercise**. 2016. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.

The beneficial effects of aerobic exercise (AE) for prevention and treatment of diseases are due to acute and chronic adaptations in several organ systems, including skeletal muscle, one of the main tissues involved in these adaptations. Since skeletal muscle contains high amounts of mitochondria, the increased aerobic capacity induced by AE occurs mainly due to mitochondrial adaptations. However, the molecular mechanisms underlying skeletal muscle mitochondrial adaptations induced by AE are not fully understood. One of the mechanisms by which these mitochondrial adaptations may occur is sympathetic activation mediated by β -adrenergic receptors (β -AR) in skeletal muscle, predominantly represented by β_2 subtype (~90%). Considering that sympathetic activity increases during AE, β_2 -AR signaling might be involved in skeletal muscle mitochondrial adaptations in response to AE. Thus, in the first part of this study, we tested the hypothesis that acute β_2 -AR activation contributes to mitochondrial function and dynamics adaptations in skeletal muscle. For this, both differentiated C2C12 myotubes and FVB mice were treated with the nonselective β -AR agonist isoproterenol in the presence or absence of the specific β_2 -AR antagonist, ICI 118,551. The data showed that β -AR activation significantly increased mitochondrial respiration in myotubes and muscle fiber bundles isolated from mice tibialis anterior, and that this response was dependent on β_2 -AR receptors activation via protein G_{α_s} -cAMP-PKA signaling cascade. Regarding mitochondrial dynamics, the data showed that β_2 -AR receptor activation increased mitochondrial fusion in skeletal muscle and that this response was associated to an increase in Mfn1. In the second part of this study, we tested the hypothesis that β_2 -AR activation would contribute to acute mitochondrial responses induced by AE in skeletal muscle. For this, FVB mice underwent one session of AE on a treadmill with and without β_2 -AR receptor blockade with ICI 118,551, and parameters of

mitochondrial function and dynamics were evaluated. AE was able to increase maximal mitochondrial respiration in isolated muscle fibers, and this effect was partially prevented by blocking β_2 -AR receptors. Furthermore, as observed with isoproterenol treatment, AE increased mitochondrial fusion in skeletal muscle. β_2 -AR activation was associated with this response, but in a smaller magnitude compared to the effects observed with pharmacological stimulation. As observed with the isoproterenol treatment, Mfn1 expression was increased by AE, which was not attenuated by blocking β_2 -AR receptors with ICI 118,551. Therefore, one can conclude that β_2 -AR receptors play an important role in skeletal muscle metabolism, modulating mitochondrial function and dynamics. This response is evident by direct activation through β -AR agonists in skeletal muscle, however, β_2 -AR receptors partially modulate mitochondrial responses induced by AE.

Keywords: Aerobic exercise; mitochondria; β_2 -adrenoceptors.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Esquema ilustrativo da organização e funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Complexos I, II, III, IV (citocromo c oxidase) e V (ATP sintase); e^- (elétrons); H^+ (íons hidrogênio); NADH (nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida); $FADH_2$ (flavina-adenina dinucleotídeo reduzida); Q (coenzima Q); Cit c (citocromo c). Adaptado de TAHARA, NAVARETE e KOWALTOWSKI (2009).....
	34
FIGURA 2	Esquema ilustrativo do balanço entre os processos de fusão e fissão mitocondrial, e as proteínas envolvidas nesses processos. DRP1 (<i>dynammin-related protein 1</i>); Fis1 (<i>fission 1 homologue protein</i>); Mfn1 (mitofusina 1); Mfn2 (mitofusina 2) e OPA1 (<i>optical atrophy 1</i>). Adaptado de LIESA, PALACIN e ZORZANO (2009).....
	36
FIGURA 3	Principais vias de sinalização celular desencadeadas pela ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos. AC (adenilato ciclase); $G\alpha_s$ (proteína G estimulatória); $G\alpha_i$ (proteína G inibitória); $G_{\beta\gamma}$ (proteína G, subunidade $\beta\gamma$); AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico); PKA (proteína quinase A); Akt (proteína quinase B); RyR (receptor de rianodina); CREB (<i>cAMP response element-binding protein</i>); PGC-1 α (<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>); DRP1 (<i>dynammin-related protein 1</i>); Mfn2 (mitofusina 2); CI (complexo I); CII (complexo II); CIII (complexo III); CIV (complexo IV) e CV (complexo V)...
	46

FIGURA 4

Padronização da dose do antagonista ICI 118,551 na musculatura esquelética de camundongos. Expressão proteica dos substratos fosforilados pela PKA no músculo tibial anterior (TA) (A e C) e expressão proteica dos substratos fosforilados pela PKA no músculo sóleo (B e D) de camundongos controle, tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (100 μ g/kg) por 60 minutos (FOR), de camundongos tratados com 1 mg/kg do antagonista β_2 -AR ICI 118,551 por 30 minutos seguidos da administração de uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (100 μ g/kg) por 60 minutos (ICI (1 mg/kg) + FOR), de camundongos tratados com 5 mg/kg do antagonista β_2 -AR ICI 118,551 por 30 minutos seguidos da administração de uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (100 μ g/kg) por 60 minutos (ICI (5 mg/kg) + FOR, e de camundongos tratados com 10 mg/kg do antagonista β_2 -AR ICI 118,551 por 30 minutos seguidos da administração de uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (100 μ g/kg) por 60 minutos (ICI (10 mg/kg) + FOR). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo *vs. Controle, +vs. ICI (1 mg/kg) + FOR, e # vs. ICI (5 mg/kg) + FOR.....

54

FIGURA 5

Translocação de PKA para a mitocôndria após uma única sessão de exercício físico aeróbico. Expressão da quinase PKA na fração mitocondrial extraída da musculatura esquelética de camundongos FVB controles e na fração mitocondrial extraída da musculatura esquelética 0h, 3h e 6h após camundongos FVB se exercitarem conforme o protocolo descrito nos métodos. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo *vs. Controle, e +vs. 0h.....

57

FIGURA 6	Padronização do número de células utilizado para a avaliação do consumo de oxigênio em mioblastos de células C2C12. As drogas oligomicina (Oligo, inibidor da ATP sintase), FCCP (desacoplador mitocondrial) e Antimicina A + Rotenona (inibidores dos complexos dos III e I da mitocôndria, respectivamente) foram adicionadas ao longo do ensaio.....	58
FIGURA 7	Gel de pureza para as frações mitocondriais extraídas de músculo esquelético de camundongo e de miotúbulos diferenciados de células C2C12. Expressão da proteína citosólica enolase nas frações mitocondrial e citosólica extraídas da musculatura esquelética de camundongos (A); e expressão da proteína citosólica enolase nas frações mitocondrial e citosólica extraídas de miotúbulos diferenciados de células C2C12 (B).....	61
FIGURA 8	Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de formoterol em mioblastos de C2C12. Traçado do consumo de oxigênio basal antes e após o tratamento com formoterol (FOR), e na presença de oligomicina (Oligo), FCCP, e antimicina A mais rotenona (AntA + Rot) (A); consumo de oxigênio basal após o tratamento com formoterol (delta da respiração basal após o tratamento com formoterol pela respiração basal pré-tratamento) (B); consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (delta da respiração máxima pela respiração basal pré-tratamento (C) em mioblastos de C2C12 tratados com 100 nM, 1 μ M e 10 μ M de formoterol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle.....	66

FIGURA 9 Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de isoproterenol em mioblastos de C2C12. Traçado do consumo de oxigênio basal antes e após o tratamento com isoproterenol (ISO), e na presença de oligomicina (Oligo), FCCP, e antimicina A mais rotenona (AntA + Rot) (A); consumo de oxigênio basal após o tratamento com isoproterenol (delta da respiração basal após o tratamento com isoproterenol pela respiração basal pré-tratamento) (B); consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (delta da respiração máxima pela respiração basal pré-tratamento) (C) em mioblastos de C2C12 tratados com 100 nM, 1 µM e 10 µM de isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle.....

68

FIGURA 10 Expressão de miosina de cadeia pesada (MHC) em miotúbulos diferenciados a partir de mioblastos de células C2C12. Figuras ilustrativas de mioblastos e de miotúbulos após 6 dias de diferenciação (A); e expressão proteica de miosina de cabeça pesada (MHC) em mioblastos, miotúbulos diferenciados de C2C12, e no lisado total de músculo esquelético, utilizado como controle positivo da proteína MHC (B)...

70

FIGURA 11 Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de isoproterenol e do pré tratamento com ICI 118,551 em miotúbulos de células C2C12. Consumo de oxigênio basal (A); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (B) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (C) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o antagonista β_2 -AR ICI 118,551 (300 nM) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol; consumo de oxigênio basal (D); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (E) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (F) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o antagonista β_1 -AR CGP (300 nM) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol; percentual de queda no consumo de oxigênio basal (G) e percentual de queda no consumo de oxigênio máximo (H) promovido pelo pré-tratamento com ICI 118,551 ou CGP em relação ao grupo tratado somente com isoproterenol (H). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle, # vs. ISO e @ vs. ICI + ISO.....

73

FIGURA 12 Razão ATP/ADP em miotúbulos de C2C12 tratados com formoterol e com isoproterenol associado ao antagonista β_2 -AR ICI 118,551. Razão ATP/ADP em miotúbulos tratados com 100 nM, 1 μ M e 10 μ M de isoproterenol por 30 minutos (A); razão ATP/ADP em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o antagonista β_2 -AR ICI 118,551 (300 nM) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol (B) e razão ATP/ADP em miotúbulos tratados com 100 nM, 1 μ M e 10 μ M de formoterol por 30 minutos (C). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo *vs. Controle e # vs. ISO.....

75

FIGURA 13 Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio - O_2): efeito da administração de isoproterenol e do pré tratamento com PKI, PTX e FK506 em miotúbulos de células C2C12. Consumo de oxigênio basal (A); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (B) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (C) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com inibidor de PKA, o peptídeo PKI (20 μ M) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol; consumo de oxigênio basal (D); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (E) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (F) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o inibidor de $G\alpha_i$, PTX (0,75 μ g/ml) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol; consumo de oxigênio basal (G); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (H) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (I) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o inibidor de calcineurina, FK506 (5 μ M) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle, # vs. ISO; \$ vs. PKI; + vs. PTX e & vs. FK506.....

80

FIGURA 14 Expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial em miotúbulos de células C2C12 tratados com isoproterenol sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551. Expressão de Mfn1 (A); expressão de Mfn2 (B); expressão de OPA1 (C); e expressão de DRP1 (D) na fração mitocondrial de miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR não seletivo isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com ICI 118,551 (300 nM) por 30 minutos antes do tratamento com o agonista isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ desvio padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes.....

83

FIGURA 15 Morfologia mitocondrial: efeito da administração de isoproterenol sobre mioblastos de células C2C12. Conteúdo mitocondrial (A); área das mitocôndrias (B); perímetro mitocondrial (C) e alongamento mitocondrial (D) de mioblastos de células C2C12 tratados com 1 μ M de isoproterenol, agonista β -AR não seletivo, por 30 minutos; e conteúdo mitocondrial (E); área das mitocôndrias (F); perímetro mitocondrial (G) e alongamento mitocondrial (H) de mioblastos de células C2C12 tratados com 10 μ M de isoproterenol, agonista β -AR não seletivo, por 30 minutos. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle.....

84

FIGURA 16 Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de isoproterenol e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Respiração mitocondrial no basal (A); respiração máxima na presença de ADP (B); respiração independente da produção de ATP (na presença de oligomicina) (C); respiração máxima na presença do desacoplador FCCP (D); e controle respiratório (estado 3/estado 4) (E) nas fibras musculares esqueléticas extraídas do tibial anterior de camundongos tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β -AR não seletivo isoproterenol (10 mg/kg) por 30 minutos, ou tratados com ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da administração do agonista isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle e # vs. ISO.....

88

FIGURA 17	<p>Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de formoterol em camundongos. Respiração mitocondrial no basal (A); respiração máxima na presença de ADP (B); respiração independente da produção de ATP (na presença de oligomicina) (C); respiração máxima na presença do desacoplador FCCP (D); e controle respiratório (estado 3/estado 4) (E) nas fibras musculares esqueléticas extraídas do tibial anterior de camundongos tratados com salina, ou tratados com uma única dose do agonista β_2-AR formoterol (10 μg/kg) por 30 minutos. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle.....</p>	90
FIGURA 18	<p>Morfologia mitocondrial: efeito da administração de isoproterenol e do pré-tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Número de mitocôndrias por área total (A); área das mitocôndrias (B); perímetro mitocondrial (C); alongamento mitocondrial (D); e circularidade mitocondrial (E) do músculo tibial anterior de camundongos tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β-AR não seletivo isoproterenol (10 mg/kg) por 30 minutos, ou tratados com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da administração do agonista isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle e # vs. ISO.....</p>	92
FIGURA 19	<p>Imagens representativas da morfologia mitocondrial no músculo tibial anterior após a administração de isoproterenol e do pré-tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Imagens representativas da morfologia mitocondrial analisada por microscopia eletrônica no músculo tibial anterior de camundongos tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β-AR não seletivo isoproterenol (10 mg/kg) por 30 minutos, ou tratados com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da administração do agonista isoproterenol.....</p>	93

FIGURA 20 Expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética de camundongos tratados com isoproterenol sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551. Expressão de Mfn1 (A), Mfn2 (B), OPA1 (C) e Fis1 (D) no lisado total do músculo tibial anterior; e expressão de DRP1 (E) na fração mitocondrial extraída de toda a musculatura de uma única pata de camundongos tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β -AR não seletivo isoproterenol (10 mg/kg) por 30 minutos, ou tratados com ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da administração do agonista isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo *vs. Controle.....

96

FIGURA 21 Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da realização de uma sessão de exercício aeróbico e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Respiração mitocondrial no basal (A); respiração máxima na presença de ADP (B); respiração independente da produção de ATP (na presença de oligomicina) (C); e respiração máxima na presença do desacoplador FCCP (D) nas fibras musculares esqueléticas extraídas do tibial anterior de camundongos não exercitados (Controle) e de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle e # vs. ISO.....

101

FIGURA 22	<p>Morfologia mitocondrial do músculo tibial anterior: efeito de uma sessão de exercício aeróbico e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Número de mitocôndrias por área total (A); área das mitocôndrias (B); perímetro mitocondrial (C); alongamento mitocondrial (D); e circularidade mitocondrial (E) do músculo tibial anterior de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle, # vs. ISO e \$ vs. ICI.....</p>	106
FIGURA 23	<p>Imagens representativas da morfologia mitocondrial no músculo tibial anterior após uma sessão de exercício aeróbico e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Imagens representativas da morfologia mitocondrial analisada por microscopia eletrônica no músculo tibial anterior de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício.....</p>	107
FIGURA 24	<p>Morfologia mitocondrial do músculo sóleo: efeito de uma sessão de exercício aeróbico em camundongos. Número de mitocôndrias por área total (A); área das mitocôndrias (B); perímetro mitocondrial (C); alongamento mitocondrial (D); e circularidade mitocondrial (E) do músculo tibial anterior de camundongos tratados com salina, de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes.....</p>	110

FIGURA 25	Imagens representativas da morfologia mitocondrial muscular no músculo sóleo após uma sessão de exercício aeróbico e do pré-tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Imagens representativas da morfologia mitocondrial analisada por microscopia eletrônica no músculo sóleo de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício.....	111
FIGURA 26	Expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética de camundongos exercitados sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551. Expressão de Mfn1 (A), Mfn2 (B), OPA1 (C) e Fis1 (D) no lisado total do músculo tibial anterior; e expressão de DRP1 (E) na fração mitocondrial extraída de toda a musculatura de uma única pata de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle e \$ vs. ICI.....	113

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1	
Desenho experimental do subprojeto 1: ensaios realizados com mioblastos e miotúbulos diferenciados de células C2C12.....	48
QUADRO 2	
Desenho experimental do subprojeto 1: ensaios realizados em camundongos tratados com agonistas β -AR.....	50
QUADRO 3	
Desenho experimental do subprojeto 2: ensaios realizados em camundongos exercitados sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR.	51

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC	Adenilato ciclase
ADP	Difosfato de adenosina
AKAPs	<i>A kinase anchoring proteins</i>
Akt	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íon Ca ²⁺
Cit c	Citocromo c
CREB	Elemento responsivo ao AMPc
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRP1	<i>Dynamin-related protein 1</i>
e-	Elétrons
EFA	Exercício físico aeróbico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina-adenina dinucleotídeo reduzida
Fis1	<i>Fission 1 homologue protein</i>
FKBP12	<i>FK-506 binding proteins</i>
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GRKs	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
GTPases	Enzimas que hidrolisam o guanosina trifosfato
Gα _i	Proteína G alpha inibitória

Gα _s	Proteína G alpha estimulatória
G _{βγ}	Proteína G, subunidade βγ
H ⁺	Íons hidrogênio
IF1	<i>ATPase Inhibitory Factor 1</i>
Mfn1	Mitofusina 1
MHC	Miosina de cadeia pesada
Mfn2	Mitofusina 2
NAPDH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NRF-1	Fator respiratório nuclear 1
NRF-2	Fator respiratório nuclear 2
OPA1	<i>Optical atrophy 1</i>
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PKA	Proteína quinase A
Q	Coenzima Q
RyR	Receptor de rianodina
Tfam	Fator de transcrição mitocondrial A
VO ₂ máx	Consumo máximo de oxigênio
β	Beta
β-AR	β-adrenérgicos

Unidades

μg	Micrograma
μL	Microlitro

μm	Micrômetro
μM	Micromolar
cm	Centímetro
g	Gramma
L	Litro
m	Metro
M	Molar
mg	Miligramma
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ms	Milissegundo
nM	Nanomolar
pmol	Picomol
s	Segundo

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1 Exercício físico aeróbico: dinâmica e função mitocondriais.....	33
2.2 Receptores β -adrenérgicos e músculo esquelético.....	38
2.3 Receptores β -adrenérgicos, metabolismo aeróbio e mitocôndria.....	41
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo geral.....	46
3.2 Objetivos específicos.....	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1 Desenho experimental.....	47
4.2 Amostra.....	51
4.3 Tratamento com agonistas β -AR.....	52
4.4 Tratamento com o antagonista β_2 -AR ICI 118,551.....	53
4.5 Tratamento com o antagonista β_1 -AR CGP 20712 A.....	54
4.6 Tratamento com PKI (5-24), inibidor de PKA.....	55
4.7 Tratamento com PTX, inibidor de proteína $G\alpha_i$	55
4.8 Tratamento com FK506, inibidor de calcineurina.....	55
4.9 Teste incremental máximo em esteira rolante.....	55

4.10	Protocolo de exercício físico aeróbico.....	56
4.11	Função mitocondrial em mioblastos de C2C12.....	57
4.12	Função mitocondrial em miotúbulos de C2C12.....	58
4.13	Função mitocondrial em fibras musculares isoladas.....	58
4.14	Produção de ATP nos miotúbulos de C2C12.....	59
4.15	Morfologia mitocondrial.....	59
4.16	Isolamento da fração mitocondrial a partir de músculo esquelético e células.....	60
4.17	Expressão proteica.....	62
4.18	Análise estatística.....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1	Subprojeto 1.....	63
5.1.1	Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em mioblastos de células C2C12: efeito do agonista β_2 -AR seletivo formoterol.....	63
5.1.2	Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em mioblastos de células C2C12: efeito do agonista β -AR não seletivo isoproterenol...	66
5.1.3	Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em miotúbulos de células C2C12: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR e β_1 -AR.....	71
5.1.4	Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em miotúbulos de células C2C12: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio das proteínas $G\alpha_i$, PKA e calcineurina.....	75
5.1.5	Papel da ativação β -AR sobre a expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial em miotúbulos de células C2C12: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551.....	81

5.1.6	Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em fibras musculares isoladas de camundongos: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR.....	85
5.1.7	Papel da ativação β -AR sobre a dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551 sobre a morfologia mitocondrial e sobre a expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial em camundongos.....	91
5.2	Subprojeto 2.....	99
5.2.1	Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em fibras musculares isoladas de camundongos: efeito de uma sessão de exercício aeróbico associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551.....	99
5.2.2	Papel da ativação β -AR sobre a dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética: efeito de uma sessão de exercício aeróbico associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551 sobre a morfologia mitocondrial e sobre a expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial em camundongos.....	103
6	CONCLUSÃO.....	116
7	PERSPECTIVAS.....	116
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
	ANEXOS.....	128

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos benéficos do exercício físico aeróbico (EFA) frente à prevenção e ao tratamento de doenças ocorrem por meio de adaptações agudas e crônicas em diversos sistemas orgânicos, promovendo uma resistência à quebra da homeostasia por perturbações metabólicas. O aumento da capacidade oxidativa induzido pelo EFA é considerado o principal fator dos seus benefícios à saúde. Dentre os diversos órgãos e sistemas envolvidos na realização dos exercícios físicos, a musculatura esquelética é um dos tecidos com maior capacidade de adaptação metabólica e estrutural frente ao estímulo mecânico. Considerando que a musculatura esquelética é rica em mitocôndrias e altamente dependente da fosforilação oxidativa para a produção energia, não surpreende o fato de que o aumento da capacidade aeróbica induzido pelo EFA ocorra principalmente em função das adaptações mitocondriais (EGAN e ZIERATH, 2013).

Uma das adaptações mitocondriais mais marcantes promovidas pelo EFA é o aumento da biogênese mitocondrial (1967; HOOD, 2009). Embora a formação de novas mitocôndrias seja fundamental, a manutenção de mitocôndrias saudáveis por meio de mecanismos de controle de qualidade parece ser de igual ou maior importância para uma adaptação mitocondrial adequada. Esse controle de qualidade ocorre principalmente pelos mecanismos de fissão, fusão e remoção de mitocôndrias danificadas/envelhecidas via autofagia mitocondrial (mitofagia) (YOULE e VAN DER BLIEK, 2012). Nesse sentido, existem evidências de que o EFA regule tanto a fusão como a fissão de mitocôndrias (CARTONI et al., 2005; GARNIER et al., 2005; DING et al., 2010).

Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos nessas importantes adaptações mitocondriais induzidas pelo EFA estão longe de ser completamente compreendidos. Um dos mecanismos pelos quais tais adaptações e respostas mitocondriais podem ocorrer é a ativação simpática mediada pelos receptores β -adrenérgicos (β -AR) na musculatura esquelética. Esses receptores estão presentes nas membranas das células musculares (WILLIAMS e BARNES, 1989; PETERS et al., 1998) e, aproximadamente 90% deles são do subtipo β_2 (ELFELLAH et al., 1989). É bem conhecido na literatura que a ativação dos receptores β_2 -AR no músculo esquelético promove a ativação de vias de síntese e inibição de vias de

degradação proteica, levando ao aumento da massa muscular esquelética (YANG e MCELLIGOTT, 1989). No entanto, embora dicotômico, seu papel na regulação da biogênese mitocondrial e no metabolismo aeróbio tem sido evidenciado em estudos mais recentes (ROBINSON et al., 2011; WILLS et al., 2012; HUANG et al., 2013). Alguns desses estudos mostram que a ativação β -AR aumenta a expressão de marcadores de biogênese mitocondrial no coração e na musculatura esquelética (MIURA et al., 2008; WILLS et al., 2012) e sugerem também que a biogênese mitocondrial induzida pelo EFA seria parcialmente mediada pela sinalização β_2 -AR (MIURA et al., 2007). Além disso, a sinalização β_2 -AR parece modular o fluxo autofágico (JOASSARD et al., 2013; FARAH et al., 2014; WAUSON et al., 2014) e a expressão de proteínas envolvidas no processo de fissão e fusão mitocondrial na musculatura esquelética e em outros tecidos (SORIANO et al., 2006; DAGDA et al., 2011; VALSECCHI et al., 2013).

Partindo do pressuposto que as respostas agudas ao EFA podem determinar as adaptações ao treinamento físico aeróbico e que a ativação simpática aumenta durante a realização de uma sessão de exercício, levanta-se a hipótese de que a via de sinalização β_2 -AR poderá contribuir para as respostas mitocondriais agudas induzidas pelo EFA na musculatura esquelética. Assim, o presente projeto de pesquisa teve como objetivo caracterizar a contribuição da via de sinalização β_2 -AR para as respostas de função e dinâmica mitocondriais após uma única sessão de EFA.

A descoberta de novos mecanismos relacionados ao aumento da capacidade oxidativa induzida pelo EFA pode auxiliar no desenvolvimento de intervenções farmacológicas ou de terapia gênica, com o intuito de mimetizar e/ou maximizar alguns dos efeitos benéficos do EFA. Vale destacar também que o melhor entendimento sobre o papel dos receptores β_2 -AR na musculatura esquelética pode, futuramente, auxiliar e otimizar o tratamento de doenças e síndromes que acometem este tecido e que possuem em suas terapias o uso de betabloqueadores, como por exemplo, a hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Exercício físico aeróbico: dinâmica e função mitocondriais

Já está estabelecido na literatura que as adaptações agudas e crônicas ao EFA apresentam inúmeros efeitos benéficos na melhora do desempenho físico, bem como na prevenção e tratamento de diversas doenças crônico degenerativas. Tais adaptações ocorrem, em curto prazo, para suprir a demanda energética gerada pelo aumento do trabalho do músculo esquelético, ao passo que, cronicamente, reduzem o distúrbio homeostático causado pelas sessões agudas de exercício físico. Assim, o organismo se torna mais resistente à quebra da homeostasia induzida por perturbações metabólicas, reduzindo o estabelecimento da fadiga e a instalação de diversas doenças (EGAN e ZIERATH, 2013).

Nesse contexto, a musculatura esquelética é um dos principais tecidos envolvidos na realização de exercícios físicos, com capacidade notável de adaptação metabólica e estrutural frente aos estímulos mecânico e hormonal, sendo essa adaptação coordenada por um conjunto de moléculas regulatórias e vias de sinalização celular. Em longo prazo, há um acúmulo das respostas agudas de cada sessão de exercício físico que acabam por caracterizar a adaptação do músculo esquelético ao treinamento físico aeróbico. Cabe ressaltar que as variáveis intensidade, duração e frequência do exercício físico realizado nas sessões de treino são determinantes para as diversas respostas moleculares e funcionais relatadas na literatura (EGAN e ZIERATH, 2013).

Considerando que a musculatura esquelética é rica em mitocôndrias e sua produção de energia é altamente dependente da fosforilação oxidativa, não surpreende o fato de que as adaptações mitocondriais induzidas pelo exercício físico agudo contribuam significativamente para o aumento da capacidade aeróbica observada após a realização de protocolos de treinamento físico aeróbico (EGAN e ZIERATH, 2013).

As mitocôndrias são organelas celulares especializadas na metabolização de ácidos graxos e glicose para síntese de ATP via beta-oxidação, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (FIGURA 1). Por derivarem de alfa-proteobactérias incorporadas por células eucarióticas primitivas em uma relação de endossimbiose,

as mitocôndrias possuem seu próprio genoma circular (DNA mitocondrial, mtDNA), que é responsável pela codificação de 13 importantes proteínas da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, enquanto que as demais proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear (nDNA) (ANDREUX, HOUTKOOPER e AUWERX, 2013). Assim, grande parte das adaptações mitocondriais resulta da expressão de genes localizados tanto no núcleo quanto nas mitocôndrias, o que torna a compreensão de seus mecanismos mais desafiadora.

FIGURA 1. Esquema ilustrativo da organização e funcionamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Complexos I, II, III, IV (citocromo c oxidase) e V (ATP sintase); e^- (elétrons); H^+ (íons hidrogênio); NADH (nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida); $FADH_2$ (flavina-adenina dinucleotídeo reduzida); Q (coenzima Q); Cit c (citocromo c). Adaptado de TAHARA, NAVARETE e KOWALTOWSKI (2009).

Um trabalho clássico de HOLLOSZY (1967) foi o primeiro a demonstrar que seis semanas de treinamento físico aeróbico eram capazes de aumentar o conteúdo mitocondrial muscular e sua capacidade oxidativa em ratos. Apesar deste estudo pioneiro ter sido realizado na década de 60, os mecanismos moleculares que coordenam essa resposta começaram a ser elucidados no início da década passada.

O desafio inicial desses estudos foi tentar entender como o exercício físico era capaz de modular a transcrição de genes mitocondriais codificados tanto no

genoma mitocondrial, como no nuclear, e assim expressar proteínas envolvidas no aumento da biogênese mitocondrial, processo esse caracterizado pelo aumento da densidade, volume e número de mitocôndrias. Inicialmente, foram identificados os fatores respiratórios nuclear 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2), que são fatores de transcrição responsáveis pela expressão de genes nucleares que codificam diversas proteínas da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (NRF-1 e NRF-2) (EVANS e SCARPULLA, 1990; VIRBASISUS, VIRBASISUS e SCARPULLA, 1993). Em seguida, foi descoberto o *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha* (PGC-1 α), que é um importante cofator de transcrição que regula a atividade de diversos fatores de transcrição nuclear como NRF-1 e NRF-2, e também do fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), responsável pela transcrição e a replicação do mtDNA (PUIGSERVER et al., 1998; SCARPULLA, 2002). A partir destes achados, diversos estudos demonstraram que uma única sessão de EFA é capaz de aumentar rapidamente a atividade e a expressão de PGC-1 α (BAAR et al., 2002; PILEGAARD, SALTIN e NEUFER, 2003), demonstrando que esse cofator possui um papel fundamental na ativação dos genes nucleares e mitocondriais necessários para a biogênese mitocondrial induzida por EFA (ARANY, 2008).

Embora a biogênese mitocondrial seja um processo fundamental, a manutenção de mitocôndrias saudáveis por meio de mecanismos de controle de qualidade parece ser de igual ou maior importância para uma adaptação mitocondrial adequada. Esse controle de qualidade ocorre principalmente pelos mecanismos de fissão, fusão e remoção de mitocôndrias danificadas/envelhecidas via autofagia mitocondrial (mitofagia) (YOULE e VAN DER BLIEK, 2012). A fusão mitocondrial é um processo caracterizado pela união das membranas externas e internas de duas ou mais mitocôndrias, regulada pela ação de duas classes de GTPases: mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2) e *optical atrophy 1* (OPA1). Já a fissão mitocondrial dá origem a duas novas organelas e facilita o transporte da organela dentro da célula, permitindo um rápido tráfego mitocondrial para regiões com maior demanda energética, ou o direcionamento para a degradação lisossomal (PALANIYANDI et al., 2010). As proteínas que participam do processo de fissão mitocondrial são: *dynamin-related protein 1* (DRP1) e *fission 1 homologue protein* (Fis1) (FIGURA 2). Assim, os processos de fusão e fissão permitem a manutenção

de uma rede interconectada de mitocôndrias íntegras e funcionais por meio do compartilhamento de proteínas, substratos e mtDNA, e da segregação de regiões danificadas e disfuncionais (LIESA, PALACIN e ZORZANO, 2009; YOULE e VAN DER BLIEK, 2012).

FIGURA 2. Esquema ilustrativo do balanço entre os processos de fusão e fissão mitocondrial, e as proteínas envolvidas nesses processos. DRP1 (*dynamamin-related protein 1*); Fis1 (*fission 1 homologue protein*); Mfn1 (mitofusina 1); Mfn2 (mitofusina 2) e OPA1 (*optical atrophy 1*). Adaptado de LIESA, PALACIN e ZORZANO (2009).

Alguns estudos demonstram que o exercício físico é capaz de modular tanto a fissão como a fusão mitocondrial na musculatura esquelética (CARTONI et al., 2005; GARNIER et al., 2005; DING et al., 2010). De fato, GARNIER et al. (2005) observaram uma correlação positiva dos níveis de mRNA de Mfn2 e DRP1 com a respiração mitocondrial máxima, além de demonstrar que essa resposta é dependente da capacidade física do indivíduo. Esse estudo sugeriu, pela primeira vez, que a dinâmica mitocondrial estaria associada ao aumento da capacidade oxidativa induzido pelo exercício físico. Em outro estudo, DING et al. (2010) submeteram ratos a uma única sessão de EFA e avaliaram parâmetros de fusão,

fissão e função mitocondrial na musculatura esquelética durante e após uma sessão de exercício físico. Os autores observaram redução da expressão proteica de Mfn1 e aumento de Fis1 durante a realização do EFA, sendo a magnitude dessa resposta dependente da duração do EFA. A expressão proteica de Mfn1 se manteve reduzida, ao passo que a expressão de Fis1 se manteve aumentada mesmo após 24h de recuperação da sessão de EFA, apesar dos níveis de mRNA de Mfn1 e Mfn2 estarem elevados nesse mesmo momento, o que sugere uma resposta compensatória. Esse aumento compensatório da expressão gênica de mitofusinas após EFA observado em ratos também foi observado em humanos por CARTONI et al. (2005), que sugeriram um importante papel da fusão mitocondrial na adaptação metabólica ao exercício físico, podendo auxiliar na redução da resistência à insulina.

Assim como na dinâmica mitocondrial, o EFA também parece ser capaz de modular o consumo de oxigênio pela mitocôndria, indicador direto da função mitocondrial, embora ainda não haja um consenso na literatura a respeito do real efeito do EFA agudo sobre a musculatura esquelética (MADSEN et al., 1996; TONKONOGI, HARRIS e SAHLIN, 1998; TONKONOGI et al., 1999; FERNSTROM, TONKONOGI e SAHLIN, 2004; JIANG et al., 2009). MADSEN et al. (1996) demonstraram que uma única sessão de EFA em cicloergômetro a 75% VO_{2max} até a exaustão foi capaz de aumentar o consumo máximo de oxigênio e o controle respiratório em mitocôndrias isoladas de biópsias realizadas no músculo vasto lateral de homens adultos (MADSEN et al., 1996). Da mesma forma, TONKONOGI et al. (1999) demonstraram, em fibras isoladas a partir de biópsias de vasto lateral de humanos, que a respiração mitocondrial máxima aumenta significativamente após a realização de uma sessão de exercício físico intervalado de alta intensidade (130% VO_{2max}) em cicloergômetro até a exaustão (TONKONOGI et al., 1999). Por outro lado, em um protocolo de exercício físico realizado a 70% do VO_{2max} por 75 minutos em cicloergômetro, a respiração máxima não foi alterada na fração mitocondrial extraída de biópsia do músculo quadríceps imediatamente após a sessão de exercício (FERNSTROM, TONKONOGI e SAHLIN, 2004). Da mesma forma, JIANG et al. (2009) observaram que o consumo máximo de oxigênio não foi alterado na fração mitocondrial do músculo gastrocnêmio de ratos após 45, 90, 120

ou 150 minutos de exercício aeróbico realizado em esteira rolante (JIANG et al., 2009).

Portanto, a partir do exposto acima, ainda não estão claros os efeitos agudos do EFA sobre a dinâmica e a função mitocondriais na musculatura esquelética, assim como os mecanismos celulares pelos quais este estímulo fisiológico pode modular tais respostas.

Nesse sentido, estudos têm demonstrado que a ativação dos receptores β -AR pode modular proteínas relacionadas à dinâmica, função e biogênese mitocondriais na musculatura esquelética e em outros tecidos do organismo (SORIANO et al., 2006; DAGDA et al., 2011; DE RASMO et al., 2011; JOASSARD et al., 2013; VALSECCHI et al., 2013), indicando que a ativação simpática mediada pelos receptores β_2 -AR na musculatura esquelética durante o EFA pode ser um dos mecanismos pelos quais as adaptações mitocondriais acontecem.

2.2. Receptores β -adrenérgicos e músculo esquelético

Os receptores β -AR, assim como outros receptores adrenérgicos, pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR – “*Guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor*”), o maior grupo de receptores de membrana em mamíferos, e que corresponde a mais de 1% do genoma humano (FREDRIKSSON et al., 2003). Existem diversos subtipos de receptores adrenérgicos conhecidos, incluindo seis do subtipo α e três do subtipo β , que estão localizados em diferentes proporções em inúmeros tecidos do corpo. Os subtipos de receptores β -AR são β_1 , β_2 e β_3 e estão localizados em diversos tecidos no organismo, como coração, vasos, pulmão, rins, tecido adiposo e musculatura esquelética (AHLQUIST, 1948; JOHNSON, 1998; LYNCH e RYALL, 2008).

Na musculatura esquelética, a atividade nervosa simpática é mediada pelos receptores β -AR presentes na membrana das células musculares (WILLIAMS e BARNES, 1989; PETERS et al., 1998), e cerca de 90% desses β -AR são do subtipo β_2 (ELFELLAH et al., 1989). Além do subtipo β_2 , é encontrado na musculatura esquelética um percentual aproximado de 7-10% de receptores adrenérgicos do subtipo β_1 (WILLIAMS, CARON e DANIEL, 1984; KIM et al., 1991). Existem diferenças quanto à densidade de receptores β -AR nos diferentes tipos de fibras

musculares, cujas fibras do tipo I apresentam densidade duas a três vezes maior de receptores β -AR do que as fibras do tipo II (MARTIN, MURPHREE e SAFFITZ, 1989; KIM et al., 1991; JENSEN, BRORS e DAHL, 1995), corroborando a maior densidade de receptores β_1 e β_2 -ARs em músculos oxidativos em comparação a músculos glicolíticos (ELFELLAH et al., 1989; MARTIN, MURPHREE e SAFFITZ, 1989; RYALL et al., 2002; RYALL et al., 2004). De fato, JENSEN et al. (2002) observaram que o músculo sóleo de ratos (músculo postural, predominantemente aeróbio e composto principalmente por fibras do tipo I) apresentava uma densidade de receptores β -AR muito próxima da alta densidade encontrada no coração (ventrículo esquerdo); o oposto foi observado nos músculos de contração rápida. Além disso, no músculo sóleo observa-se um maior percentual de receptores β -AR do subtipo β_1 do que no músculo plantar (músculo de contração rápida, predominantemente anaeróbio e com alta porcentagem de fibras do tipo II) (KIM et al., 1992).

Essas diferenças se mostram importantes quando se relaciona a reação de “luta ou fuga” com os diferentes tipos de fibras, pois as fibras do tipo II são recrutadas em altas intensidades onde a concentração das catecolaminas é elevada e a resistência ao agonista é grande, devido principalmente à baixa densidade de receptores presentes nestas fibras. Já as fibras do tipo I apresentam um limiar de excitabilidade baixo, portanto, são recrutadas em intensidades menores com baixa concentração de catecolaminas. Além disso, a ação antiproteolítica e anabólica da atividade simpática é essencial para a manutenção da função e estrutura de músculos oxidativos posturais, compostos principalmente por fibras do tipo I. Isso pode explicar, em parte, a alta densidade de receptores β -AR presentes neste tipo de fibra (NAVEGANTES et al., 2004). No entanto, o significado funcional desta diferença de densidade ainda não é completamente conhecido, uma vez que a resposta a agonistas β -AR parece ser maior em músculos glicolíticos (RYALL et al., 2002; RYALL, SILLANCE e LYNCH, 2006).

A ativação desses receptores β -AR na musculatura esquelética ocorre por meio da ação das catecolaminas plasmáticas adrenalina e noradrenalina (NAVEGANTES, MIGLIORINI e DO CARMO KETTELHUT, 2002). Alguns estudos também sugerem que a ativação dos receptores β_2 -ARs acontece por meio da inervação simpática em fibras musculares estriadas de mamíferos (NAVEGANTES

et al., 1999; NAVEGANTES, BAVIERA e KETTELHUT, 2009). A via de sinalização clássica envolve a ativação da adenilato ciclase (AC) via proteína G estimulatória ($G\alpha_s$), resultando em aumento das concentrações intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). O aumento da concentração de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), a qual é responsável pela fosforilação de inúmeras proteínas intracelulares. Além desta via clássica de sinalização onde o receptor acopla-se à proteína $G\alpha_s$, tem sido demonstrado que o subtipo β_2 -AR pode agir por uma via alternativa, denominada não-clássica, pelo seu acoplamento com a proteína G inibitória ($G\alpha_i$).

No entanto, o papel fisiológico dessa ativação simpática na musculatura esquelética ainda não está totalmente esclarecido. Dentre os efeitos de sua estimulação crônica são observados hipertrofia muscular e mudança no tipo de fibra (I $\rightarrow$ II) (YANG e MCELLIGOTT, 1989). Além disso, a literatura traz diversos estudos que evidenciam a participação da atividade simpática por meio dos receptores β_2 -AR em efeitos anabólicos e anti-atróficos no músculo esquelético.

Da mesma forma, tem sido demonstrado em diversos modelos animais e em humanos que fármacos agonistas de receptores β_2 -AR atuam na regeneração da musculatura esquelética em modelos de atrofia muscular. Em um modelo de denervação cirúrgica na musculatura esquelética de ratos, foi demonstrado que a utilização de clenbuterol (agonista β -AR de terceira geração, seletivo para receptores β_2 -AR) e isoproterenol (agonista β -AR de primeira geração, não seletivo) durante 30 dias não só preveniu, como reverteu a perda de massa magra dos animais denervados, além de ter aumentado a massa muscular do grupo controle (AGRAWAL, THAKUR e KATOCH, 2003).

Outro trabalho, realizado por HARCOURT et al. (2007) mostrou uma melhora na função muscular esquelética e aumento na área de secção transversa das fibras musculares com a administração de formoterol (agonista β_2 -AR altamente seletivo e de longa duração) por quatro semanas em modelo de distrofia muscular (distrofia mdx) em camundongos. Além disso, o uso por sete dias desta mesma droga, o formoterol, promoveu uma queda na taxa de apoptose de células musculares de camundongos e ratos com câncer (BUSQUETS et al., 2004).

Resultados recentes de nosso laboratório também demonstraram existir uma relação entre os receptores β_2 -AR e a musculatura esquelética na insuficiência cardíaca. A inativação gênica dos receptores β_2 -AR em camundongos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio agrava e/ou antecipa as alterações musculoesqueléticas, principalmente a atrofia muscular, demonstrando que esses receptores possuem importante papel na manutenção da massa muscular esquelética na insuficiência cardíaca por serem capazes de modular vias catabólicas e anabólicas (VOLTARELLI et al., 2014).

No entanto, embora dicotômica, a ativação aguda dos receptores β_2 -AR também é apontada como reguladora do metabolismo aeróbio, melhorando a função e aumentando a biogênese mitocondrial na musculatura esquelética e em outros tecidos do organismo (SORIANO et al., 2006; MIURA et al., 2007; MIURA et al., 2008; DAGDA et al., 2011; DE RASMO et al., 2011; HUANG et al., 2013; JOASSARD et al., 2013; VALSECCHI et al., 2013). A relação entre receptores β_2 -AR, metabolismo aeróbio e mitocôndria será melhor detalhada no tópico a seguir.

2.3. Receptores β -adrenérgicos, metabolismo aeróbio e mitocôndria

Na década de 60, o interesse em estudar os efeitos do bloqueio dos receptores β -AR sobre os parâmetros hemodinâmicos durante o EFA se tornou crescente após a descoberta dos β -bloqueadores em 1962 (EPSTEIN et al., 1965; CUMMING e CARR, 1966; LIXI et al., 1966). Evidentemente, a atenção dos pesquisadores se voltou principalmente para os efeitos destes fármacos sobre o coração e o sistema circulatório, uma vez que eles despontavam como estratégias promissoras para o tratamento de doenças cardíacas.

No entanto, na década de 70, os estudos sobre os efeitos dos betabloqueadores no metabolismo e na musculatura esquelética começaram a surgir. Em 1977, HARRI (1977) estudou o efeito do bloqueio prolongado dos receptores β -AR com alprenolol (betabloqueador não seletivo) sobre parâmetros metabólicos da musculatura esquelética. Neste estudo, ele reportou que 4 semanas de administração do betabloqueador em ratos foi capaz de diminuir a atividade de enzimas oxidativas na musculatura esquelética e de diminuir a tolerância dos animais à realização de uma sessão de EFA. O mesmo pesquisador, em 1980,

demonstrou que a realização de 7 semanas de treinamento físico aeróbico combinadas com o tratamento de propranolol (antagonista β -AR não seletivo) atenuou o aumento da atividade de enzimas oxidativas no músculo esquelético de ratos (HARRI, 1980).

Outros estudos, realizados em animais e humanos, também demonstraram um efeito inibitório do bloqueio β -AR sobre as respostas e adaptações metabólicas da musculatura esquelética após a realização de uma sessão de exercício ou após um período de treinamento físico (BARENTHIN e SMEDBY, 1979; KAISER, ROSSNER e KARLSSON, 1981; JUHLIN-DANNFELT, 1982; SABLE et al., 1982; SVEDENHAG, HENRIKSSON e JUHLIN-DANNFELT, 1984).

Embora a inibição da ativação β -AR tenha sido realizada, em muitos trabalhos acima citados, com betabloqueadores não seletivos, JI et al. (1986) demonstraram que o subtipo β_2 é o subtipo de receptor β -AR que mais contribui para a diminuição nas adaptações oxidativas em reposta ao treinamento físico aeróbico. Os pesquisadores treinaram ratos por 10 semanas em esteira rolante, e administraram aos animais os betabloqueadores propranolol e atenolol (betabloqueador seletivo para receptores β_1 -ARs). Eles observaram que o aumento da atividade de citrato sintase, enzima chave do ciclo de Krebs, induzido pelo treinamento físico não ocorreu no grupo de animais que treinaram e receberam propranolol. Em contrapartida, os ratos treinados que receberam atenolol, ou seja, que não tiveram os seus receptores β_2 -AR bloqueados, apresentaram aumento da atividade da citrato sintase. Da mesma forma, KAISER, ROSSNER e KARLSSON (1981) demonstraram que a administração de propranolol induziu um menor desempenho de homens fisicamente ativos em testes de potência e força muscular e em testes de capacidade aeróbia, enquanto que a administração de atenolol também diminuiu o desempenho nos testes físicos, mas em menores proporções. Tais resultados são coerentes se considerarmos que a musculatura esquelética é composta principalmente por receptores β -AR do subtipo β_2 . Além disso, eles mostram que o bloqueio simpático promove efeitos diretos sobre a musculatura esquelética, e que não são totalmente dependentes dos efeitos hemodinâmicos do bloqueio dos receptores β_1 -AR no coração.

Após duas décadas sendo pouco explorado, o papel dos receptores β_2 -AR nas respostas ao EFA na musculatura esquelética voltou a ser mais investigado recentemente, e a PGC-1 α tem ganhado destaque como mediador desta resposta (MIURA et al., 2007; MIURA et al., 2008; ROBINSON et al., 2011; TADAISHI et al., 2011). MIURA et al. (2007) demonstraram que o aumento da expressão de PGC-1 α na musculatura de camundongos após uma única sessão de EFA é atenuado com a administração de propranolol uma hora antes da sessão. Da mesma maneira, eles observaram que os camundongos que não expressam os três subtipos de receptor β -AR (β_1 , β_2 e β_3) apresentam um menor aumento da expressão de PGC-1 α na musculatura esquelética após uma sessão de EFA. Em concordância com estes resultados, outro estudo realizado por ROBINSON et al. (2011) demonstrou, em humanos, que o uso de propranolol diminuiu a taxa de síntese proteica mitocondrial na musculatura esquelética após uma sessão de EFA.

No entanto, contrariando os dados acima, em um estudo recente, FENG et al. (2013) demonstraram que o tratamento com propranolol não impediu o aumento da expressão de PGC-1 α e de citocromo c oxidase 4 (COXIV) e da fosforilação do elemento responsivo ao AMPc (CREB, *cAMP response element-binding protein*), apontado como mediador da ativação β_2 -AR e PGC-1 α , na musculatura esquelética de ratos após 8 semanas de treinamento físico aeróbico. No entanto, este trabalho não avaliou se a dose de propranolol utilizada foi capaz de diminuir a sinalização β -AR na musculatura esquelética.

Portanto, embora haja trabalhos demonstrando a contribuição dos receptores β -AR, e do subtipo β_2 -AR, nas respostas metabólicas e mitocondriais ao EFA e ao treinamento físico aeróbico, ainda não está claro como a ativação destes receptores pode influenciar, não só a biogênese, mas também a função e dinâmica mitocondriais, e quais são as vias celulares responsáveis por estas respostas na musculatura esquelética.

Sem abordar a questão do EFA, estudos recentes também têm avaliado o papel da ativação β_2 -AR, por meio de agonistas, na biogênese mitocondrial via PGC-1 α na musculatura esquelética (MIURA et al., 2007; KOOPMAN et al., 2010; SULLO et al., 2013). KOOPMAN et al. (2010) demonstraram aumento na expressão gênica de PGC-1 α no músculo tibial anterior de camundongos 24 horas após a

administração uma única dose de formoterol (100 µg/kg). Após 7 dias de tratamento com o mesmo agonista β_2 -AR, eles observaram um aumento na taxa de síntese proteica mitocondrial na musculatura esquelética desses animais (KOOPMAN et al., 2010). O estudo de Miura et al., 2007 também demonstrou que a expressão gênica de PGC-1 α aumenta significativamente no músculo gastrocnêmio de camundongos 4 horas após doses únicas de clenbuterol (0,1, 1 e 5 mg/kg), e que tal resposta não ocorre com a administração de agonistas α -, β_1 -, e β_3 -AR.

Embora os trabalhos que investiguem a relação entre ativação β_2 -AR e biogênese mitocondrial na musculatura esquelética ainda sejam escassos, outros estudos na literatura também têm investigado tal relação em tecidos e órgãos diferentes, como o músculo cardíaco, rins e tecido adiposo (WILLS et al., 2012; HUANG et al., 2013; JESINKEY et al., 2014), e dão suporte aos dados encontrados na musculatura esquelética.

Entretanto, como apontado anteriormente, ainda que a biogênese mitocondrial seja importante, a qualidade funcional das mitocôndrias também depende da dinâmica mitocondrial (YAN, LIRA e GREENE, 2012). Dessa maneira, alguns estudos vão além da biogênese mitocondrial e têm demonstrado que a sinalização β -AR pode regular a dinâmica e a função mitocondriais (SORIANO et al., 2006; DAGDA et al., 2011; DE RASMO et al., 2011; JOASSARD et al., 2013; VALSECCHI et al., 2013). DAGDA et al. (2011) demonstraram, em um modelo de Parkinson em células neurais, que o estímulo de PKA e AMPc (principais sinalizadores intracelulares da ativação β -AR) é capaz de reverter e melhorar a interconectividade e função mitocondriais que estavam prejudicadas pela doença. Ainda neste estudo, os autores demonstraram que, por meio da ativação de PKA e AMPc, é possível diminuir a fissão mitocondrial (via inibição de DRP1) e o processo autofágico exacerbados no modelo de Parkinson.

No mesmo sentido, De Rasmussen et al., 2011 demonstraram que fibroblastos e mioblastos cardíacos incubados com isoproterenol por 35 minutos apresentaram aumento nos níveis de AMPc, diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumento da atividade do complexo I mitocondrial, sugerindo que a ativação β -AR nestas células promove um melhor funcionamento da cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, uma melhora na função mitocondrial

(DE RASMO et al., 2011). De fato, alguns estudos tem demonstrado que os sinalizadores da ativação β -AR, como AMPc e PKA, são capazes de ativar complexos mitocondriais (principalmente os complexos I e IV), melhorando sua função, e de fosforilar a proteína DRP1, inibindo sua atividade de fissão mitocondrial (DAGDA et al., 2011; DE RASMO et al., 2011; VALSECCHI et al., 2013). O papel dos receptores β -AR sobre as proteínas relacionadas à fusão mitocondrial é ainda menos conhecido. Nesse sentido, SORIANO et al. (2006) sugerem que a ativação simpática, por meio dos receptores β -AR, possa aumentar a expressão de Mnf2 via PGC-1 α na musculatura esquelética. A FIGURA 3 ilustra as principais vias de sinalização ativadas pelos receptores β_2 -AR discutidas até aqui.

Contudo, poucos são os estudos que investigaram a contribuição da via de sinalização β -AR na biogênese e, principalmente, na função e dinâmica mitocondriais em diversos tecidos do organismo e na musculatura esquelética. Além disso, ainda não existem trabalhos na literatura que avaliaram o papel dos receptores β_2 -AR na função e dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética, e sua relação com as adaptações mitocondriais em resposta ao EFA. Novos estudos devem elucidar tal questão e esclarecer se a via de sinalização β_2 -AR participa de adaptações mitocondriais que ocorrem na musculatura esquelética em condições fisiológicas, como o exercício físico.

FIGURA 3. Principais vias de sinalização celular desencadeadas pela ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos. AC (adenilato ciclase); $G\alpha_s$ (proteína G estimulatória); $G\alpha_i$ (proteína G inibitória); $G_{\beta\gamma}$ (proteína G, subunidade $\beta\gamma$); AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico); PKA (proteína quinase A); Akt (proteína quinase B); RyR (receptor de rianodina); CREB (*cAMP response element-binding protein*); PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*); DRP1 (*dynamain-related protein 1*); Mnf2 (mitofusina 2); CI (complexo I); CII (complexo II); CIII (complexo III); CIV (complexo IV) e CV (complexo V).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a participação dos receptores β_2 -AR na função e dinâmica mitocondriais induzidas por estímulos farmacológico (agonistas β -AR) e fisiológico (exercício físico aeróbico) na musculatura esquelética.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar a participação dos receptores β_2 -AR na função e dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética após a administração aguda de agonistas β -AR.

3.2.2. Avaliar a participação dos receptores β_2 -AR na função e na dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética após uma única sessão de exercício físico aeróbico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho experimental. O presente projeto de pesquisa foi dividido em 2 subprojetos. Os subprojetos 1 e 2 correspondem aos objetivos específicos 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. A seguir está uma breve descrição do desenho experimental de cada subprojeto:

Subprojeto 1: Foi avaliada a participação dos receptores β_2 -AR na função e dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética e em linhagem de célula derivada deste tecido após a administração aguda de agonistas β -AR, caracterizando as principais vias de sinalização que associam respostas mitocondriais à ativação β_2 -AR.

Para isso, em uma primeira etapa deste subprojeto 1, foram utilizados mioblastos e miotúbulos da linhagem de célula muscular esquelética C2C12, como observado no QUADRO 1, a qual ilustra o desenho experimental utilizado nesta etapa. Dessa forma, após 1 dia de proliferação, mioblastos foram submetidos a ensaios de respiração mitocondrial no equipamento Seahorse (Seahorse XF24, Seahorse Bioscience), onde foram tratados, durante a realização do experimento, com 3 diferentes concentrações (100 nM, 1 μ M e 10 μ M) do agonista β_2 -AR seletivo formoterol, e também do agonista β -AR não seletivo isoproterenol.

Após a realização destes ensaios iniciais, os mioblastos foram diferenciados em miotúbulos por 6 dias, sendo que os 3 últimos dias de diferenciação foram realizados com meio de cultura contendo 10 μ M de Ara-C (Cytosine β -D-arabinofuranoside), frequentemente utilizado em cultura de células C2C12 com a finalidade de remover mioblastos remanescentes após a diferenciação dos mesmos em miotúbulos (MENCONI et al., 2008).

Os miotúbulos maduros foram expostos ao tratamento com o agonista β -AR não seletivo isoproterenol (1 μ M por 30 minutos), sob o bloqueio dos receptores β_2 -

AR com ICI 118,551 (300 nM), dos receptores β_1 -AR com CGP 20712A (300 nM), de PKA com o peptídeo PKI (20 μ M), da proteína $G\alpha_i$ com PTX (*pertussis toxin*, 0,75 μ g/ml) e do bloqueio de calcineurina com FK506 (5 μ M) por 1 hora, sendo que os primeiros 30 minutos de tratamento com os bloqueadores antecederam o tratamento com isoproterenol. Ao final do tratamento com isoproterenol, os miotúbulos foram coletados e levados ao oxígrafo Oroboros para a medida da respiração mitocondrial. O isolamento da fração mitocondrial para a análise de expressão proteica (Mfn1, Mfn2, OPA1 e DRP1) e a medida da razão ATP/ADP foram realizados após o tratamento com isoproterenol sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551.

É importante destacar que, no dia anterior aos tratamentos com os agonistas β -AR, os miotúbulos foram expostos a um meio de cultura livre de soro. Essa medida teve como finalidade evitar a dessensibilização dos receptores β -AR, já que o mesmo possui catecolaminas em sua composição e poderia minimizar os efeitos do tratamento com isoproterenol, como já demonstrado na literatura (DIBNER e INSEL, 1981) e segundo dados não publicados do laboratório do Professor Daniel Bernstein da Universidade de Stanford-CA, EUA.

QUADRO 1. Desenho experimental do subprojeto 1: ensaios realizados com mioblastos e miotúbulos diferenciados de células C2C12.

Para a segunda etapa do subprojeto 1 foram utilizados camundongos da linhagem FVB, os quais foram tratados por 30 minutos com o agonista β -AR não seletivo isoproterenol na dose de 10 mg/kg por meio de injeção intraperitoneal, associado ou não ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com o antagonista β_2 -adrenérgico seletivo ICI 118,551 (10 mg/kg) por 1 hora, sendo que os primeiros 30 minutos de tratamento com o antagonista antecederam o tratamento com isoproterenol. Como pode ser observado no QUADRO 2, após este protocolo de tratamento, o músculo tibial anterior foi extraído para a análise da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica para a análise de expressão proteica (Mfn1, Mfn2, OPA1 e Fis1) e para o isolamento das fibras musculares, nas quais foi avaliada a respiração mitocondrial no equipamento Oroboros (OROBOROS O2K Oxygraph, Oroboros Instruments). A fração mitocondrial foi obtida a partir da homogeneização de todos os músculos de uma das patas traseiras do animal, e foi utilizada para avaliar a translocação de DRP1 para a mitocôndria.

Os mesmos animais também foram tratados com 10 μ g/kg do agonista β_2 -AR seletivo formoterol via injeção intraperitoneal por 30 minutos, e a respiração mitocondrial foi avaliada nas fibras isoladas do músculo tibial anterior logo após o tratamento.

QUADRO 2. Desenho experimental do subprojeto 1: ensaios realizados em camundongos tratados com agonistas β -AR.

Subprojeto 2: Foi avaliada a participação dos receptores β_2 -AR na função e dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética após uma única sessão de EFA. Para isso, camundongos da linhagem FVB foram submetidos a uma sessão de EFA (esteira rolante, 60 minutos, 80% da velocidade máxima, 5° de inclinação), tratados com salina ou com o antagonista β_2 -adrenérgico seletivo ICI 118,551 (10 mg/kg) 30 minutos antes da sessão de exercício, via injeção intraperitoneal. Os animais foram sacrificados imediatamente após a sessão de EFA e, como mostra o QUADRO 3, o músculo tibial anterior foi extraído para a análise da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica, para a análise de expressão proteica (Mfn1, Mfn2, OPA1 e Fis1) e para o isolamento das fibras musculares, nas quais foi avaliada a respiração mitocondrial no equipamento Oroboros (OROBOROS O2K Oxygraph, Oroboros Instruments). A fração mitocondrial foi obtida a partir da homogeneização de todos os músculos de uma das patas traseiras do animal, e foi utilizada para avaliar a translocação de DRP1 para a mitocôndria. Neste subprojeto, o músculo sóleo também foi isolado para a análise da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica.

QUADRO 3. Desenho experimental do subprojeto 2: ensaios realizados em camundongos exercitados sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR.

4.2. Amostra

Cultura de células. Mioblastos C2C12 (ATCC) foram propagados em garrafas (Corning, 75 cm²) contendo DMEM (DMEM high glucose, *Dulbecco's-modified Eagle's Medium* – Gibco, Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Life Technologies) e penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich), e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Quando as células alcançaram 90% de confluência, iniciou-se a diferenciação dos mioblastos em miotúbulos trocando-se o meio regular pelo meio contendo 2% de soro equino (HyClone Donor Equine Serum, GE Healthcare), penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich) e 1 µM de insulina (Insulin from bovine pâncreas, Sigma-Aldrich). Após três dias de diferenciação, iniciou-se o tratamento das células com Ara-C (Cytosine β -D-arabinofuranoside - Sigma-Aldrich), um agente antitumoral frequentemente utilizado em cultura de células C2C12 com a finalidade de remover mioblastos remanescentes após a diferenciação dos mesmos em miotúbulos (MENCONI et al., 2008), na concentração de 10 µM, por três dias. O Ara-C foi adicionado ao meio de

diferenciação, o qual foi trocado todos os dias. No sexto dia de diferenciação, o soro foi retirado do meio de cultura dos miotúbulos, e os ensaios foram realizados no dia seguinte. Para remover as células da placa de cultura foi utilizada solução de tripsina-EDTA (Trypsin-EDTA solution 1x, Sigma-Aldrich) por 5 minutos, seguida de centrifugação em meio de cultura por 5 minutos a 1000 rpm.

Modelo animal de experimentação. Foram utilizados camundongos da linhagem FVB, com 3 meses de idade. Todos os animais foram mantidos no biotério da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) com temperatura controlada entre 22 e 25°C, e ciclo claro-escuro invertido (12 horas). Água e comida foram administradas *ad libitum*. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, e os tecidos de interesse foram adequadamente coletados e armazenados conforme as análises às quais foram submetidos. Para os procedimentos experimentais foi utilizado um número amostral de 5 a 8 animais, em média. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da EEFE-USP (CEUA - 2015/06 – Anexo 1). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com princípios internacionais de ética em pesquisa animal.

4.3. Tratamento com agonistas β -AR. Para o tratamento de células, foram utilizadas as concentrações de 100 nM, 1 μ M ou 10 μ M para o agonista β_2 -AR seletivo formoterol (Sigma-Aldrich), e para o agonista β -AR não seletivo isoproterenol (Sigma-Aldrich), a depender do ensaio realizado. As concentrações destes agonistas, quando utilizadas isoladamente, foram escolhidas a partir de titulações realizadas previamente, como pode ser visto no decorrer da descrição e discussão dos resultados. A exposição das células aos agonistas foi realizada por 30 minutos.

Para o tratamento de camundongos, foram utilizadas as doses de 10 μ g/kg para o agonista β_2 -AR formoterol (RYALL, SILLENCE e LYNCH, 2006), e 10 mg/kg do agonista β -AR isoproterenol (BROOKS e CONRAD, 2009; ENGLE et al., 2009; RICHARDS et al., 2013), ambos por 30 minutos, e administrados via injeção intraperitoneal. As doses dos agonistas para o tratamento dos camundongos foram

escolhidas a partir de estudos da literatura, e a fim de garantir a ativação eficiente dos receptores β -AR.

4.4. Tratamento com o antagonista β_2 -AR ICI 118,551. Para o tratamento de células foi utilizado uma concentração de 300 nM de ICI 118,551 (Sigma-Aldrich), por 60 minutos, sendo que os 30 primeiros minutos foram realizados antes do tratamento com isoproterenol. A concentração utilizada e o tempo de administração foram baseados em estudos da literatura (SHIVACHAR e EIKENBURG, 1999) e em dados não publicados produzidos pelo laboratório do Prof. Dr. Daniel Bernstein da Universidade de Stanford, Ca-EUA.

O tratamento com ICI 118,551 em camundongos foi realizado via injeção intraperitoneal, na dose de 10 mg/kg, 30 minutos antes da sessão de EFA, ou do tratamento com o agonista β -AR isoproterenol. A dose de 10 mg/kg foi determinada a partir de estudos na literatura (BURNISTON, TAN e GOLDSPINK, 2006) e também a partir de padronização prévia realizada especificamente para este estudo, como pode ser observado na FIGURA 4, a seguir.

Para a padronização da dose de ICI 118,551, camundongos FVB receberam três diferentes doses de ICI 118,551 (1, 5 e 10 mg/kg), 30 minutos antes do tratamento com 100 μ g/kg do agonista β_2 -AR formoterol. Os dados demonstram que somente a dose de 10 mg/kg de ICI 118,551 foi eficaz em inibir a ação do formoterol no músculo tibial anterior. Por outro lado, o músculo sóleo não apresentou aumento dos substratos fosforilados pela PKA e, por este motivo, o ICI 118,551 não apresentou efeito de bloqueio. Essa diferença entre o músculo tibial anterior e o sóleo pode ser explicada pelas diferenças de resposta a agonistas β_2 -AR em músculos com características oxidativas e glicolíticas, como previamente discutido no tópico 2.2. Também por este motivo, e a partir desta padronização, optou-se neste estudo por avaliar os parâmetros mitocondriais somente no músculo tibial anterior, o qual possui metabolismo predominantemente glicolítico.

FIGURA 4. Padronização da dose do antagonista ICI 118,551 na musculatura esquelética de camundongos. Expressão proteica dos substratos fosforilados pela PKA no músculo tibial anterior (TA) (A e C) e expressão proteica dos substratos fosforilados pela PKA no músculo sóleo (B e D) de camundongos controle, tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (100 μ g/kg) por 60 minutos (FOR), de camundongos tratados com 1 mg/kg do antagonista β_2 -AR ICI 118,551 por 30 minutos seguidos da administração de uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (100 μ g/kg) por 60 minutos (ICI (1 mg/kg) + FOR), de camundongos tratados com 5 mg/kg do antagonista β_2 -AR ICI 118,551 por 30 minutos seguidos da administração de uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (100 μ g/kg) por 60 minutos (ICI (5 mg/kg) + FOR), e de camundongos tratados com 10 mg/kg do antagonista β_2 -AR ICI 118,551 por 30 minutos seguidos da administração de uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (100 μ g/kg) por 60 minutos (ICI (10 mg/kg) + FOR). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo $p < 0,05$ como significância, sendo *vs. Controle, +vs. ICI (1 mg/kg) + FOR, e # vs. ICI (5 mg/kg) + FOR.

4.5. Tratamento com o antagonista β_1 -AR CGP 20712 A. O tratamento com CGP 20712 A (Sigma-Aldrich), foi realizado nos miotúbulos diferenciados de células C2C12, diluído em meio de cultura, na concentração de 300 nM por 60 minutos, sendo que os 30 primeiros minutos foram realizados antes do tratamento com

isoproterenol. A concentração utilizada e o tempo de administração foram baseados em estudos da literatura (KITAGAWA, ADACHI-AKAHANE e NAGAO, 1995).

4.6. Tratamento com PKI (5-24), inibidor de PKA. O tratamento com PKI (PKI (5-24), PKA Inhibitor, Santa Cruz Biotechnology) foi realizado nos miotúbulos diferenciados de células C2C12, diluído em meio de cultura, na concentração 20 μ M (XIANG e KOBILKA, 2003), por 60 minutos, sendo que os 30 primeiros minutos foram realizados antes do tratamento com isoproterenol.

4.7. Tratamento com PTX, inibidor de proteína $G\alpha_i$. O tratamento com PTX (Pertussis toxin from Bordetella pertussis, Sigma-Aldrich) foi realizado nos miotúbulos diferenciados de células C2C12, diluído em meio de cultura, na concentração 0,75 μ g/ml (MAISEL et al., 1990; XIANG e KOBILKA, 2003) por 60 minutos, sendo que os 30 primeiros minutos foram realizados antes do tratamento com isoproterenol.

4.8. Tratamento com FK506, inibidor de calcineurina. O tratamento com FK506 (FK506 Tacrolimus, Prograf) foi realizado nos miotúbulos diferenciados de células C2C12, diluído em meio de cultura, na concentração 5 μ M (MOUTABARRIK et al., 1992; SHIN et al., 2002), por 60 minutos, sendo que os 30 primeiros minutos foram realizados antes do tratamento com isoproterenol.

4.9. Teste incremental máximo em esteira rolante. Todos os animais foram adaptados à esteira rolante por 5 dias consecutivos, 10 minutos/dia, em velocidades variadas. Após adaptação, os animais foram submetidos a um teste incremental máximo com velocidade inicial da esteira rolante de 6 m/min e com incrementos de 3 m/min a cada 3 min, e inclinação de 5°. O teste foi interrompido quando o animal demonstrou sinais claros de exaustão, ou seja, incapacidade de manter a corrida. Foram anotadas a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) atingida e a distância total percorrida, a qual denota a capacidade máxima de corrida do animal.

4.10. Protocolo de exercício físico aeróbico. As sessões de EFA foram executadas a 80% da velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos ou até a exaustão do animal. A intensidade de 80% da $V_{\text{máx}}$ foi selecionada a fim de estimular ainda mais a liberação de cetacolaminas durante o exercício físico, pois como se sabe, os níveis destes hormônios aumentam gradativamente com o aumento da duração e da intensidade do exercício físico realizado (URHAUSEN et al., 1994; ZOUHAL et al., 2008).

Todas as análises funcionais, estruturais e bioquímicas foram realizadas nos tecidos coletados imediatamente (0h) após a realização do protocolo de exercício descrito acima. Neste estudo, optou-se por este tempo pós-exercício a partir de uma padronização prévia, segundo a FIGURA 5 abaixo. Nesse estudo piloto foi observado que a PKA, uma das principais quinases ativadas pelos receptores β -AR (LYNCH e RYALL, 2008), transloca para a mitocôndria imediatamente após a realização de uma sessão de exercício, e que 3 ou 6 horas após o exercício esse efeito já não é mais observado. Como um dos principais objetivos desse estudo foi avaliar os efeitos da ativação simpática sobre a mitocôndria da musculatura esquelética pós-exercício, optou-se por realizar as análises propostas nos tecidos coletados imediatamente após o EFA, já que neste tempo foi observado o aumento da expressão de uma importante proteína da via β -AR na mitocôndria.

FIGURA 5. Translocação de PKA para a mitocôndria após uma única sessão de exercício físico aeróbico. Expressão da quinase PKA na fração mitocondrial extraída da musculatura esquelética de camundongos FVB controles e na fração mitocondrial extraída da musculatura esquelética 0h, 3h e 6h após camundongos FVB se exercitarem conforme o protocolo descrito nos métodos. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo $p < 0,05$ como significância, sendo *vs. Controle, e +vs. 0h.

4.11. Função mitocondrial em mioblastos de C2C12. A avaliação da função mitocondrial em mioblastos de C2C12 foi realizada por meio do equipamento Seahorse (Seahorse XF24, Seahorse Bioscience) conforme protocolo descrito anteriormente (WU et al., 2007). Inicialmente, 40.000 mioblastos foram cultivados em placa de 24 poços, específica para o equipamento utilizado. O número de células inicial foi padronizado em experimento piloto, onde 20.000, 40.000, 60.000 e 100.000 células foram testadas. Como mostra a FIGURA 6, 40.000 células foi o número ideal para a realização do experimento, considerando-se a resposta às drogas utilizadas e a variabilidade intragrupo. Após um dia de proliferação, as células foram lavadas 2 vezes com o meio de ensaio (XF Base Medium, Seahorse Bioscience), contendo 10 mM de glicose, 2 mM de piruvato de sódio e 2 mM de L-glutamina. A oligomicina (1 μ M), o FCCP (1 μ M) e a Antimicina A + Rotenona (0,5 μ M) foram diluídos e adicionados em placa específica para o ensaio, sendo a concentração final em cada poço após tratamento de 1 μ M, 1 μ M e 0.5 μ M, respectivamente. Os dados foram expressos em pmol/min.

FIGURA 6. Padronização do número de células utilizado para a avaliação do consumo de oxigênio em mioblastos de células C2C12. As drogas oligomicina (Oligo, inibidor da ATP sintase), FCCP (desacoplador mitocondrial) e Antimicina A + Rotenona (inibidores dos complexos dos III e I da mitocôndria, respectivamente) foram adicionadas ao longo do ensaio.

4.12. Função mitocondrial em miotúbulos de C2C12. Para a avaliação da função mitocondrial em miotúbulos, os mioblastos de C2C12 foram diferenciados em garrafas (Corning, 75 cm²), de acordo com o protocolo descrito acima. No sexto dia de diferenciação, os miotúbulos maduros foram expostos ao meio de cultura livre de soro, e o ensaio de consumo de oxigênio foi realizado no dia seguinte. No dia do experimento, após os tratamentos terem sido realizados, os miotúbulos foram removidos da garrafa de cultura com a ajuda da solução tripsina-EDTA (Trypsin-EDTA solution 1x, Sigma-Aldrich) por 5 minutos, seguida de centrifugação em meio de cultura por 5 minutos a 1000 rpm. Foi realizada a contagem das células, e 2 milhões de células foram utilizadas para a realização do ensaio de respiração mitocondrial no equipamento Oroboros (OROBOROS O2K Oxygraph, Oroboros Instruments). O número de células foi determinado em titulação prévia realizada nas mesmas condições e no mesmo equipamento. O meio livre de soro, insulina e antibióticos (DMEM high glucose, *Dulbecco's-modified Eagle's Medium* – Gibco, Invitrogen) foi utilizado como tampão de ensaio, aquecido a 37°C.

4.13. Função mitocondrial em fibras musculares isoladas. Para a avaliação da função mitocondrial em animais, foi realizado o ensaio de consumo de O₂ em fibras musculares permeabilizadas, isoladas do músculo tibial anterior de camundongos.

Permeabilização das fibras musculares isoladas

A preparação das fibras musculares permeabilizadas e o ensaio de consumo de O₂ foram realizados conforme descrito por (ANDERSON et al., 2009). Após a sua extração, o músculo tibial anterior foi colocado em um tampão de isolamento (60 mM K-MES, 35 mM KCl, 7,23 mM K₂EGTA, 2,77 mM CaK₂EGTA, 20 mM imidazole, 0,5 mM DTT, 20 mM taurina, 5,7 mM ATP, 15 mM PCr, 6,56 mM MgCl₂-6H₂O, pH 7.1, 4°C), onde os tecidos conectivos e gordura foram retirados, e pequenos feixes de fibras foram gentilmente separados ao longo do eixo longitudinal. Posteriormente, as fibras separadas foram tratadas com 30 µg/ml de saponina, detergente que permeabiliza a membrana sarcolemal e mantém as membranas mitocondriais intactas. Após a permeabilização, as fibras foram lavadas em um tampão de ensaio (110 mM K-MES, 35 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM K₂HPO₄, 3 mM MgCl₂-6H₂O, 5 mg/ml BSA, 0,05 mM piruvato e 0,02 mM malato, pH 7.4, 4°C) e mantidas neste tampão a 4°C, em mesa oscilatória, até o início dos ensaios (< 2 horas).

Consumo de O₂ nas fibras permeabilizadas. O consumo de O₂ foi realizado em tampão de ensaio, aquecido a 37°C, utilizando-se o equipamento Oroboros (OROBOROS O2K Oxygraph, Oroboros Instruments). Ao final de cada experimento, as fibras permeabilizadas foram lavadas em água ultrapura, a fim de remover os sais, e foram pesadas para posterior correção dos dados adquiridos. A taxa de respiração foi expressa em pmol/s/mg de peso úmido.

4.14. Produção de ATP nos miotúbulos de C2C12. A razão ATP/ADP foi analisada por bioluminescência, utilizando-se um kit comercial (ADP/ATP Ratio Assay Kit, Bioluminescent, Abcam), e o ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

4.15. Morfologia mitocondrial. A morfologia mitocondrial foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica, com o intuito de verificar possíveis mudanças na estrutura da organela. A preparação das telas foi feita conforme descrito anteriormente por KARNOVSKY (1964), e as imagens foram registradas em

computador acoplado ao microscópio eletrônico, conectado a um sistema fotográfico. Posteriormente, o número, área, perímetro, alongamento e circularidade mitocondrial foram quantificados pelo sistema ImageJ, fornecido gratuitamente pelo NIH (EUA) via Internet. Para o cálculo do número de mitocôndrias foram analisados 5 campos visuais por animal (3 a 5 animais por grupo) e a média está apresentada na forma de número de mitocôndrias por 100 μm^2 . A área, perímetro, alongamento e circularidade mitocondrial foram quantificados a partir da análise de 300 mitocôndrias por grupo.

4.16. Isolamento da fração mitocondrial a partir de músculo esquelético e células.

Isolamento da fração mitocondrial na musculatura esquelética. Logo após o sacrifício dos animais, toda a musculatura de uma pata posterior dos camundongos foi dissecada, removendo-se tecidos conjuntivos e gordura, e a fração mitocondrial foi isolada conforme descrito previamente por (DIMAURO et al., 2012). O tecido foi colocado no tampão de lise STM (250 mM sacarose, 50 mM Tris-Hcl pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , a 4°C.) e processado por 2 segundos em um homogeneizador Polytron e depois transferido para um homogeneizador elétrico Potter. O homogeneizado foi filtrado, a fim de remover pedaços de músculo ou tendão remanescentes, e deixado em gelo por 30 minutos. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas por duas vezes a 800g, sendo a primeira centrifugação por 15 minutos, e o sobrenadante da primeira centrifugação a 10 minutos. O sobrenadante então foi centrifugado a 11.000g por 10 minutos. O sobrenadante resultante desta última centrifugação foi tratado com acetona 100% a -20°C por, no mínimo uma hora, e depois centrifugado a 12.000g para a separação do citosol, presente no pellet ressuspensionado em tampão STM. O pellet mitocondrial resultante da centrifugação de 11.000g foi lavado uma vez em tampão STM e centrifugado mais uma vez a 11.000g. Por fim, o pellet mitocondrial resultante foi ressuspensionado em tampão SOL (50 mM Tris-Hcl pH 6.8, 1 mM EDTA, 0,5% Triton-X-100, a 4°C). Foram adicionados a ambos os tampões inibidores de protease e fosfatase.

Isolamento da fração mitocondrial nos miotúbulos de C2C12. Após os devidos tratamentos terem sido realizados, os miotúbulos foram lavados com PBS 1X e removidos da placa de cultura com a ajuda de um raspador de células, junto ao tampão de lise (300 mM sacarose, 50 mM Hepes, 10 mM Tris, 1 mM EGTA, e 0,2% BSA, pH 7.2, HCl, a 4°C). As células em suspensão no tampão foram lisadas mecanicamente com uma seringa com agulha 27G. Após esse processo, o homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 500g, e o sobrenadante resultante desta centrifugação foi, por sua vez, centrifugado a 11.000g por 15 min. O sobrenadante foi retirado e guardado (fração citosólica), e o pellet mitocondrial ressuspendido no mesmo tampão de lise contendo 1% de Triton-X-100.

A FIGURA 7 mostra a pureza da fração mitocondrial resultante de cada protocolo de extração descrito acima, para músculo esquelético e para os miotúbulos de células C2C12. Para isso, foi analisada a expressão da proteína citosólica enolase nas frações mitocondrial e citosólica extraídas da musculatura esquelética de camundongos e dos miotúbulos diferenciados de células C2C12.

FIGURA 7. Gel de pureza para as frações mitocondriais extraídas de músculo esquelético de camundongo e de miotúbulos diferenciados de células C2C12. Expressão da proteína citosólica enolase nas frações mitocondrial e citosólica extraídas da musculatura esquelética de camundongos (A); e expressão da proteína citosólica enolase nas frações mitocondrial e citosólica extraídas de miotúbulos diferenciados de células C2C12 (B).

4.17. Expressão proteica. A expressão das proteínas de interesse de cada subprojeto foi avaliada por meio da técnica de *Western Blotting* nas frações mitocondriais, nos miotúbulos de C2C12 ou no músculo esquelético, conforme indicado em cada subprojeto. A concentração de proteína das amostras foi analisada por meio do método de Bradford (Biorad, EUA). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra e separadas em gel SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários e secundários específicos para cada proteína de interesse (Anticorpos primários: DRP1 - BD Transduction Laboratories; Fis1 - Enzo Life Sciences; Mfn1 - Abnova Corporation; Mfn2 - Abnova Corporation; OPA1 - BD Transduction Laboratories; Enolase - Santa Cruz Biotech; VDAC – Abcam. Anticorpos secundários: Rabbit IgG e Mouse IgG - GE Healthcare Life Sciences). A imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência (*Clarity™ Western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad*). As análises quantitativas dos blots foram realizadas por meio do programa ImageJ (*Scion Corporation, NIH, EUA*).

4.18. Análise estatística. Inicialmente a distribuição dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homoscedasticidade por meio do teste de Levene. Sendo os dados independentes e apresentando distribuição normal e variâncias homogêneas, utilizamos análises paramétricas. Conforme o desenho experimental de cada subprojeto foram aplicados o teste t de *Student* para dados independentes ou a análise de variância (ANOVA) para dois caminhos (pré-tratamento com ICI 118,551 e tratamento com isoproterenol, ou pré-tratamento com ICI 118,551 e exercício). O *post-hoc* de Duncan foi aplicado. Para todas as análises, foi adotado como nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os dados coletados durante o período do doutorado realizado, parte na Escola de Educação Física e Esporte da USP e parte no laboratório do Professor Dr. Daniel Bernstein, na Universidade de Stanford, CA-EUA.

5.1. Subprojeto 1

Este primeiro subprojeto teve como objetivo principal avaliar o papel da ativação β_2 -adrenérgica na função e dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética após a administração aguda de agonistas β -AR.

Nesse estudo, optou-se pelo tratamento agudo com agonistas β -AR a fim de comparar os efeitos do tratamento farmacológico aos efeitos da sessão aguda de EFA, e também com o intuito de identificar o papel da ativação aguda dos receptores β -AR sobre a mitocôndria da musculatura esquelética, independente das bem conhecidas adaptações musculares encontradas com a ativação crônica dos receptores β -AR (aumento da massa muscular, mudança na tipagem de fibras, favorecendo o aumento das fibras do tipo II, glicolíticas, e aumento da biogênese mitocondrial) (LYNCH e RYALL, 2008; WILLS et al., 2012).

5.1.1. Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em mioblastos de células C2C12: efeito do agonista β_2 -AR seletivo formoterol.

O uso de cultura de células no presente projeto foi de extrema relevância para conseguirmos estudar com menor influência de fatores intervenientes (e.g. fatores neuro-humorais e metabólitos, além do aumento de fluxo sanguíneo para o músculo, dentre outros), a contribuição dos receptores β_2 -adrenérgicos na função mitocondrial em mioblastos da linhagem de célula muscular esquelética C2C12. Dessa forma, mioblastos de C2C12 foram tratados com formoterol, um agonista β_2 -AR de última geração, altamente seletivo e de longa duração (ANDERSON, LINDEN e RABE, 1994; RYALL, SILLANCE e LYNCH, 2006; DECRAMER et al., 2013; TOLEDO et al., 2014), em diferentes concentrações (100 nM, 1 μ M e 10 μ M) durante a medida de respiração mitocondrial no equipamento Seahorse. Como pode ser observado na FIGURA 8, nenhuma das concentrações de formoterol foi capaz de aumentar significativamente os valores absolutos do consumo de oxigênio pelos mioblastos, tanto em situação basal, como durante a respiração máxima. No entanto, os mioblastos tratados com 1 μ M de formoterol apresentaram uma tendência a aumento da respiração basal (Δ basal formoterol - basal controle, $p=0,06$, FIGURA 8B). Por outro lado, o tratamento com 10 μ M de formoterol diminuiu

significativamente a respiração mitocondrial máxima dos mioblastos (Δ FCCP - basal, FIGURA 8C).

Esses resultados sugerem que o formoterol leve ao aumento da respiração mitocondrial basal em mioblastos de C2C12, mas também sugerem que esta resposta seja dependente da concentração do fármaco utilizada, visto que a concentração de 1 μ M apresentou tendência a aumento da respiração basal e 10 μ M diminuiu significativamente a respiração máxima. Há poucos estudos na literatura que forneçam evidências de que a ativação β_2 -AR por meio do agonista formoterol promova aumento da função e biogênese mitocondriais (WILLS et al., 2012; JESINKEY et al., 2014), sendo que esses estudos foram realizados em animais, utilizando-se tratamento crônico com formoterol, ou em células primárias de rim, com concentrações inferiores e tempo de exposição ao agonista superiores aos utilizados no presente estudo. Portanto, este é o primeiro estudo a avaliar o efeito da ativação β_2 -AR sobre a função mitocondrial na musculatura esquelética ou em linhagem de células derivadas deste tecido.

Como já mencionado, ainda não é consenso na literatura de que agonistas β -AR modulem a função mitocondrial em diversos tecidos e por qual via de sinalização isso aconteceria. No entanto, algumas evidências recentes têm apontado componentes da via dos receptores β -AR (AMPc e PKA), como moduladores dessa resposta (DAGDA et al., 2011; DE RASMO et al., 2011; VALSECCHI et al., 2013).

Nesse sentido, RAJAGOPAL et al. (2011) demonstraram que o formoterol é um agonista β_2 -AR com viés de ligação (em inglês chamado de “*biased agonist*”). O conceito de agonistas com viés de ligação surgiu recentemente, junto às evidências de que os GPCRs (*G protein-coupled receptors*), os receptores acoplados à proteína G, possuem sinalização complexa e podem adotar múltiplas conformações a partir de sua ligação a um agonista (RAJAGOPAL et al., 2011; MANGLIK et al., 2015). Esses agonistas com viés de ligação seriam capazes de estabilizar o receptor em apenas uma conformação, em meio às diversas possibilidades de conformações que o receptor acoplado à proteína G pode adotar, ativando, conseqüentemente, apenas vias específicas de sinalização (REITER et al., 2012). Em relação ao formoterol, os autores identificaram que este se trata de um agonista β_2 -AR com viés de ligação a favor do recrutamento de β -arrestina, conhecida por controlar, em conjunto com as

GRKs (quinases dos receptores acoplados à proteína G), a dessensibilização, internalização e reciclagem de receptores GPCRs. No entanto, estudos realizados na última década têm demonstrado que as GRKs e as β -arrestinas possuem outras funções, e são agora consideradas mediadoras independentes da sinalização de proteína G (VIOLIN e LEFKOWITZ, 2007; RAJAGOPAL et al., 2011; REITER et al., 2012).

Considerando o exposto acima, a ausência de efeito, ou o efeito discreto do formoterol sobre a respiração dos mioblastos pode ter resultado do fato de este ser um agonista com viés de ligação para a β -arrestina. Além disso, pode-se sugerir que o formoterol não seja o agonista ideal para se estudar o papel da sinalização β_2 -AR nas alterações mitocondriais, uma vez que os estudos da literatura, apesar de escassos, apontam que o eixo AMPc – PKA seria a principal via de sinalização a jusante pós-ativação dos β_2 -AR envolvida na resposta mitocondrial.

FIGURA 8. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de formoterol em mioblastos de C2C12. Traçado do consumo de oxigênio basal antes e após o tratamento com formoterol (FOR), e na presença de oligomicina (Oligo), FCCP, e antimicina A mais rotenona (AntA + Rot) (A); consumo de oxigênio basal após o tratamento com formoterol (delta da respiração basal após o tratamento com formoterol pela respiração basal pré-tratamento) (B); consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (delta da respiração máxima pela respiração basal pré-tratamento) (C) em mioblastos de C2C12 tratados com 100 nM, 1 μM e 10 μM de formoterol. Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle.

5.1.2. Papel da ativação β-AR sobre a respiração mitocondrial em mioblastos de células C2C12: efeito do agonista β-AR não seletivo isoproterenol.

Levando-se em consideração que o agonista formoterol apresenta um viés de ligação a favor da sinalização de β-arrestina, como já discutido acima, os mioblastos também foram tratados com o agonista β-AR não seletivo isoproterenol em

diferentes concentrações (100 nM, 1 μ M e 10 μ M) durante a avaliação da respiração mitocondrial no equipamento Seahorse. O agonista β -AR isoproterenol não é considerado um agonista com viés de ligação, e foi escolhido por ser amplamente utilizado na literatura para avaliar e diferenciar os efeitos da ativação simpática por meio dos receptores β_1 -AR e β_2 -AR (BERNSTEIN e CRANE, 1991; CHRUSCINSKI et al., 1999; RAJAGOPAL et al., 2011).

Como mostra a FIGURA 9, todas as doses de isoproterenol foram capazes de aumentar significativamente a respiração mitocondrial basal dos mioblastos. Esta resposta mais pronunciada do isoproterenol em relação ao formoterol pode ser explicada pelo fato de que o primeiro se trata de um fármaco sem viés de ligação à β -arrestina, como já mencionado acima, ou também pelo fato do isoproterenol ser um agonista não seletivo, capaz de ativar todos os subtipos de receptores β -AR, embora já tenha sido demonstrado que os níveis de RNA mensageiro dos receptores β_2 -AR em mioblastos de C2C12 sejam aproximadamente 100 vezes maiores que os dos receptores β_1 -AR (WANNENES et al., 2012).

Apesar do aumento significativo de respiração mitocondrial basal encontrado após o tratamento com isoproterenol, nenhuma das concentrações testadas foi capaz de aumentar significativamente a respiração máxima dos mioblastos (FIGURA 9C). No entanto, os mioblastos expostos a 1 μ M de isoproterenol apresentaram uma tendência a aumento (Δ FCCP - basal, $p=0,08$) da respiração máxima.

O aumento da função mitocondrial induzido pela ativação β -AR encontrado no presente estudo corrobora evidências da literatura que mostram que alvos da sinalização β -AR, como AMPc e PKA, são capazes de ativar complexos mitocondriais, principalmente os complexos I e IV (DAGDA et al., 2011; DE RASMO et al., 2011; VALSECCHI et al., 2013). Como descrito no item 2.3, De Rasmo et al., 2011 demonstraram que fibroblastos e mioblastos cardíacos tratados com isoproterenol por 35 minutos apresentaram aumento dos níveis de AMPc, diminuição da produção de EROs e aumento da atividade do complexo I mitocondrial, sugerindo que a ativação β -AR nestas células promove um melhor funcionamento da cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, uma melhora na função mitocondrial (DE RASMO et al., 2011). Portanto, os dados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, que o aumento de respiração mitocondrial promovido pela via de

sinalização ativada pelos receptores β -AR em células nervosas, de rim e de coração também ocorre em linhagem de células de músculo esquelético.

FIGURA 9. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de isoproterenol em mioblastos de C2C12. Traçado do consumo de oxigênio basal antes e após o tratamento com isoproterenol (ISO), e na presença de oligomicina (Oligo), FCCP, e antimicina A mais rotenona (AntA + Rot) (A); consumo de oxigênio basal após o tratamento com isoproterenol (delta da respiração basal após o tratamento com isoproterenol pela respiração basal pré-tratamento) (B); consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (delta da respiração máxima pela respiração basal pré-tratamento) (C) em mioblastos de C2C12 tratados com 100 nM, 1 μ M e 10 μ M de isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle.

Apesar de mioblastos das células C2C12 serem amplamente utilizados na literatura como um modelo para se estudar músculo esquelético, neste projeto de pesquisa optou-se por dar continuidade nas avaliações do papel dos receptores β -

AR em miotúbulos diferenciados a partir dos mioblastos, pois ao serem diferenciadas em miotúbulos, as células adquirem características, como morfologia e metabolismo, muito mais próximas às de um músculo esquelético maduro (SIN et al., 2016). Dessa forma, todas as análises realizadas em células C2C12 a partir de então foram feitas em miotúbulos diferenciados por 6 dias a partir de mioblastos.

A fim de certificar a presença de miotúbulos ao final do protocolo de diferenciação, foi avaliada a expressão de miosina de cadeia pesada (MHC) no lisado total de mioblastos e miotúbulos, uma vez que somente miotúbulos expressam tal proteína contrátil (LANGLEY et al., 2002; WILLKOMM et al., 2014). O lisado total de músculo esquelético foi utilizado como controle positivo da proteína MHC. Na FIGURA 10 pode-se observar que os miotúbulos diferenciados por 6 dias passam a expressar MHC, validando o protocolo de diferenciação.

FIGURA 10. Expressão de miosina de cadeia pesada (MHC) em miotúbulos diferenciados a partir de mioblastos de células C2C12. Figuras ilustrativas de mioblastos e de miotúbulos após 6 dias de diferenciação (A); e expressão proteica de miosina de cabeça pesada (MHC) em mioblastos, miotúbulos diferenciados de C2C12, e no lisado total de músculo esquelético, utilizado como controle positivo da proteína MHC (B).

Considerando que o tratamento com isoproterenol nos mioblastos promoveu alterações mais pronunciadas na respiração mitocondrial, e que o mesmo se trata de um fármaco sem viés de ligação à β -arrestina, como já discutido no tópico 5.1.1, optou-se por utilizá-lo como agonista principal neste projeto. O agonista específico β_2 -AR formoterol foi utilizado em momentos pontuais, como será observado ao longo dessa discussão.

Dessa forma, deu-se continuidade à avaliação do papel dos receptores β_2 -AR na função mitocondrial na musculatura esquelética tratando-se miotúbulos diferenciados de C2C12 com isoproterenol, associado ou não a antagonistas β -AR e fármacos inibidores de vias de sinalização resultantes da ativação β -adrenérgica, como descrito no tópico 4 de métodos e ilustrado no desenho experimental do subprojeto 1 (QUADRO 1).

5.1.3. Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em miotúbulos de células C2C12: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR e β_1 -AR.

A fim de dar continuidade à avaliação do papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial na musculatura esquelética, os miotúbulos foram tratados com isoproterenol, sob o bloqueio dos receptores β_1 -AR ou β_2 -AR. Inicialmente, os miotúbulos foram expostos por 30 minutos a um meio de cultura contendo ICI 118,551, o qual é considerado um antagonista altamente seletivo para os receptores β_2 -ARs (O'DONNELL e WANSTALL, 1980; NATHANSON, 1984), na concentração de 300 nM, e após esse período foi adicionado ao meio isoproterenol, em uma concentração final de 1 μ M. A concentração de 1 μ M foi escolhida a partir de uma titulação para a razão ATP/ADP, um índice indireto da função mitocondrial, o qual será discutido abaixo. Ao final dos 30 minutos de tratamento com isoproterenol, as células foram coletadas e levadas ao oxígrafo Oroboros para a análise do consumo de oxigênio. É importante esclarecer que se optou por utilizar o oxígrafo Oroboros nesta etapa do estudo por uma questão metodológica, pois diversos ensaios preliminares realizados com miotúbulos no equipamento Seahorse apresentaram uma variabilidade muito grande nas respostas intragrupo, e as respostas das células ao FCCP, utilizado durante o experimento, também ficaram comprometidas. Tais problemas foram minimizados com a utilização do oxígrafo Oroboros.

Como pode ser observado na FIGURA 11A, o tratamento com isoproterenol aumentou a respiração mitocondrial basal, corroborando os dados de consumo de oxigênio nos mioblastos tratados com o mesmo agonista. Além disso, o tratamento promoveu aumento da respiração máxima (FIGURA 11C), o qual não havia sido observado nos mioblastos. Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas no consumo de oxigênio sob o bloqueio da ATP sintase com oligomicina.

Este efeito de aumento da respiração máxima nos miotúbulos com isoproterenol pode ser explicado pelo fato de que estes, diferentemente dos mioblastos, possuem um metabolismo altamente ativo e predominantemente oxidativo, com uma maior população de mitocôndrias, organizadas entre si de forma mais complexa. Os mioblastos, por sua vez, possuem um metabolismo

predominantemente glicolítico, com uma população mitocondrial mais rarefeita, menos organizada e com menos interação entre si (SIN et al., 2016). Além disso, após a diferenciação em miotúbulos, estas células passam a expressar mais receptores β -AR do que os mioblastos, o que pode ter otimizado o efeito do tratamento com isoproterenol sobre a respiração mitocondrial (WANNENES et al., 2012).

O pré-tratamento com ICI 118,551, antagonista β_2 -AR seletivo, preveniu significativamente o aumento de função mitocondrial resultante do tratamento com isoproterenol, tanto na respiração basal, como na respiração máxima (FIGURAS 11A e 11B), demonstrando que os receptores β_2 -AR são necessários para que esse aumento de função mitocondrial ocorra em miotúbulos de células C2C12.

No entanto, quando os miotúbulos foram pré-tratados por 30 minutos com CGP, um antagonista β_1 -AR seletivo, a uma concentração de 300 nM, o aumento da respiração mitocondrial basal e da respiração máxima com isoproterenol deixaram de acontecer, mas essa prevenção não foi significativa em relação ao grupo somente tratado com isoproterenol, como observado anteriormente com os bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551 (FIGURAS 11D e 11F). Esses dados demonstram que os receptores β_1 -AR também contribuem para o aumento da função mitocondrial, mas que estes são menos relevantes para esta resposta quando comparados aos receptores β_2 -AR. De fato, as FIGURAS 11G e 11H mostram que os deltas de queda da respiração mitocondrial basal e da respiração máxima com ICI ou CGP em relação ao grupo somente tratado com isoproterenol são diferentes, sendo a queda com ICI mais pronunciada do que a queda com CGP, principalmente para a respiração máxima, onde a diferença é estatisticamente significativa.

Essa diferença provavelmente se dá pela densidade de receptores β_1 -AR e β_2 -AR nos miotúbulos de C2C12, uma vez que, após 4 dias de diferenciação, estas células possuem níveis de RNAm aproximadamente 50% menor para receptores β_1 -AR, quando comparados aos receptores β_2 -AR (WANNENES et al., 2012). No entanto, essa diferença entre a expressão de receptores β_1 -AR e β_2 -AR é ainda maior no tecido muscular esquelético, onde os últimos representam aproximadamente 90% da população total de receptores β -AR (ELFELLAH et al., 1989).

FIGURA 11. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de isoproterenol e do pré tratamento com ICI 118,551 em miotúbulos de células C2C12. Consumo de oxigênio basal (A); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (B) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (C) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o antagonista β_2 -AR ICI 118,551 (300 nM) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol; consumo de oxigênio basal (D); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (E) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (F) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o antagonista β_1 -AR CGP (300 nM) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol; percentual de queda no consumo de oxigênio basal (G) e percentual de queda no consumo de oxigênio máximo (H) promovido pelo pré-tratamento com ICI 118,551 ou CGP em relação ao grupo tratado somente com isoproterenol (H). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle, # vs. ISO e @ vs. ICI + ISO.

As FIGURAS 12A e 12B demonstram que o aumento de respiração mitocondrial induzido por isoproterenol nos miotúbulos está acoplado à produção de ATP, já que a exposição destas células ao agonista β -AR aumentou a razão ATP/ADP analisada por ensaio de bioluminescência. É importante destacar que foi

realizada, previamente, uma titulação da concentração de isoproterenol, onde somente a concentração de 1 μ M foi capaz de aumentar a razão ATP/ADP nos miotúbulos (FIGURA 12A). Por este motivo, em todos os tratamentos realizados com isoproterenol em miotúbulos, optou-se por utilizar a concentração de 1 μ M.

O pré-tratamento dos miotúbulos com ICI preveniu significativamente o aumento da razão ATP/ADP promovido pelo isoproterenol, demonstrando que o receptor β_2 -AR contribui para esta resposta (FIGURA 12B). De fato, além do tratamento com isoproterenol, também foi realizada uma titulação para o tratamento dos miotúbulos com formoterol, agonista específico do receptor β_2 -AR, e a concentração de 10 μ M também foi eficaz em aumentar a razão ATP/ADP, reafirmando a importância dos receptores β_2 -AR na melhora da função mitocondrial (FIGURA 12C).

Neste contexto, um estudo recente demonstrou que o estímulo adrenérgico, via ativação dos receptores β_2 -AR com o agonista clenbuterol, é capaz de aumentar a atividade da ATP sintase (complexo mitocondrial responsável pela síntese de ATP) e a produção de ATP no coração de camundongos FVB. Ainda, segundo o estudo, a PKA seria a proteína mediadora deste processo, responsável por fosforilar e inativar o fator IF1 (*ATPase Inhibitory Factor 1*), o qual se liga reversivelmente à ATP sintase, inibindo-a e favorecendo, desta forma, o aumento na produção de ATP (GARCIA-BERMUDEZ et al., 2015). Estes dados, avaliados em coração e em linhagem de células humanas, dão suporte aos dados do presente estudo que demonstra aumento na produção de ATP em miotúbulos de células C2C12.

Em suma, os dados demonstram que a ativação direta do receptor β_2 -AR em linhagem de células musculares esqueléticas promove o aumento da respiração mitocondrial basal e máxima, e que esse aumento está associado à maior produção de ATP pela mitocôndria.

FIGURA 12. Razão ATP/ADP em miotúbulos de C2C12 tratados com formoterol e com isoproterenol associado ao antagonista β_2 -AR ICI 118,551. Razão ATP/ADP em miotúbulos tratados com 100 nM, 1 μ M e 10 μ M de isoproterenol por 30 minutos (A); razão ATP/ADP em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o antagonista β_2 -AR ICI 118,551 (300 nM) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol (B) e razão ATP/ADP em miotúbulos tratados com 100 nM, 1 μ M e 10 μ M de formoterol por 30 minutos (C). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo *vs. Controle e # vs. ISO.

5.1.4. Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em miotúbulos de células C2C12: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio das proteínas $G\alpha_i$, PKA e calcineurina.

A sinalização β -AR, como já discutido no tópico 2.2, pode atuar por meio da via canônica, ativando a proteína G estimulatória ($G\alpha_s$) e a consequente cascata de AMPc – PKA; ou ainda pode atuar por meio da via não-canônica, ativando a

sinalização dependente de proteína $G\alpha_i$ (LYNCH e RYALL, 2008). Dessa forma, após ser observado aumento significativo da função mitocondrial com o tratamento de isoproterenol, o primeiro passo foi bloquear a principal quinase ativada na cascata clássica de pós-estimulação β -AR, a PKA, a fim de iniciar a identificação da via responsável pelo aumento dessa respiração mitocondrial após o estímulo adrenérgico. Para isso, os miotúbulos foram tratados com um inibidor de PKA, o peptídeo PKI (20 μ M), 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol (1 μ M, por 30 minutos).

Os dados demonstram que o aumento de respiração mitocondrial induzido pelo isoproterenol nos miotúbulos, tanto no basal, quanto na respiração máxima com FCCP, é dependente da ativação de PKA, uma vez que o peptídeo PKI foi capaz de impedir significativamente o aumento do consumo de oxigênio provocado pela ativação dos receptores β -AR (FIGURAS 13A e 13C). Por outro lado, o bloqueio da PKA pelo peptídeo PKI na ausência do tratamento com isoproterenol não alterou a respiração mitocondrial em relação ao grupo controle (FIGURAS 13A, 13B e 13C). Dessa forma, pode-se concluir que a via clássica de ativação β -AR contribui de maneira significativa para a modulação da função mitocondrial nos miotúbulos de células C2C12.

Estes achados corroboram os estudos que vêm sendo publicados nos últimos anos, os quais demonstram a participação da PKA no aumento da função mitocondrial em tecidos como fígado, coração e em linhagem de células humanas (FELICIELLO, GOTTESMAN e AVVEDIMENTO, 2005; ACIN-PEREZ et al., 2009; VALSECCHI et al., 2013; GARCIA-BERMUDEZ et al., 2015; LARK et al., 2015). Além das evidências de que a PKA possa modular diretamente a produção de ATP no coração (GARCIA-BERMUDEZ et al., 2015), e de que também possa modular o consumo de oxigênio em fígado e em células nervosas (ACIN-PEREZ et al., 2009; DAGDA et al., 2011), LARK et al. (2015) demonstraram em estudo recente que a inibição de PKA com H89, inibidor desta quinase, diminui o consumo de oxigênio pelo complexo I mitocondrial, estimulado por diferentes concentrações de ADP em fibras isoladas do músculo gastrocnêmio. Neste mesmo estudo, além de demonstrarem pela primeira vez o papel da PKA sobre a função mitocondrial em músculo esquelético, os autores demonstraram que a inibição de PKA em

mitocôndrias isoladas de fígado também reduz a respiração mitocondrial máxima, resposta esta dependente do complexo I e não do complexo II mitocondrial (LARK et al., 2015).

Embora alguns estudos sugiram que exista uma PKA mitocondrial, localizada na matriz e no espaço intermembranas, e ativada por AMPc gerado por adenilato ciclases solúveis (ACs, localizadas na mitocôndria e sensíveis às concentrações de cálcio, bicarbonato e às mudanças fisiológicas no ATP), outros estudos sugerem que a PKA citosólica também possa interagir diretamente com a mitocôndria, sendo direcionada pelas proteínas de ancoragem AKAPs (*A kinase anchoring proteins*) (FELICIELLO, GOTTESMAN e AVVEDIMENTO, 2005; ACIN-PEREZ et al., 2009; LEFKIMMIATIS, LERONNI e HOFER, 2013; VALSECCHI et al., 2013). Levando-se em consideração esse fato, esta seria a forma pela qual a PKA, ativada pela sinalização β -AR, poderia modular diretamente a função de proteínas e complexos mitocondriais.

Assim, a partir do exposto, pode-se concluir que a PKA possui papel determinante no consumo de oxigênio pela mitocôndria, e é um potencial mediador da ativação β -AR sobre a função mitocondrial na musculatura esquelética. Seria interessante, após isso, investigar de que forma a PKA modula a função mitocondrial, avaliando também a sua localização na mitocôndria.

Como citado anteriormente, além da via clássica, mediada por AMPc e PKA, os receptores β_2 -AR podem atuar por uma via alternativa, denominada não-clássica, pelo seu acoplamento com a proteína G inibitória ($G\alpha_i$). A fim de testar se essa via alternativa contribuiria para o aumento da função mitocondrial após a ativação β -AR, os miotúbulos foram pré-incubados por 30 minutos com toxina pertussis (PTX - 0,75 μ g/ml), um fármaco que desacopla o receptor β -AR da proteína $G\alpha_i$ (MANGMOOL e KUROSE, 2011), tratados com 1 μ M de isoproterenol por 30 minutos.

As FIGURAS 13D e 13F demonstram que o bloqueio da via não-clássica, dependente de $G\alpha_i$, não interferiu no aumento de respiração basal e máxima induzido pelo tratamento com isoproterenol. Estes dados, complementares ao bloqueio de PKA, confirmam que o aumento de função mitocondrial decorrente da ativação β -AR ocorre por meio da via clássica, dependente do eixo $G\alpha_s$ - AMPc –

PKA, e que a via de sinalização por meio de $G\alpha_i$ não possui participação nessa resposta, pelo menos em miotúbulos de células C2C12.

Sabe-se que um dos alvos da PKA na musculatura esquelética é o receptor de rianodina (RyR1, type 1 ryanodine receptor), principal canal de liberação de cálcio (Ca^{2+}) na musculatura esquelética. Quando ativada pela estimulação do sistema simpático, a PKA fosforila a Ser²⁸⁴³ do canal de RyR, resultando na dissociação de FKBP12 (*FK-506 binding proteins*) do receptor de RyR e aumentando a probabilidade de abertura deste canal (REIKEN et al., 2003). Considerando que o cálcio tem sido apontado como um importante regulador da dinâmica mitocondrial e da produção de ATP (DORN, 2013; PAN et al., 2013), é possível que o mesmo seja um intermediário entre a ativação β -AR e a mitocôndria.

Nesse sentido, a calcineurina é uma fosfatase depende de cálcio que tem sido apontada como moduladora do metabolismo e da dinâmica mitocondrial (MOLKENTIN, 2001; LONG et al., 2007; KASAHARA et al., 2013; PAN et al., 2013). Assim, a fim de avaliar a participação da calcineurina sobre o aumento de função mitocondrial após o estímulo simpático, miotúbulos foram tratados com o inibidor de calcineurina FK506 (5 μ M), 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol (1 μ M, por 30 minutos).

Como mostram as FIGURAS 13G e 13I, o aumento do consumo de oxigênio induzido pelo isoproterenol nos miotúbulos, tanto no basal, quanto na respiração máxima com FCCP, foi prevenido pelo tratamento prévio com FK506, demonstrando que a calcineurina contribui para o aumento da respiração mitocondrial. Por outro lado, os miotúbulos tratados somente com FK506, sem a associação com isoproterenol, não apresentaram queda significativa do consumo de oxigênio em todas as condições testadas em relação aos miotúbulos controle (FIGURAS 13G, 13H e 13I). No entanto, o grupo FK506 apresentou uma tendência à queda da respiração máxima quando comparado ao grupo controle (FIGURA 13I), demonstrando que a inibição da calcineurina, independente da ativação β -AR, pode modular o consumo de oxigênio máximo pela mitocôndria.

A partir dos dados descritos acima, pode-se hipotetizar que a calcineurina seria uma das formas pelas quais a dinâmica mitocondrial modula a função das

mitocôndrias, já que dados da literatura demonstram que a mesma está envolvida no processo de fissão mitocondrial, ativando a DRP1 por meio da remoção da fosforilação desta em seu sítio inibitório Ser⁶³⁷ (CEREGHETTI et al., 2008). Neste caso, portanto, a fissão mitocondrial atuaria como um mecanismo fisiológico e benéfico de aumento de função mitocondrial nestas células.

Contudo, não se pode descartar o possível efeito direto do inibidor FK506 sobre o canal de RyR. Sabe-se que este fármaco é capaz de induzir a dissociação de FKBP12 do receptor de RyR, aumentando a possibilidade de abertura deste e da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (THOMSON, BONHAM e ZEEVI, 1995; OZAWA, 2008). Desta forma, a queda acentuada de respiração mitocondrial observada nos miotúbulos no presente estudo pode ter sido causada por uma sobrecarga de cálcio no citosol, a qual pode afetar diretamente a funcionalidade mitocondrial, como já demonstrado em estudos prévios (DUCHEN, 2000; PENG e JOU, 2010).

FIGURA 13. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio - O₂): efeito da administração de isoproterenol e do pré tratamento com PKI, PTX e FK506 em miotúbulos de células C2C12. Consumo de oxigênio basal (A); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (B) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (C) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com inibidor de PKA, o peptídeo PKI (20 μ M) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol; consumo de oxigênio basal (D); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (E) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (F) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o inibidor de $G\alpha_i$, PTX (0,75 μ g/ml) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol; consumo de oxigênio basal (G); consumo de oxigênio na presença de oligomicina (H) e consumo de oxigênio máximo na presença do desacoplador FCCP (I) em miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com o inibidor de calcineurina, FK506 (5 μ M) por 30 minutos antes do tratamento com isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controlo, # vs. ISO; \$ vs. PKI; + vs. PTX e & vs. FK506.

5.1.5. Papel da ativação β -AR sobre a expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial em miotúbulos de células C2C12: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551.

Outro objetivo deste projeto foi investigar se a ativação β -AR modularia, não só a função, como também a dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética. Para isso, foram avaliadas as expressões de proteínas relacionadas à dinâmica mitocondrial após o tratamento com isoproterenol e/ou sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com o fármaco ICI 118,551 nos miotúbulos diferenciados de células C2C12.

Conforme mostra a FIGURA 14, o pré-tratamento com ICI, o tratamento com isoproterenol ou a associação de ambos não foram capazes de alterar significativamente a expressão proteica de Mfn1, Mfn2 ou OPA1 nos miotúbulos, proteínas conhecidas por participarem do processo de fusão mitocondrial. No entanto, a exposição dos miotúbulos ao isoproterenol aumentou a translocação de DRP1 para a fração enriquecida de mitocôndrias em 84% ($p=0,051$ – FIGURA 14D), sugerindo que o tratamento com isoproterenol pode induzir fissão mitocondrial nos miotúbulos. Por problemas metodológicos, não foi possível avaliar a morfologia mitocondrial por microscopia, a fim de, de fato, identificar se a dinâmica mitocondrial estaria alterada com a ativação β -AR nos miotúbulos. Os miotúbulos, logo no início da diferenciação, não se mantiveram aderidos à placa de cultura ou à lamínula utilizadas para a aquisição de imagens no microscópio confocal. Se solucionado o problema, será possível avaliar a morfologia mitocondrial dos miotúbulos tratados com isoproterenol.

Contudo, em um estudo piloto realizado durante este projeto, pôde-se observar que o tratamento com 1 μ M de isoproterenol em mioblastos por 30 minutos não alterou a morfologia mitocondrial avaliada por microscopia confocal a partir da marcação das mitocôndrias com *Mitotracker*, e que o tratamento com 10 μ M de isoproterenol pelo mesmo tempo diminuiu significativamente apenas o perímetro mitocondrial, um indicativo de fissão (FIGURA 15). Esses dados mostram que, ao menos em mioblastos de C2C12, o tratamento com isoproterenol não induziu mudanças significativas na morfologia mitocondrial, com uma tendência a um

possível aumento de fissão. No entanto, é preciso interpretar tais dados com cautela, pois como já discutido acima no tópico 5.1.3, os mioblastos possuem uma densidade e uma rede de mitocôndrias menor e menos complexa que os miotúbulos, podendo responder de forma diferente ao tratamento com isoproterenol, assim como foi observado nos dados de respiração mitocondrial.

Também é importante destacar que o bloqueio prévio dos receptores β_2 -AR com ICI não reduziu a translocação de DRP1 para a mitocôndria dos miotúbulos, o que pode indicar que o aumento da expressão de DRP1 na fração enriquecida de mitocôndrias após o tratamento com isoproterenol pode ter sido desencadeado, principalmente, pela ativação dos receptores β_1 -AR. Nesse sentido, dados ainda não publicados do laboratório do Professor Daniel Bernstein mostram que a ativação dos receptores β_1 -AR em células HL-1, uma linhagem de células de músculo cardíaco, promove a translocação de DRP1 para a mitocôndria, a qual é acompanhada de um aumento na função e na fissão mitocondrial.

Estes dados, em conjunto com os dados do presente projeto de doutorado, contradizem estudos da literatura que afirmam que a PKA fosforila o sítio de inibição Ser⁶³⁷ da DRP1, inibindo sua atividade, facilitando o processo de fusão mitocondrial, e aumentando a rede de conexão entre as mitocôndrias (CHANG e BLACKSTONE, 2007; CRIBBS e STRACK, 2007). Portanto, é possível que outros mecanismos ativados pelo estímulo simpático possam estar se sobrepondo ao efeito inibitório da PKA sobre a DRP1 nestas células. Nesse sentido, é conhecido que a fosfatase calcineurina é capaz de reverter a fosforilação de DRP1 no sítio de inibição Ser⁶³⁷, liberando a DRP1 para ser translocada para a mitocôndria (CRIBBS e STRACK, 2007; MISHRA e CHAN, 2016). Considerando que a ativação dos receptores β -AR possa aumentar a liberação de cálcio pela fosforilação por PKA do canal de RyR na musculatura esquelética (REIKEN et al., 2003), pode-se hipotetizar que a fosfatase calcineurina, a qual é ativada por cálcio, esteja colaborando para o aumento da translocação de DRP1 para a mitocôndria nos miotúbulos tratados com isoproterenol.

FIGURA 14. Expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial em miotúbulos de células C2C12 tratados com isoproterenol sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551. Expressão de Mfn1 (A); expressão de Mfn2 (B); expressão de OPA1 (C); e expressão de DRP1 (D) na fração mitocondrial de miotúbulos de células C2C12 tratados com o agonista β -AR não seletivo isoproterenol (1 μ M) por 30 minutos, ou tratados com ICI 118,551 (300 nM) por 30 minutos antes do tratamento com o agonista isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ desvio padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes.

FIGURA 15. Morfologia mitocondrial: efeito da administração de isoproterenol sobre mioblastos de células C2C12. Conteúdo mitocondrial (A); área das mitocôndrias (B); perímetro mitocondrial (C) e alongamento mitocondrial (D) de mioblastos de células C2C12 tratados com 1 μ M de isoproterenol, agonista β -AR não seletivo, por 30 minutos; e conteúdo mitocondrial (E); área das mitocôndrias (F); perímetro mitocondrial (G) e alongamento mitocondrial (H) de mioblastos de células C2C12 tratados com 10 μ M de isoproterenol, agonista β -AR não seletivo, por 30 minutos; e imagens representativas (escala – 10 μ m) de mioblastos de células C2C12 controles e tratados com 1 e 10 μ M de isoproterenol (I). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle.

Após a realização de todos os ensaios com mioblastos e miotúbulos de C2C12 descritos acima, pode-se concluir que a ativação β -AR promove aumento da função mitocondrial nestas células, mediada principalmente pelos receptores β_2 -AR e por sua via clássica, envolvendo o eixo $G\alpha_s$ – AMPc – PKA. No entanto, a partir dos dados apresentados até o momento, ainda não foi possível determinar se a ativação dos receptores β -AR modula a dinâmica mitocondrial em linhagem de células derivadas de músculo esquelético.

Portanto, considerando os resultados obtidos nos ensaios com células C2C12, o próximo passo deste estudo foi avaliar se a ativação dos receptores β_2 -AR na musculatura esquelética de camundongos seria capaz de promover aumento da função mitocondrial, assim como observado em mioblastos e miotúbulos. Além disso, outro passo importante desta nova etapa foi elucidar e melhor compreender a participação da ativação β_2 -AR na dinâmica mitocondrial no tecido muscular esquelético.

5.1.6. Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em fibras musculares isoladas de camundongos: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR.

Dando continuidade ao subprojeto 1, deu-se início à avaliação do papel dos receptores β_2 -AR sobre a função mitocondrial na musculatura esquelética de camundongos. Para isso, camundongos FVB foram pré-tratados com 10 mg/kg de ICI 118,551 via injeção intraperitoneal, e após 30 minutos os mesmos animais receberam uma única dose de isoproterenol (10 mg/kg). Após 30 minutos do tratamento com isoproterenol, os animais foram sacrificados, e o músculo tibial anterior foi extraído para o isolamento das fibras musculares e posterior análise do consumo de O_2 , como demonstra o desenho experimental no tópico de métodos (tópico 4, QUADRO 2). O uso do agonista β -AR isoproterenol nesta etapa do projeto foi importante para simular de forma farmacológica o estímulo simpático durante o exercício físico, discutido mais a frente no subprojeto 2, já que as catecolaminas liberadas na circulação durante a realização do exercício se ligam a ambos os subtipos de receptores, β_1 -AR e β_2 -ARs. É importante esclarecer que o tibial anterior foi escolhido neste estudo por ser um músculo com predominância do metabolismo

glicolítico, o qual parece responder muito melhor ao estímulo adrenérgico e à sessão de exercício, como já discutido no tópico 2.2 e demonstrado no tópico 4.

Como pode ser observado na FIGURA 16, o tratamento com isoproterenol foi capaz de aumentar significativamente a respiração mitocondrial do músculo esquelético no estado 2 (respiração basal, FIGURA 16A), no estado 3 (respiração máxima estimulada por ADP, FIGURA 16B), e na respiração máxima estimulada pelo desacoplador FCCP (FIGURA 16D). O pré-tratamento com o antagonista β_2 -AR ICI 118,511 foi capaz de reverter significativamente a respiração máxima mitocondrial aos níveis do controle, tanto no estado 3 (FIGURA 16B), como na respiração máxima estimulada por FCCP (FIGURA 16D), demonstrando que os receptores β_2 -ARs protagonizam o aumento da respiração mitocondrial máxima após a administração de isoproterenol, assim como já observado nos miotúbulos. Por outro lado, o pré-tratamento com ICI, associado ao tratamento com isoproterenol, não foi capaz de diminuir significativamente a respiração no estado 2 quando comparado ao grupo que somente recebeu isoproterenol, mas foi capaz de prevenir o aumento do consumo de oxigênio que havia sido encontrado em relação ao grupo Controle (FIGURA 16A). Não houve diferenças significativas em relação ao controle respiratório (FIGURA 16E), e na respiração mitocondrial no estado 4 (FIGURA 16C).

Estes dados coletados em fibras isoladas do músculo tibial anterior corroboram os dados de respiração mitocondrial encontrados nos mioblastos e miotúbulos tratados com isoproterenol, e reforçam a hipótese de que a ativação dos receptores β_2 -AR promove aumento da função mitocondrial na musculatura esquelética. De fato, como já discutido anteriormente, a ativação β -AR e a consequente ativação de sinalizadores da via adrenérgica, como AMPc e PKA, parecem modular a função mitocondrial, seja por fosforilação direta de complexos mitocondriais ou aumentando a produção de ATP pela ATP sintase (ROGNE e TASKEN, 2014; GARCIA-BERMUDEZ et al., 2015). Pode-se concluir, portanto, que o efeito da ativação β -AR sobre o aumento da respiração mitocondrial encontrado em linhagem de células também ocorre no tecido muscular esquelético.

No entanto, não se pode descartar que parte do efeito de aumento de função mitocondrial nas fibras musculares esqueléticas provenha de um aumento do fluxo sanguíneo e do aporte de nutrientes à musculatura esquelética, já que o

isoproterenol foi administrado aos animais via intraperitoneal e, como já bem conhecido, este é capaz de aumentar a função cardíaca agudamente e promover a liberação de substratos pelo fígado e pelo tecido adiposo para serem metabolizados no músculo esquelético (BRAVO, 1989; NONOGAKI, 2000).

FIGURA 16. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de isoproterenol e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Respiração mitocondrial no basal (A); respiração máxima na presença de ADP (B); respiração independente da produção de ATP (na presença de oligomicina) (C); respiração máxima na presença do desacoplador FCCP (D); e controle respiratório (estado 3/estado 4) (E) nas fibras musculares esqueléticas extraídas do tibial anterior de camundongos tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β -AR não seletivo isoproterenol (10 mg/kg) por 30 minutos, ou tratados com ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da administração do agonista isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle e # vs. ISO.

Além do tratamento com isoproterenol sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI, os animais também foram tratados com formoterol, agonista β_2 -AR seletivo. Camundongos FVB receberam uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (10

$\mu\text{g/kg}$ – escolhida com embasamento na literatura (RYALL, SILLENCE e LYNCH, 2006) e administrada via intraperitoneal. Os animais foram sacrificados após 30 minutos da administração de salina ou de formoterol, e o músculo tibial anterior foi extraído para a separação das fibras musculares e posterior análise do consumo de O_2 .

Corroborando os dados anteriores de animais tratados com isoproterenol, a administração de uma única dose de formoterol foi capaz de promover o aumento significativo da respiração mitocondrial no estado 3 (respiração máxima estimulada por ADP, FIGURA 17B), confirmando a importância dos receptores $\beta_2\text{-AR}$ no aumento da respiração mitocondrial máxima na musculatura esquelética. Em contrapartida, o tratamento com formoterol aumentou significativamente a respiração no estado 4 (após o bloqueio da ATP sintase com oligomicina, FIGURA 17C), efeito não encontrado nos animais tratados com isoproterenol, demonstrando que o agonista $\beta_2\text{-AR}$ pode aumentar o consumo de oxigênio não acoplado à produção de ATP.

Ainda em contraste com os dados obtidos pela administração de isoproterenol, o tratamento com formoterol não promoveu alterações no consumo de oxigênio pela mitocôndria no estado 2 (basal, FIGURA 17A), e não alterou a respiração máxima estimulada pelo desacoplador FCCP (FIGURA 17D). O controle respiratório também se manteve inalterado com o tratamento (FIGURA 17E). Vale ressaltar que o formoterol trata-se de um agonista $\beta_2\text{-AR}$ com viés de ligação para a via de β -arrestina (RAJAGOPAL et al., 2011) e, que por este motivo, seu efeito sobre o consumo de oxigênio mitocondrial pode ser atenuado quando comparado ao tratamento com isoproterenol.

Em conjunto, esses dados demonstram que a ativação dos receptores $\beta_2\text{-AR}$, tanto por meio do agonista $\beta\text{-AR}$ isoproterenol, quanto por meio do agonista $\beta_2\text{-AR}$ formoterol, é capaz de aumentar a respiração mitocondrial basal e máxima na musculatura esquelética de camundongos, corroborando os dados de células previamente discutidos.

FIGURA 17. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da administração de formoterol em camundongos. Respiração mitocondrial no basal (A); respiração máxima na presença de ADP (B); respiração independente da produção de ATP (na presença de oligomicina) (C); respiração máxima na presença do desacoplador FCCP (D); e controle respiratório (estado 3/estado 4) (E) nas fibras musculares esqueléticas extraídas do tibial anterior de camundongos tratados com salina, ou tratados com uma única dose do agonista β_2 -AR formoterol (10 μ g/kg) por 30 minutos. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle.

5.1.7. Papel da ativação β -AR sobre a dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética: efeito do agonista não seletivo β -AR isoproterenol associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551 sobre a morfologia mitocondrial e sobre a expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial em camundongos.

Outro objetivo deste projeto de pesquisa foi avaliar o efeito da ativação simpática, não só sobre a função, mas também sobre a morfologia e dinâmica mitocondriais. É conhecido que as mitocôndrias têm a capacidade de se fundir e também de se fissionar, sendo que esta dinâmica tem sido apontada pela literatura como um modulador essencial da homeostase mitocondrial (ZHANG et al., 2016), como já discutido no tópico 2.1.

Anteriormente à avaliação de qualquer expressão de proteínas responsáveis pela dinâmica mitocondrial, foram avaliados cortes de microscopia eletrônica do músculo tibial anterior dos camundongos tratados com isoproterenol, com ou sem bloqueio dos receptores β_2 -AR com o antagonista ICI 118,551, a fim de identificar possíveis mudanças na morfologia mitocondrial com este tratamento.

Curiosamente, a administração aguda de isoproterenol induziu um aumento significativo da área (FIGURA 18B e 19), do perímetro (FIGURA 18C e 19) e do alongamento mitocondriais (FIGURA 18D e 19), indicativos diretos de que a ativação β -AR foi capaz de promover fusão entre mitocôndrias no músculo tibial anterior. Estas mudanças morfológicas não foram acompanhadas de alteração significativa no número de mitocôndrias presentes neste tecido, embora tenha havido uma diminuição não estatística da média do número de mitocôndrias em relação ao grupo controle (FIGURA 18A e 19).

Quando os animais que receberam isoproterenol foram previamente tratados com o antagonista β_2 -AR, ICI 118,551, o aumento da área, do perímetro e do alongamento mitocôndrias observados na presença do agonista β -AR foi totalmente prevenido, demonstrando que a ativação dos receptores β_2 -AR é responsável por tais respostas (FIGURAS 18B, 18C, 18D e 19). Além disso, cabe ressaltar que o tratamento isolado com ICI 118,551 não induziu alterações morfológicas mitocondriais significativas.

FIGURA 18. Morfologia mitocondrial: efeito da administração de isoproterenol e do pré-tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Número de mitocôndrias por área total (A); área das mitocôndrias (B); perímetro mitocondrial (C); alongamento mitocondrial (D); e circularidade mitocondrial (E) do músculo tibial anterior de camundongos tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β -AR não seletivo isoproterenol (10 mg/kg) por 30 minutos, ou tratados com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da administração do agonista isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle e # vs. ISO.

FIGURA 19. Imagens representativas da morfologia mitocondrial no músculo tibial anterior após a administração de isoproterenol e do pré-tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Imagens representativas da morfologia mitocondrial analisada por microscopia eletrônica no músculo tibial anterior de camundongos tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β -AR não seletivo isoproterenol (10 mg/kg) por 30 minutos, ou tratados com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da administração do agonista isoproterenol.

A fusão mitocondrial promovida pela ativação dos receptores β -AR pode ser compreendida se levarmos em conta o fato de que o tratamento com isoproterenol, na dose utilizada, induziu um estresse fisiológico no organismo do animal, assim como ocorre em situações de luta e fuga, jejum e exercício físico. Assim, durante uma situação de estresse, a fusão pode promover a troca de proteínas, lipídeos e metabólitos entre mitocôndrias individuais, impulsionando o metabolismo energético e atenuando dessa forma os prejuízos de mitocôndrias disfuncionais (ZHANG et al., 2016). Além disso, é possível que a necessidade súbita de energia seja a razão para a formação de redes mitocondriais fusionadas durante situações de estresse e jejum, onde, envolvendo todos os compartimentos mitocondriais na respiração, a fusão poderia maximizar a síntese de ATP (WESTERMANN, 2012). Em contraste, mitocôndrias fragmentadas seriam frequentemente encontradas em células em repouso, quando a alta atividade respiratória não é necessária, contribuindo para a manutenção da capacidade bioenergética por meio da eliminação, por autofagia, de mitocôndrias irreversivelmente danificadas (WESTERMANN, 2012). De fato, elevados níveis de AMPc podem inibir a fissão mitocondrial, promovendo o alongamento das mitocôndrias e aumentando, dessa maneira, a viabilidade celular, como ocorre sob jejum e aumento de autofagia (GOMES, DI BENEDETTO e SCORRANO, 2011).

No entanto, o mecanismo pelo qual a ativação simpática, via receptores β_2 -AR, pode modular a dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética ainda não é totalmente compreendido. Portanto, na tentativa de elucidar tal questão, foram analisadas as expressões das proteínas conhecidas por participarem diretamente da modulação da dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética dos animais tratados com isoproterenol sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR.

Como pode ser observado na FIGURA 20A, o tratamento com isoproterenol aumentou significativamente a expressão da proteína Mfn1 no músculo tibial anterior em relação ao grupo controle. A FIGURA 20A também mostra que o bloqueio dos receptores β_2 -AR com o antagonista ICI 118,551, antecedendo a administração de isoproterenol, não levou à redução significativa da expressão de Mfn1 em relação ao grupo ISO, mas foi capaz de prevenir o aumento da expressão de Mfn1 em relação

ao grupo controle, demonstrando que os receptores β_2 -AR colaboram parcialmente para tal resposta.

Por outro lado, o tratamento com o agonista β_2 -AR isoproterenol, isolado ou associado ao antagonista β_2 -AR ICI 118,551, não promoveu mudanças estatisticamente significantes na expressão das proteínas de fusão mitocondrial Mfn2 e OPA1 (FIGURAS 20B e 20C, respectivamente), embora esteja evidente que a média de expressão no grupo isoproterenol desta última tenha tido um aumento importante em relação ao grupo controle. Em relação às proteínas de fissão mitocondrial, o tratamento com isoproterenol também não alterou a expressão de Fis1 (FIGURA 20D), e não alcançou poder estatístico para demonstrar a translocação de DRP1 para a fração enriquecida de mitocôndrias no músculo tibial anterior (FIGURA 20E), apesar de haver, assim como observado para a Mfn2, um aumento da média de expressão dessa proteína com o tratamento de isoproterenol quando comparada ao grupo controle.

FIGURA 20. Expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética de camundongos tratados com isoproterenol sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551. Expressão de Mfn1 (A), Mfn2 (B), OPA1 (C) e Fis1 (D) no lisado total do músculo tibial anterior; e expressão de DRP1 (E) na fração mitocondrial extraída de toda a musculatura de uma única pata de camundongos tratados com salina, de camundongos tratados com uma única dose do agonista β -AR não seletivo isoproterenol (10 mg/kg) por 30 minutos, ou tratados com ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da administração do agonista isoproterenol. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo *vs. Controle.

O aumento da expressão de Mfn1 no tibial anterior dos animais tratados com isoproterenol pode explicar, em parte, o aumento da fusão mitocondrial encontrada neste tecido como visto anteriormente, já que o fator de transcrição CREB (ativado por AMPc) é conhecido por aumentar a expressão das mitofusinas via PGC-1 α (HERZIG et al., 2001; SEBASTIAN et al., 2012). No entanto, devido ao tempo de tratamento com o isoproterenol (30 minutos), este aumento da expressão proteica de Mfn1 provavelmente não significa um aumento de tradução desta proteína, e sim uma diminuição de sua degradação. Sendo menos degradada, ela poderia colaborar mais ativamente para o processo de fusão mitocondrial. Nesse sentido, há indícios de que a Mfn1 e Mfn2 podem ser ubiquitinadas e de que a inibição do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma aumenta a expressão destas mitofusinas (KARBOWSKI et al., 2006). Contudo, seria necessário avaliar também se o tratamento com isoproterenol modula a atividade da GTPase de Mfn1, pois esta atividade é crucial para que a fusão mitocondrial ocorra (LIESA, PALACIN e ZORZANO, 2009).

Além da atividade de Mfn1, também seria importante saber se o tratamento com isoproterenol seria capaz de alterar a atividade de Mfn2, uma vez que a expressão desta última não foi alterada significativamente com o tratamento. Sabe-se que a PKA pode modular a atividade de Mfn2, fosforilando e ativando o sítio serina 422, responsável pela supressão do crescimento celular. No entanto, este efeito sobre o crescimento celular é independente da função de Mfn2 sobre a morfologia mitocondrial (ZHOU et al., 2010) e, portanto, ainda não há estudos demonstrando se a PKA pode modular diretamente a função de Mfn2 sobre a dinâmica mitocondrial.

Ainda sobre as mitofusinas, o músculo esquelético é o tecido que possui a maior razão Mfn2/Mfn1, embora ambas as proteínas sejam expressas neste tecido (SANTEL et al., 2003). Entretanto, no presente estudo foi observado que a ativação β -AR modulou significativamente apenas a expressão de Mfn1 no músculo tibial anterior, não apresentando diferenças estatísticas para a expressão de Mfn2. Nesse sentido, EISNER, LENAERS e HAJNOCZKY (2014) demonstraram que a fusão mitocondrial é um processo que acontece regularmente na musculatura esquelética, e que apenas o silenciamento de Mfn1, e não o de Mfn2, diminui a taxa de fusão

mitocondrial em fibras isoladas da musculatura esquelética de ratos (EISNER, LENAERS e HAJNOCZKY, 2014), sugerindo que a Mfn1 possui maior relevância na modulação da fusão mitocondrial no músculo esquelético quando comparada à Mfn2, mesmo sendo sua expressão menor em relação a esta última neste tecido. Além disso, foi demonstrado que ambas as proteínas Mfn1 e Mfn2 são necessárias para a conexão longitudinal entre mitocôndrias em fibras musculares do tipo IIA, e que a expressão de qualquer uma delas, na ausência da outra, é suficiente para manter a morfologia da organela (MISHRA et al., 2015).

Outro mecanismo pelo qual a ativação β -AR poderia colaborar para o aumento da fusão mitocondrial na musculatura esquelética seria via OPA1, proteína conhecida por interagir com as mitofusinas e promover a fusão mitocondrial (LIESA, PALACIN e ZORZANO, 2009). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na expressão de OPA1 no tratamento com isoproterenol, associado ou não ao bloqueio dos receptores β_2 -AR, como já descrito acima. No entanto, sabe-se que a PKA pode se ligar a OPA1 com o auxílio de AKAPs, modulando sua atividade e favorecendo a fusão mitocondrial (PIDOUX et al., 2011; ROGNE e TASKEN, 2014).

Por fim, como já mencionado no tópico 5.1.5, a ativação dos receptores β -AR também pode colaborar para a indução da fusão mitocondrial bloqueando a fissão, por meio da fosforilação de DRP1 na Ser⁶³⁷ (sítio de inibição), inibindo sua atividade e sua translocação para a mitocôndria (CHANG e BLACKSTONE, 2007; CRIBBS e STRACK, 2007). Contudo, os dados do presente estudo não apresentaram diferenças significativas na translocação de DRP1 para a mitocôndria com a ativação β -AR.

Dessa forma, a partir dos dados apresentados acima, pode-se concluir que a ativação simpática por meio dos receptores β_2 -AR promove o alongamento e a fusão de mitocôndrias na musculatura esquelética de camundongos, sendo que a proteína Mfn1 parece estar envolvida nesta resposta. Entretanto, ainda não está claro por qual mecanismo essa mudança na morfologia mitocondrial acontece, sendo necessárias análises adicionais, a fim de se estabelecer uma relação de causa e efeito entre os mecanismos de ativação simpática e a fusão mitocondrial.

Portanto, depois de finalizados os ensaios do subprojeto 1, e após evidências de que a ativação dos receptores β_2 -AR modula tanto a função, quanto a morfologia mitocondriais na musculatura esquelética, deu-se início à avaliação da participação da ativação simpática sobre as respostas mitocondriais após uma sessão de EFA.

5.2. Subprojeto 2

O subprojeto 2 teve como objetivo principal avaliar a participação dos receptores β_2 -ARs na função e na dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética após uma única sessão de EFA. A partir dos dados apresentados no subprojeto 1, pode-se concluir que a ativação simpática via receptor β_2 -AR aumenta a função mitocondrial e modula, em favor da fusão, a morfologia/dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética. Portanto, considerando que a ativação simpática aumenta significativamente durante a realização do exercício físico, sugere-se que os receptores β_2 -AR colaborem para as respostas/adaptações mitocondriais na musculatura esquelética após a realização de uma sessão de EFA.

5.2.1. Papel da ativação β -AR sobre a respiração mitocondrial em fibras musculares isoladas de camundongos: efeito de uma sessão de exercício aeróbico associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551.

Para avaliar o papel da ativação β_2 -AR sobre a função mitocondrial pós-exercício, camundongos FVB foram submetidos à realização de uma sessão de EFA, segundo protocolo descrito anteriormente (tópico 4, QUADRO 3), sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com o antagonista ICI 118,551. Imediatamente após a sessão de exercício físico, os animais foram sacrificados, e o músculo tibial anterior foi extraído para o isolamento das fibras musculares e a realização da análise do consumo de oxigênio.

Neste estudo, optou-se por avaliar os parâmetros mitocondriais imediatamente após a realização da sessão de EFA, baseando-se em estudo piloto prévio onde foi avaliada a translocação de PKA para a fração enriquecida de mitocôndrias em um curso temporal pós-exercício, como já demonstrado e discutido na seção de métodos, no tópico 4.

A FIGURA 21B demonstra que a sessão de EFA aumentou significativamente a respiração mitocondrial máxima estimulada por ADP (estado 3) nas fibras musculares do músculo tibial anterior, e o bloqueio dos receptores β_2 -AR com o antagonista ICI 118,551 foi capaz de prevenir esse aumento em relação ao grupo exercitado. Consequentemente, o controle respiratório das fibras musculares também foi aumentado de forma significativa com a sessão de EFA, enquanto o pré-tratamento com o antagonista β_2 -AR ICI 118,551 associado ao EFA preveniu significativamente esse aumento do controle respiratório (FIGURA 21E).

Contudo, como mostram as FIGURAS 21A, 21C e 21D, respectivamente, a respiração basal (estado 2), o consumo de oxigênio não dependente de ATP (estado 4) e a respiração máxima induzida por FCCP não foram alterados com a sessão de EFA, e o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551 não modulou o consumo de oxigênio nestes estados respiratórios. Além disso, o tratamento com ICI 118,551 isolado também não foi capaz de alterar o consumo de oxigênio em nenhum dos estados respiratórios analisados.

FIGURA 21. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio): efeito da realização de uma sessão de exercício aeróbico e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Respiração mitocondrial no basal (A); respiração máxima na presença de ADP (B); respiração independente da produção de ATP (na presença de oligomicina) (C); e respiração máxima na presença do desacoplador FCCP (D) nas fibras musculares esqueléticas extraídas do tibial anterior de camundongos não exercitados (Controle) e de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício físico aeróbico. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle e # vs. ISO.

Embora existam alguns estudos na literatura que tenham avaliado os efeitos agudos do EFA sobre a função mitocondrial na musculatura esquelética, ainda não

há um consenso a respeito do real efeito deste estímulo fisiológico sobre o consumo de oxigênio pela mitocôndria. Nesse sentido, MADSEN et al. (1996) demonstraram que uma única sessão de EFA em cicloergômetro a 75% VO_{2max} até a exaustão foi capaz de aumentar o consumo máximo de oxigênio e o controle respiratório em mitocôndrias isoladas de biópsias realizadas no músculo vasto lateral de homens adultos (MADSEN et al., 1996). Da mesma forma, TONKONOGI, HARRIS e SAHLIN (1998) demonstraram que a realização de uma sessão de EFA, seguindo o mesmo protocolo de exercício físico utilizado no estudo anterior, aumentou a taxa de respiração mitocondrial basal e máxima em fibras isoladas do músculo vasto lateral de humanos (TONKONOGI, HARRIS e SAHLIN, 1998). Em outro estudo também realizado com humanos, TONKONOGI et al. (1999) demonstraram, em fibras isoladas a partir de biópsias de vasto lateral, que a respiração mitocondrial máxima aumenta significativamente após a realização de uma sessão de exercício físico intervalado de alta intensidade (130% VO_{2max}) em cicloergômetro até a exaustão (TONKONOGI et al., 1999).

Por outro lado, em um protocolo de exercício físico realizado a 70% do VO_{2max} por 75 minutos em cicloergômetro, a respiração máxima não foi alterada na fração mitocondrial extraída de biópsia do músculo quadríceps imediatamente após a sessão de exercício (FERNSTROM, TONKONOGI e SAHLIN, 2004). Da mesma maneira, JIANG et al. (2009) observaram que o consumo máximo de oxigênio não foi alterado na fração mitocondrial do músculo gastrocnêmio de ratos após 45, 90, 120 ou 150 minutos de EFA realizado em esteira rolante (JIANG et al., 2009).

A partir disso, verifica-se que os dados do presente estudo corroboram alguns dados da literatura que mostram o aumento da função mitocondrial máxima pós-EFA na musculatura esquelética. Esse aumento de função mitocondrial em fibras musculares isoladas do tibial anterior imediatamente após a sessão de EFA parece ser parcialmente dependente da ativação simpática via receptores β_2 -AR, como visto anteriormente.

Nesse sentido, a literatura mostra que o bloqueio de receptores β -AR por meio de betabloqueadores durante a realização de EFA pode promover a diminuição de desempenho após sessões agudas e também prejudicar respostas metabólicas e o aumento de enzimas importantes do metabolismo oxidativo após uma única

sessão de exercício ou após treinamento físico, como já mencionado anteriormente (BARENTHIN e SMEDBY, 1979; HARRI, 1980; KAISER, ROSSNER e KARLSSON, 1981; JUHLIN-DANNFELT, 1982; SABLE et al., 1982; SVEDENHAG, HENRIKSSON e JUHLIN-DANNFELT, 1984; JI et al., 1986).

Além disso, KAISER, ROSSNER e KARLSSON (1981) demonstraram que o bloqueio simpático promove efeitos prejudiciais sobre o desempenho da musculatura esquelética durante o EFA, e que os mesmos não são totalmente dependentes dos efeitos hemodinâmicos do bloqueio dos receptores β_1 -AR no coração, uma vez que a administração de propanolol (betabloqueador não seletivo) promoveu diminuição do desempenho de homens fisicamente ativos em testes de potência e força muscular e em testes de capacidade aeróbia, enquanto que a administração de atenolol (betabloqueador seletivo para receptores β_1 -AR) diminuiu o desempenho nos mesmos testes físicos, porém em menores proporções (KAISER, ROSSNER e KARLSSON, 1981).

Assim, o presente estudo demonstra, pela primeira vez, a importante participação dos receptores β_2 -AR sobre o aumento da função mitocondrial máxima após uma sessão de EFA na musculatura esquelética. Considerando a abrangente utilização de betabloqueadores como terapia em doenças cardiovasculares, onde o EFA é utilizado como tratamento adjuvante, os dados evidenciam a relevância de se preservar a ativação destes receptores na musculatura esquelética.

5.2.2 Papel da ativação β -AR sobre a dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética: efeito de uma sessão de exercício aeróbico associado ao bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551 sobre a morfologia mitocondrial e sobre a expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial em camundongos.

A partir dos dados apresentados até aqui, conclui-se que a ativação dos receptores β_2 -AR, além de modular a função mitocondrial por estímulos farmacológico ou fisiológico, também pode promover mudanças na morfologia mitocondrial por meio do fármaco isoproterenol. Dessa forma, outro objetivo deste subprojeto 2 foi avaliar o efeito do bloqueio dos receptores β_2 -AR durante o EFA sobre a morfologia e dinâmica mitocondriais. Seria uma única sessão de exercício

físico capaz de modular a morfologia mitocondrial? Se sim, a atividade simpática, mediada pelos receptores β_2 -AR, teria participação neste processo? A fim de responder a estas perguntas, foram avaliados cortes de microscopia eletrônica do músculo tibial anterior de camundongos controle e exercitados com ou sem o bloqueio dos receptores β_2 -AR com o antagonista ICI 118,551.

Os dados demonstram que a sessão de EFA promoveu aumento significativo da área (FIGURA 22B e 23), do perímetro (FIGURA 22C e 23) e do alongamento mitocondriais (FIGURA 22D e 23), indicando que o exercício foi capaz de induzir fusão mitocondrial no músculo tibial anterior, assim como observado no tratamento com isoproterenol. No entanto, ao contrário do observado com a administração de isoproterenol, o exercício físico diminuiu significativamente a circularidade mitocondrial (FIGURA 22E e 23), reforçando o fato de que as mitocôndrias adquiriram formato mais alongado com a realização do EFA. A FIGURA 22A mostra que tais mudanças morfológicas não foram acompanhadas de alteração estatisticamente significativa no número de mitocôndrias presentes no grupo exercitado, embora a média do número mitocondrial deste grupo tenha sido menor.

Quando os animais exercitados foram pré-tratados com o antagonista β_2 -AR, ICI 118,551, o aumento do perímetro e do alongamento mitocondrial observado com o EFA foi parcialmente prevenido ($p=0,056$ para o perímetro, FIGURA 22C, e $p=0,054$ para o alongamento, FIGURA 22D, comparando o grupo Exercitado + ICI com o grupo Exercitado + Veículo). Além disso, o bloqueio dos receptores β_2 -AR associado ao EFA não aumentou a circularidade das mitocôndrias, mas preveniu a queda da circularidade mitocondrial promovida pela sessão de EFA em relação ao grupo controle. Da mesma forma, embora não tenha havido uma queda estatisticamente significativa do número de mitocôndrias com o exercício físico, a associação deste com o bloqueio dos receptores β_2 -AR induziu um aumento significativo do número mitocondrial em relação ao grupo Exercitado, o que fez com que a média do número de mitocôndrias do grupo Exercitado + ICI atingisse os níveis do grupo controle (FIGURA 22A).

Com base no exposto, pode-se concluir que a ativação dos receptores β_2 -AR participa dessa mudança na morfologia mitocondrial do músculo tibial anterior a partir da realização de uma sessão de EFA. No entanto, tais respostas

provavelmente não são completamente dependentes da ativação β_2 -AR, já que o bloqueio com ICI 118,551 não foi suficiente para prevenir totalmente as adaptações morfológicas, como foi observado no tratamento com isoproterenol. É possível que outras vias de sinalização desencadeadas pelo exercício físico, além da via dependente da ativação simpática, também estejam atuando no aumento da fusão mitocondrial encontrada na musculatura esquelética. Contudo, como será discutido mais a frente, ainda não há um consenso na literatura sobre como o exercício físico modula a dinâmica mitocondrial (DRAKE, WILSON e YAN, 2016).

FIGURA 22. Morfologia mitocondrial do músculo tibial anterior: efeito de uma sessão de exercício aeróbico e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Número de mitocôndrias por área total (A); área das mitocôndrias (B); perímetro mitocondrial (C); alongamento mitocondrial (D); e circularidade mitocondrial (E) do músculo tibial anterior de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício. Os dados estão representados na forma de média ± erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle, # vs. ISO e \$ vs. ICI.

FIGURA 23. Imagens representativas da morfologia mitocondrial no músculo tibial anterior após uma sessão de exercício aeróbico e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Imagens representativas da morfologia mitocondrial analisada por microscopia eletrônica no músculo tibial anterior de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício físico.

Como mencionado acima, os eventos de fusão e fissão mitocondrial na musculatura esquelética em resposta ao EFA ainda não são bem compreendidos. Sabe-se que a fusão mitocondrial é dominante em células ativas, e que ela permite a troca de enzimas, metabólitos e genes através do retículo mitocondrial, o que durante o exercício físico seria vantajoso devido à alta demanda metabólica e ao aumento da probabilidade de dano de mitocôndrias (WESTERMANN, 2012; ZHANG et al., 2016). Além disso, a indução de fusão mitocondrial pelo exercício físico na musculatura esquelética pode basear-se na hipótese de que a fusão poderia promover, por meio de filamentos mitocondriais, um equilíbrio do potencial de membrana entre áreas ricas em oxigênio e áreas mais remotas, com baixa oxigenação, favorecendo o aumento da síntese de ATP nestas áreas, o que seria uma estratégia interessante para o músculo esquelético devido à alta demanda energética imposta pelo exercício físico (SKULACHEV, 2001; DRAKE, WILSON e YAN, 2016).

No entanto, esse aumento de fusão mitocondrial pós-exercício encontrado no presente estudo contraria os dados publicados no único trabalho da literatura que avaliou os efeitos de uma sessão aguda de EFA sobre a morfologia mitocondrial na musculatura esquelética pelo método de microscopia eletrônica (PICARD et al., 2013). PICARD et al. (2013) demonstraram no músculo sóleo de camundongos que 3 horas de exercício físico voluntário em rodas de corrida aumentou apenas a expansão das mitocôndrias pelas linhas Z e a proporção de sítios de contato entre membranas de mitocôndrias adjacentes, indicando que o exercício aumentou a interação entre essas mitocôndrias, mas sem a indução de fusão. Além disso, este estudo também demonstrou que o exercício físico não promoveu alterações significativas em outros parâmetros morfológicos como área, perímetro e circularidade mitocondriais (PICARD et al., 2013).

Esta divergência de resposta pode ser explicada pela diferença no protocolo de exercício físico utilizado e também pelo músculo avaliado. No presente estudo, foi avaliada a morfologia mitocondrial do músculo tibial anterior, músculo com metabolismo glicolítico predominante, ao passo que o estudo citado acima avaliou o músculo sóleo, com metabolismo predominantemente oxidativo.

Como já discutido anteriormente, músculos esqueléticos oxidativos parecem não responder de maneira significativa a estímulos adrenérgicos e ao EFA quando comparados a músculos com características mais glicolíticas e, por este motivo, optou-se por estudar somente o músculo tibial anterior neste projeto de doutorado. No entanto, neste estudo também foi avaliada a morfologia mitocondrial do músculo sóleo após a realização da sessão aguda de EFA.

Como pode ser observado nas FIGURAS 24 e 25, a mesma sessão de EFA que induziu aumento da fusão mitocondrial no músculo tibial anterior não promoveu alterações significativas da morfologia mitocondrial no músculo sóleo, corroborando os achados do estudo citado acima, no qual foi avaliado o efeito do EFA na morfologia mitocondrial neste mesmo músculo (PICARD et al., 2013). Estes dados confirmam a nossa hipótese de que as mitocôndrias de músculos glicolíticos são mais responsivas ao EFA do que mitocôndrias de músculos oxidativos.

FIGURA 24. Morfologia mitocondrial do músculo sóleo: efeito de uma sessão de exercício aeróbico em camundongos. Número de mitocôndrias por área total (A); área das mitocôndrias (B); perímetro mitocondrial (C); alongamento mitocondrial (D); e circularidade mitocondrial (E) do músculo tibial anterior de camundongos tratados com salina, de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado). Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo $p < 0,05$ como significância.

FIGURA 25. Imagens representativas da morfologia mitocondrial muscular no músculo sóleo após uma sessão de exercício aeróbico e do pré tratamento com ICI 118,551 em camundongos. Imagens representativas da morfologia mitocondrial analisada por microscopia eletrônica no músculo sóleo de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício físico.

Após ser observado que a sessão de EFA promoveu aumento de fusão mitocondrial no músculo tibial anterior, e que parte desta resposta é dependente da ativação simpática via receptores β_2 -AR, a expressão das proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial foi avaliada nos grupos estudados.

Como pode ser observado na FIGURA 26A, a sessão de EFA, assim como o tratamento com isoproterenol, aumentou significativamente a expressão da proteína Mfn1 no músculo tibial anterior. No entanto, o bloqueio dos receptores β_2 -AR com o antagonista ICI 118,551 antes da sessão de EFA não preveniu o aumento da expressão de Mfn1 em relação ao grupo exercitado, sugerindo que os receptores β_2 -AR, embora estejam colaborando para a fusão mitocondrial induzida pelo EFA, não

são responsáveis pelo aumento da expressão de Mfn1 no músculo tibial anterior do grupo exercitado.

Além disso, o EFA, associado ou não ao tratamento com o antagonista β_2 -AR ICI 118,551, não promoveu mudanças significativas na expressão das proteínas de fusão mitocondrial Mfn2 e OPA1, e também não alterou a expressão da proteína de fissão mitocondrial Fis1 (FIGURAS 26B, 26C e 26D, respectivamente). Da mesma maneira, a realização do EFA não alterou de forma estatisticamente significativa a translocação de DRP1 (proteína de fissão mitocondrial) para a mitocôndria do músculo tibial anterior (FIGURA 26E), apesar de haver, assim como observado com isoproterenol, um aumento da média de expressão dessa proteína pós-exercício quando comparada ao grupo controle.

FIGURA 26. Expressão de proteínas associadas à dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética de camundongos exercitados sob o bloqueio dos receptores β_2 -AR com ICI 118,551. Expressão de Mfn1 (A), Mfn2 (B), OPA1 (C) e Fis1 (D) no lisado total do músculo tibial anterior; e expressão de DRP1 (E) na fração mitocondrial extraída de toda a musculatura de uma única pata de camundongos submetidos a uma sessão de exercício físico aeróbico a 80% da velocidade máxima atingida no teste incremental máximo em esteira rolante, com inclinação de 5°, por 60 minutos (Exercitado), tratados com salina ou com uma única dose de ICI 118,551 (10 mg/kg) por 30 minutos antes da realização da sessão de exercício. Os dados estão representados na forma de média $\pm$ erro padrão da média, assumindo valores de $p < 0,05$ como significantes, sendo * vs. Controle e \$ vs. ICI.

O aumento significativo da expressão de Mfn1 pós-exercício pode explicar, em parte, o aumento da fusão mitocondrial encontrada no músculo tibial anterior no grupo exercitado. No entanto, este dado contraria os poucos estudos que avaliaram a expressão proteica ou gênica de Mfn1 pós-exercício físico aeróbico na musculatura esquelética, e que observaram ausência de mudança ou diminuição das expressões gênica e proteica da mesma imediatamente após a sessão de exercício físico (CARTONI et al., 2005; DING et al., 2010).

Dessa forma, DING et al. (2010) submeteram ratos a uma única sessão de EFA, iniciado a uma intensidade de 53% do VO_2 máx, a qual foi aumentada aos 15 minutos de exercício para 64% do VO_2 máx, e para 76% do VO_2 máx aos 30 minutos, intensidade na qual então permaneceram em exercício físico por até 150 minutos. Os animais foram sacrificados aos 45, 90, 120 e 150 minutos de exercício. A partir deste protocolo, os autores identificaram que a expressão proteica de Mfn1 foi significativamente reduzida na musculatura esquelética após 90 minutos de exercício em relação ao grupo repouso, e que esta expressão se manteve diminuída mesmo 24 horas após o término da sessão de exercício. Em relação à expressão gênica, os autores também observaram uma queda da expressão de RNAm de Mfn1 na musculatura esquelética após 45 minutos de exercício. No entanto, 3 horas após o término da sessão a expressão gênica de Mfn1 aumentou significativamente em relação ao grupo controle, e permaneceu aumentada após 24 horas do término do exercício, sugerindo uma resposta compensatória (DING et al., 2010).

Neste mesmo estudo de DING et al. (2010) foram avaliados a expressão gênica de Mfn2 e as expressões gênica e proteica de Fis1 na musculatura esquelética após a sessão de EFA. Assim como a Mfn1, a expressão gênica de Mfn2 foi reduzida na musculatura esquelética após 45 minutos de exercício físico, sendo que o aumento compensatório ocorreu somente após 12 horas do término da sessão de exercício físico. Em relação à Fis1, houve um aumento da expressão proteica na musculatura esquelética apenas aos 120 minutos de exercício físico, enquanto a expressão gênica aumentou já em 45 minutos do início da sessão. Ambas as expressões gênica e proteica de Fis1 se mantiveram aumentadas na musculatura esquelética até 24 horas após o término do exercício.

CARTONI et al. (2005) também observaram um aumento compensatório da expressão gênica de Mfn1 e Mfn2 no vasto lateral de humanos, 24 horas após a uma sessão de EFA, onde os sujeitos pedalarão por 10 quilômetros. No entanto, os autores não observaram aumento nos níveis de RNAm de Mfn1 e Mfn2 imediatamente após a realização do exercício físico (CARTONI et al., 2005).

Por fim, PAGANO et al. (2014) não observaram diferenças na expressão proteica de Mfn2, OPA1 e DRP1 no músculo sóleo de camundongos C57BL/6 imediatamente após uma sessão de EFA realizado em esteira rolante até a exaustão. No entanto, a expressão de DRP1 fosforilada na Ser616, sítio de ativação da mesma, foi aumentada significativamente após a sessão de EFA, sugerindo aumento de sua atividade e da fissão mitocondrial induzida pelo exercício físico neste músculo (PAGANO et al., 2014).

Portanto, como é possível notar, poucos são os estudos da literatura que investigaram os mecanismos relacionados à dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética em resposta a uma sessão de EFA. Além disso, as diferenças metodológicas encontradas entre os estudos, como protocolo de exercício físico utilizado, músculo esquelético analisado e os modelos experimentais utilizados (ratos, camundongos e seres humanos), fazem com que seja impossível concluir algo sobre os efeitos do EFA na sinalização celular associada à dinâmica mitocondrial na musculatura esquelética. Assim, mais estudos são necessários a fim de se elucidar os mecanismos pelos quais o EFA modula a morfologia e dinâmica mitocondriais em músculos esqueléticos com diferentes características metabólicas.

No presente estudo, foi observado que uma única sessão de EFA, realizado por 60 minutos a 80% da $V_{m\acute{a}x}$, é capaz de induzir fusão mitocondrial no músculo tibial anterior de camundongos, sendo que o bloqueio dos receptores β_2 -AR durante a realização do exercício físico previne parcialmente esta resposta. Além disso, a proteína Mfn1 parece estar envolvida neste processo de fusão mitocondrial induzida pelo EFA, independentemente da ativação β_2 -AR. Nesse sentido, como discutido no tópico 5.1.7, a ativação simpática via receptores β -AR pode modular diretamente a atividade de proteínas envolvidas com a dinâmica mitocondrial, diminuindo a translocação de DRP1 para a mitocôndria, ou aumentando a função de OPA1, por exemplo (LIESA, PALACIN e ZORZANO, 2009; ROGNE e TASKEN, 2014). Dessa

forma, também seria importante avaliar a atividade destas proteínas, na tentativa de melhor compreender o mecanismo pelo qual os receptores β_2 -AR modulam a resposta de fusão mitocondrial induzida pelo EFA na musculatura esquelética.

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados sugerem que a ativação simpática por meio dos receptores β_2 -AR é capaz de modular a função e a dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética, seja via fármacos agonistas, ou induzida pelo estímulo fisiológico de uma sessão de EFA. Além disso, é possível que a via de sinalização clássica dos receptores β_2 -AR contribua para as respostas de função mitocondrial encontradas, principalmente por meio da quinase PKA, e que a proteína de fusão Mfn1 tenha participação na morfologia das mitocôndrias após a ativação β -AR e após a sessão de EFA. Desta forma, pode-se concluir que os receptores β_2 -AR possuem papel importante no metabolismo muscular esquelético, uma vez que são capazes de modular a função e morfologia mitocondriais pós-exercício e após estímulos farmacológicos neste tecido.

7. PERSPECTIVAS

Uma compreensão aprofundada sobre a relação causa-efeito entre estes receptores e as alterações mitocondriais na musculatura esquelética será de extrema importância para a descoberta de novos mecanismos relacionados ao aumento da capacidade oxidativa induzida pelo EFA, podendo auxiliar no desenvolvimento de intervenções farmacológicas ou de terapia gênica que visem otimizar a funcionalidade mitocondrial e/ou maximizar os efeitos do exercício físico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIN-PEREZ, R., SALAZAR, E., KAMENETSKY, M., BUCK, J., LEVIN, L. R. e MANFREDI, G. **Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation.** *Cell Metab* 9(3): 265-276. 2009
- AGRAWAL, S., THAKUR, P. e KATOCH, S. S. **Beta adrenoceptor agonists, clenbuterol, and isoproterenol retard denervation atrophy in rat gastrocnemius muscle: use of 3-methylhistidine as a marker of myofibrillar degeneration.** *Jpn J Physiol* 53(3): 229-237. 2003
- AHLQUIST, R. P. **A study of the adrenotropic receptors.** *Am J Physiol* 153(3): 586-600. 1948
- ANDERSON, E. J., LUSTIG, M. E., BOYLE, K. E., WOODLIEF, T. L., KANE, D. A., LIN, C. T., PRICE, J. W., 3RD, KANG, L., RABINOVITCH, P. S., SZETO, H. H., HOUMARD, J. A., CORTRIGHT, R. N., WASSERMAN, D. H. e NEUFER, P. D. **Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans.** *J Clin Invest* 119(3): 573-581. 2009
- ANDERSON, G. P., LINDEN, A. e RABE, K. F. **Why are long-acting beta-adrenoceptor agonists long-acting?** *Eur Respir J* 7(3): 569-578. 1994
- ANDREUX, P. A., HOUTKOOPE, R. H. e AUWERX, J. **Pharmacological approaches to restore mitochondrial function.** *Nat Rev Drug Discov* 12(6): 465-483. 2013
- ARANY, Z. **PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease.** *Curr Opin Genet Dev* 18(5): 426-434. 2008
- BAAR, K., WENDE, A. R., JONES, T. E., MARISON, M., NOLTE, L. A., CHEN, M., KELLY, D. P. e HOLLOSZY, J. O. **Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1.** *FASEB J* 16(14): 1879-1886. 2002
- BARENTHIN, I. e SMEDBY, B. **A two-wave interview study of frequency of dental visits and dental complaints.** *Community Dent Oral Epidemiol* 7(3): 128-132. 1979
- BERNSTEIN, D. e CRANE, C. **Comparative circulatory effects of isoproterenol and dopamine in lambs with experimental cyanotic heart disease.** *Pediatr Res* 29(4 Pt 1): 323-328. 1991
- BRAVO, E. L. **Metabolic factors and the sympathetic nervous system.** *Am J Hypertens* 2(12 Pt 2): 339S-344S. 1989
- BROOKS, W. W. e CONRAD, C. H. **Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates.** *Comp Med* 59(4): 339-343. 2009
- BURNISTON, J. G., TAN, L. B. e GOLDSPINK, D. F. **Relative myotoxic and haemodynamic effects of the beta-agonists fenoterol and clenbuterol measured in conscious unrestrained rats.** *Exp Physiol* 91(6): 1041-1049. 2006
- BUSQUETS, S., FIGUERAS, M. T., FUSTER, G., ALMENDRO, V., MOORE-CARRASCO, R., AMETLLER, E., ARGILES, J. M. e LOPEZ-SORIANO, F. J. **Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting.** *Cancer Res* 64(18): 6725-6731. 2004

- CARTONI, R., LEGER, B., HOCK, M. B., PRAZ, M., CRETENAND, A., PICH, S., ZILTENER, J. L., LUTHI, F., DERIAZ, O., ZORZANO, A., GOBELET, C., KRALLI, A. e RUSSELL, A. P. **Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise.** *J Physiol* 567(Pt 1): 349-358. 2005
- CEREGHETTI, G. M., STANGHERLIN, A., MARTINS DE BRITO, O., CHANG, C. R., BLACKSTONE, C., BERNARDI, P. e SCORRANO, L. **Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(41): 15803-15808. 2008
- CHANG, C. R. e BLACKSTONE, C. **Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology.** *J Biol Chem* 282(30): 21583-21587. 2007
- CHRUSCINSKI, A. J., ROHRER, D. K., SCHAUBLE, E., DESAI, K. H., BERNSTEIN, D. e KOBILKA, B. K. **Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene.** *J Biol Chem* 274(24): 16694-16700. 1999
- CRIBBS, J. T. e STRACK, S. **Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death.** *EMBO Rep* 8(10): 939-944. 2007
- CUMMING, G. R. e CARR, W. **Hemodynamic response to exercise after propranolol in normal subjects.** *Can J Physiol Pharmacol* 44(3): 465-474. 1966
- DAGDA, R. K., GUSDON, A. M., PIEN, I., STRACK, S., GREEN, S., LI, C., VAN HOUTEN, B., CHERRA, S. J., 3RD e CHU, C. T. **Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease.** *Cell Death Differ* 18(12): 1914-1923. 2011
- DE RASMO, D., GATTONI, G., PAPA, F., SANTERAMO, A., PACELLI, C., COCCO, T., MICELLI, L., SARDARO, N., LARIZZA, M., SCIVETTI, M., MILANO, S. e SIGNORILE, A. **The beta-adrenoceptor agonist isoproterenol promotes the activity of respiratory chain complex I and lowers cellular reactive oxygen species in fibroblasts and heart myoblasts.** *Eur J Pharmacol* 652(1-3): 15-22. 2011
- DECRAMER, M. L., HANANIA, N. A., LOTVALL, J. O. e YAWN, B. P. **The safety of long-acting beta2-agonists in the treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease.** *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 8: 53-64. 2013
- DIBNER, M. D. e INSEL, P. A. **Serum catecholamines desensitize beta-adrenergic receptors of cultured C6 glioma cells.** *J Biol Chem* 256(14): 7343-7346. 1981
- DIMAURO, I., PEARSON, T., CAPOROSSI, D. e JACKSON, M. J. **A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue.** *BMC Res Notes* 5: 513. 2012
- DING, H., JIANG, N., LIU, H., LIU, X., LIU, D., ZHAO, F., WEN, L., LIU, S., JI, L. L. e ZHANG, Y. **Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle.** *Biochim Biophys Acta* 1800(3): 250-256. 2010
- DORN, G. W., 2ND. **Mitochondrial dynamics in heart disease.** *Biochim Biophys Acta* 1833(1): 233-241. 2013

- DRAKE, J. C., WILSON, R. J. e YAN, Z. **Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle.** *FASEB J* 30(1): 13-22. 2016
- DUCHEN, M. R. **Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death.** *J Physiol* 529 Pt 1: 57-68. 2000
- EGAN, B. e ZIERATH, J. R. **Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation.** *Cell Metab* 17(2): 162-184. 2013
- EISNER, V., LENAERS, G. e HAJNOCZKY, G. **Mitochondrial fusion is frequent in skeletal muscle and supports excitation-contraction coupling.** *J Cell Biol* 205(2): 179-195. 2014
- ELFELLAH, M. S., DALLING, R., KANTOLA, I. M. e REID, J. L. **Beta-adrenoceptors and human skeletal muscle characterisation of receptor subtype and effect of age.** *Br J Clin Pharmacol* 27(1): 31-38. 1989
- ENGLE, S. K., JORDAN, W. H., PRITT, M. L., CHIANG, A. Y., DAVIS, M. A., ZIMMERMANN, J. L., RUDMANN, D. G., HEINZ-TAHENY, K. M., IRIZARRY, A. R., YAMAMOTO, Y., MENDEL, D., SCHULTZE, A. E., CORNWELL, P. D. e WATSON, D. E. **Qualification of cardiac troponin I concentration in mouse serum using isoproterenol and implementation in pharmacology studies to accelerate drug development.** *Toxicol Pathol* 37(5): 617-628. 2009
- EPSTEIN, S., ROBINSON, B. F., KAHLER, R. L. e BRAUNWALD, E. **Effects of beta-adrenergic blockade on the cardiac response to maximal and submaximal exercise in man.** *J Clin Invest* 44(11): 1745-1753. 1965
- EVANS, M. J. e SCARPULLA, R. C. **NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells.** *Genes Dev* 4(6): 1023-1034. 1990
- FARAH, B. L., SINHA, R. A., WU, Y., SINGH, B. K., ZHOU, J., BAY, B. H. e YEN, P. M. **beta-Adrenergic agonist and antagonist regulation of autophagy in HepG2 cells, primary mouse hepatocytes, and mouse liver.** *PLoS One* 9(6): e98155. 2014
- FELICIELLO, A., GOTTESMAN, M. E. e AVVEDIMENTO, E. V. **cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases.** *Cell Signal* 17(3): 279-287. 2005
- FENG, H., KANG, C., DICKMAN, J. R., KOENIG, R., AWOYINKA, I., ZHANG, Y. e JI, L. L. **Training-induced mitochondrial adaptation: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha, nuclear factor-kappaB and beta-blockade.** *Exp Physiol* 98(3): 784-795. 2013
- FERNSTROM, M., TONKONOGI, M. e SAHLIN, K. **Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle.** *J Physiol* 554(Pt 3): 755-763. 2004
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. e SCHIOTH, H. B. **The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.** *Mol Pharmacol* 63(6): 1256-1272. 2003
- GARCIA-BERMUDEZ, J., SANCHEZ-ARAGO, M., SOLDEVILLA, B., DEL ARCO, A., NUEVO-TAPIOLES, C. e CUEZVA, J. M. **PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H(+)-ATP Synthase.** *Cell Rep* 12(12): 2143-2155. 2015

- GARNIER, A., FORTIN, D., ZOLL, J., N'GUESSAN, B., METTAUER, B., LAMPERT, E., VEKSLER, V. e VENTURA-CLAPIER, R. **Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle.** *FASEB J* 19(1): 43-52. 2005
- GOMES, L. C., DI BENEDETTO, G. e SCORRANO, L. **During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability.** *Nat Cell Biol* 13(5): 589-598. 2011
- HARCOURT, L. J., SCHERTZER, J. D., RYALL, J. G. e LYNCH, G. S. **Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue.** *Neuromuscul Disord* 17(1): 47-55. 2007
- HARRI, M. N. **Effect of prolonged beta-blockade on energy metabolism and adrenergic responses in the rat.** *Med Biol* 55(5): 268-276. 1977
- HARRI, M. N. **Physical training under the influence of beta-blockade in rats. III. Effects on muscular metabolism.** *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 45(1): 25-31. 1980
- HERZIG, S., LONG, F., JHALA, U. S., HEDRICK, S., QUINN, R., BAUER, A., RUDOLPH, D., SCHUTZ, G., YOON, C., PUIGSERVER, P., SPIEGELMAN, B. e MONTMINY, M. **CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1.** *Nature* 413(6852): 179-183. 2001
- HOLLOSZY, J. O. **Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle.** *J Biol Chem* 242(9): 2278-2282. 1967
- HOOD, D. A. **Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle.** *Appl Physiol Nutr Metab* 34(3): 465-472. 2009
- HUANG, C., CHEN, D., XIE, Q., YANG, Y. e SHEN, W. **Nebivolol stimulates mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 adipocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 211-217. 2013
- JENSEN, J., BRENNESVIK, E. O., BERGERSEN, H., OSELAND, H., JEBENS, E. e BRORS, O. **Quantitative determination of cell surface beta-adrenoceptors in different rat skeletal muscles.** *Pflügers Arch* 444(1-2): 213-219. 2002
- JENSEN, J., BRORS, O. e DAHL, H. A. **Different beta-adrenergic receptor density in different rat skeletal muscle fibre types.** *Pharmacol Toxicol* 76(6): 380-385. 1995
- JESINKEY, S. R., FUNK, J. A., STALLONS, L. J., WILLS, L. P., MEGYESI, J. K., BEESON, C. C. e SCHNELLMANN, R. G. **Formoterol restores mitochondrial and renal function after ischemia-reperfusion injury.** *J Am Soc Nephrol* 25(6): 1157-1162. 2014
- Jl, L. L., LENNON, D. L., KOCHAN, R. G., NAGLE, F. J. e LARDY, H. A. **Enzymatic adaptation to physical training under beta-blockade in the rat. Evidence of a beta 2-adrenergic mechanism in skeletal muscle.** *J Clin Invest* 78(3): 771-778. 1986
- JIANG, N., ZHANG, G., BO, H., QU, J., MA, G., CAO, D., WEN, L., LIU, S., Jl, L. L. e ZHANG, Y. **Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function.** *Free Radic Biol Med* 46(2): 138-145. 2009
- JOASSARD, O. R., AMIROUCHE, A., GALLOT, Y. S., DESGEORGES, M. M., CASTELLS, J., DURIEUX, A. C., BERTHON, P. e FREYSSINET, D. G. **Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome**

- pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle.** *Int J Biochem Cell Biol* 45(11): 2444-2455. 2013
- JOHNSON, M. **The beta-adrenoceptor.** *Am J Respir Crit Care Med* 158(5 Pt 3): S146-153. 1998
- JUHLIN-DANNFELT, A. **Metabolic effects of beta-adrenoceptor blockade on skeletal muscle at rest and during exercise.** *Acta Med Scand Suppl* 665: 113-115. 1982
- KAISER, P., ROSSNER, S. e KARLSSON, J. **Effects of beta-adrenergic blockade on endurance and short-time performance in respect to individual muscle fiber composition.** *Int J Sports Med* 2(1): 37-42. 1981
- KARBOWSKI, M., NORRIS, K. L., CLELAND, M. M., JEONG, S. Y. e YOULE, R. J. **Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis.** *Nature* 443(7112): 658-662. 2006
- KARNOVSKY, M. J. **The Localization of Cholinesterase Activity in Rat Cardiac Muscle by Electron Microscopy.** *J Cell Biol* 23: 217-232. 1964
- KASAHARA, A., CIPOLAT, S., CHEN, Y., DORN, G. W., 2ND e SCORRANO, L. **Mitochondrial fusion directs cardiomyocyte differentiation via calcineurin and Notch signaling.** *Science* 342(6159): 734-737. 2013
- KIM, Y. S., SAINZ, R. D., MOLENAAR, P. e SUMMERS, R. J. **Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles.** *Biochem Pharmacol* 42(9): 1783-1789. 1991
- KIM, Y. S., SAINZ, R. D., SUMMERS, R. J. e MOLENAAR, P. **Cimaterol reduces beta-adrenergic receptor density in rat skeletal muscles.** *J Anim Sci* 70(1): 115-122. 1992
- KITAGAWA, Y., ADACHI-AKAHANE, S. e NAGAO, T. **Determination of beta-adrenoceptor subtype on rat isolated ventricular myocytes by use of highly selective beta-antagonists.** *Br J Pharmacol* 116(1): 1635-1643. 1995
- KOOPMAN, R., GEHRIG, S. M., LEGER, B., TRIEU, J., WALRAND, S., MURPHY, K. T. e LYNCH, G. S. **Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic {beta}-adrenoceptor stimulation in mice.** *J Physiol* 588(Pt 23): 4811-4823. 2010
- LANGLEY, B., THOMAS, M., BISHOP, A., SHARMA, M., GILMOUR, S. e KAMBADUR, R. **Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression.** *J Biol Chem* 277(51): 49831-49840. 2002
- LARK, D. S., REESE, L. R., RYAN, T. E., TORRES, M. J., SMITH, C. D., LIN, C. T. e NEUFER, P. D. **Protein Kinase A Governs Oxidative Phosphorylation Kinetics and Oxidant Emitting Potential at Complex I.** *Front Physiol* 6: 332. 2015
- LEFKIMMIATIS, K., LERONNI, D. e HOFER, A. M. **The inner and outer compartments of mitochondria are sites of distinct cAMP/PKA signaling dynamics.** *J Cell Biol* 202(3): 453-462. 2013
- LIESA, M., PALACIN, M. e ZORZANO, A. **Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease.** *Physiol Rev* 89(3): 799-845. 2009
- LIXI, M., RAFFO, M., PORRAZZO, G., CAMOGLIO, E., CUOZZO, G. e CHERCHI, A. **[On the effect of the acute administration of propranolol on the electrocardiogram during exercise in chronic coronary disease].** *Boll Soc Ital Cardiol* 11(4): 1523-1529. 1966

- LONG, Y. C., GLUND, S., GARCIA-ROVES, P. M. e ZIERATH, J. R. **Calcineurin regulates skeletal muscle metabolism via coordinated changes in gene expression.** *J Biol Chem* 282(3): 1607-1614. 2007
- LYNCH, G. S. e RYALL, J. G. **Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease.** *Physiol Rev* 88(2): 729-767. 2008
- MADSEN, K., ERTBJERG, P., DJURHUUS, M. S. e PEDERSEN, P. K. **Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria during exercise and recovery.** *Am J Physiol* 271(6 Pt 1): E1044-1050. 1996
- MAISEL, A. S., MICHEL, M. C., INSEL, P. A., ENNIS, C., ZIEGLER, M. G. e PHILLIPS, C. **Pertussis toxin treatment of whole blood. A novel approach to assess G protein function in congestive heart failure.** *Circulation* 81(4): 1198-1204. 1990
- MANGLIK, A., KIM, T. H., MASUREEL, M., ALTENBACH, C., YANG, Z., HILGER, D., LERCH, M. T., KOBILKA, T. S., THIAN, F. S., HUBBELL, W. L., PROSSER, R. S. e KOBILKA, B. K. **Structural Insights into the Dynamic Process of beta2-Adrenergic Receptor Signaling.** *Cell* 161(5): 1101-1111. 2015
- MANGMOOL, S. e KUROSE, H. **G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX).** *Toxins (Basel)* 3(7): 884-899. 2011
- MARTIN, W. H., 3RD, MURPHREE, S. S. e SAFFITZ, J. E. **Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle.** *Circ Res* 64(6): 1096-1105. 1989
- MENCONI, M., GONNELLA, P., PETKOVA, V., LECKER, S. e HASSELGREN, P. O. **Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes.** *J Cell Biochem* 105(2): 353-364. 2008
- MISHRA, P. e CHAN, D. C. **Metabolic regulation of mitochondrial dynamics.** *J Cell Biol* 212(4): 379-387. 2016
- MISHRA, P., VARUZHANYAN, G., PHAM, A. H. e CHAN, D. C. **Mitochondrial Dynamics is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization.** *Cell Metab* 22(6): 1033-1044. 2015
- MIURA, S., KAI, Y., KAMEI, Y. e EZAKI, O. **Isoform-specific increases in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) mRNA in response to beta2-adrenergic receptor activation and exercise.** *Endocrinology* 149(9): 4527-4533. 2008
- MIURA, S., KAWANAKA, K., KAI, Y., TAMURA, M., GOTO, M., SHIUCHI, T., MINOKOSHI, Y. e EZAKI, O. **An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) mRNA in response to exercise is mediated by beta-adrenergic receptor activation.** *Endocrinology* 148(7): 3441-3448. 2007
- MOLKENTIN, J. D. **Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis.** *Circ Res* 88(12): 1220-1222. 2001
- MOUTABARRIK, A., ISHIBASHI, M., KAMEOKA, H., KAWAGUCHI, N., TAKANO, Y., KOKADO, Y., ONISHI, S., SONODA, T., TAKAHARA, S. e OKUYAMA, A. **In vitro FK506 kidney tubular cell toxicity.** *Transpl Int* 5 Suppl 1: S87-92. 1992

- NATHANSON, J. A. **ICI 118,551: an effective ocular hypotensive agent with selectivity for the ciliary process beta 2-adrenoceptor and with minimal cardiac side effects.** *Br J Pharmacol* 83(3): 821-829. 1984
- NAVEGANTES, L. C., BAVIERA, A. M. e KETTELHUT, I. C. **The inhibitory role of sympathetic nervous system in the Ca²⁺-dependent proteolysis of skeletal muscle.** *Braz J Med Biol Res* 42(1): 21-28. 2009
- NAVEGANTES, L. C., MIGLIORINI, R. H. e DO CARMO KETTELHUT, I. **Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(3): 281-286. 2002
- NAVEGANTES, L. C., RESANO, N. M., BAVIERA, A. M., MIGLIORINI, R. H. e KETTELHUT, I. C. **Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(4): E642-647. 2004
- NAVEGANTES, L. C., RESANO, N. M., MIGLIORINI, R. H. e KETTELHUT, I. C. **Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle.** *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): E883-889. 1999
- NONOGAKI, K. **New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism.** *Diabetologia* 43(5): 533-549. 2000
- O'DONNELL, S. R. e WANSTALL, J. C. **Evidence that ICI 118, 551 is a potent, highly Beta 2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize Beta-adrenoceptor populations in tissues.** *Life Sci* 27(8): 671-677. 1980
- OZAWA, T. **Effects of FK506 on ca release channels (review).** *Perspect Medicin Chem* 2: 51-55. 2008
- PAGANO, A. F., PY, G., BERNARDI, H., CANDAU, R. B. e SANCHEZ, A. M. **Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise.** *Med Sci Sports Exerc* 46(7): 1314-1325. 2014
- PALANIYANDI, S. S., QI, X., YOGALINGAM, G., FERREIRA, J. C. e MOCHLY-ROSEN, D. **Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure.** *Drug Discov Today Dis Mech* 7(2): e95-e102. 2010
- PAN, X., LIU, J., NGUYEN, T., LIU, C., SUN, J., TENG, Y., FERGUSON, M. M., ROVIRA, II, ALLEN, M., SPRINGER, D. A., APONTE, A. M., GUCEK, M., BALABAN, R. S., MURPHY, E. e FINKEL, T. **The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter.** *Nat Cell Biol* 15(12): 1464-1472. 2013
- PENG, T. I. e JOU, M. J. **Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload.** *Ann N Y Acad Sci* 1201: 183-188. 2010
- PETERS, S. J., DYCK, D. J., BONEN, A. e SPRIET, L. L. **Effects of epinephrine on lipid metabolism in resting skeletal muscle.** *Am J Physiol* 275(2 Pt 1): E300-309. 1998
- PICARD, M., GENTIL, B. J., MCMANUS, M. J., WHITE, K., ST LOUIS, K., GARTSIDE, S. E., WALLACE, D. C. e TURNBULL, D. M. **Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle.** *J Appl Physiol* (1985) 115(10): 1562-1571. 2013
- PIDOUX, G., WITCZAK, O., JARNAESS, E., MYRVOLD, L., URLAUB, H., STOKKA, A. J., KUNTZIGER, T. e TASKEN, K. **Optic atrophy 1 is an A-kinase**

- anchoring protein on lipid droplets that mediates adrenergic control of lipolysis.** *EMBO J* 30(21): 4371-4386. 2011
- PILEGAARD, H., SALTIN, B. e NEUFER, P. D. **Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle.** *J Physiol* 546(Pt 3): 851-858. 2003
- PUIGSERVER, P., WU, Z., PARK, C. W., GRAVES, R., WRIGHT, M. e SPIEGELMAN, B. M. **A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.** *Cell* 92(6): 829-839. 1998
- RAJAGOPAL, S., AHN, S., ROMINGER, D. H., GOWEN-MACDONALD, W., LAM, C. M., DEWIRE, S. M., VIOLIN, J. D. e LEFKOWITZ, R. J. **Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors.** *Mol Pharmacol* 80(3): 367-377. 2011
- REIKEN, S., LACAMPAGNE, A., ZHOU, H., KHERANI, A., LEHNART, S. E., WARD, C., HUANG, F., GABURJAKOVA, M., GABURJAKOVA, J., ROSEMBLIT, N., WARREN, M. S., HE, K. L., YI, G. H., WANG, J., BURKHOFF, D., VASSORT, G. e MARKS, A. R. **PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure.** *J Cell Biol* 160(6): 919-928. 2003
- REITER, E., AHN, S., SHUKLA, A. K. e LEFKOWITZ, R. J. **Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52: 179-197. 2012
- RICHARDS, D. A., BAO, W., RAMBO, M. V., BURGERT, M., JUCKER, B. M. e LENHARD, S. C. **Examining the relationship between exercise tolerance and isoproterenol-based cardiac reserve in murine models of heart failure.** *J Appl Physiol* (1985) 114(9): 1202-1210. 2013
- ROBINSON, M. M., BELL, C., PEELOR, F. F., 3RD e MILLER, B. F. **beta-Adrenergic receptor blockade blunts postexercise skeletal muscle mitochondrial protein synthesis rates in humans.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301(2): R327-334. 2011
- ROGNE, M. e TASKEN, K. **Compartmentalization of cAMP signaling in adipogenesis, lipogenesis, and lipolysis.** *Horm Metab Res* 46(12): 833-840. 2014
- RYALL, J. G., GREGOREVIC, P., PLANT, D. R., SILLENCE, M. N. e LYNCH, G. S. **Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(6): R1386-1394. 2002
- RYALL, J. G., PLANT, D. R., GREGOREVIC, P., SILLENCE, M. N. e LYNCH, G. S. **Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats.** *J Physiol* 555(Pt 1): 175-188. 2004
- RYALL, J. G., SILLENCE, M. N. e LYNCH, G. S. **Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses.** *Br J Pharmacol* 147(6): 587-595. 2006
- SABLE, D. L., BRAMMELL, H. L., SHEEHAN, M. W., NIES, A. S., GERBER, J. e HORWITZ, L. D. **Attenuation of exercise conditioning by beta-adrenergic blockade.** *Circulation* 65(4): 679-684. 1982

- SANTEL, A., FRANK, S., GAUME, B., HERRLER, M., YOULE, R. J. e FULLER, M. **T. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells.** *J Cell Sci* 116(Pt 13): 2763-2774. 2003
- SCARPULLA, R. C. **Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells.** *Gene* 286(1): 81-89. 2002
- SEBASTIAN, D., HERNANDEZ-ALVAREZ, M. I., SEGALES, J., SORIANELLO, E., MUNOZ, J. P., SALA, D., WAGET, A., LIESA, M., PAZ, J. C., GOPALACHARYULU, P., ORESIC, M., PICH, S., BURCELIN, R., PALACIN, M. e ZORZANO, A. **Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(14): 5523-5528. 2012
- SHIN, D. W., PAN, Z., BANDYOPADHYAY, A., BHAT, M. B., KIM, D. H. e MA, J. **Ca(2+)-dependent interaction between FKBP12 and calcineurin regulates activity of the Ca(2+) release channel in skeletal muscle.** *Biophys J* 83(5): 2539-2549. 2002
- SHIVACHAR, A. C. e EIKENBURG, D. C. **Differential effects of epinephrine and norepinephrine on cAMP response and g(i3)alpha protein expression in cultured sympathetic neurons.** *J Pharmacol Exp Ther* 291(1): 258-264. 1999
- SIN, J., ANDRES, A. M., TAYLOR, D. J., WESTON, T., HIRAUMI, Y., STOTLAND, A., KIM, B. J., HUANG, C., DORAN, K. S. e GOTTLIEB, R. A. **Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts.** *Autophagy* 12(2): 369-380. 2016
- SKULACHEV, V. P. **Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables.** *Trends Biochem Sci* 26(1): 23-29. 2001
- SORIANO, F. X., LIESA, M., BACH, D., CHAN, D. C., PALACIN, M. e ZORZANO, A. **Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2.** *Diabetes* 55(6): 1783-1791. 2006
- SULLO, N., ROVIEZZO, F., MATTEIS, M., SPAZIANO, G., DEL GAUDIO, S., LOMBARDI, A., LUCATTELLI, M., POLVERINO, F., LUNGARELLA, G., CIRINO, G., ROSSI, F. e D'AGOSTINO, B. **Skeletal muscle oxidative metabolism in an animal model of pulmonary emphysema: formoterol and skeletal muscle dysfunction.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 48(2): 198-203. 2013
- SVEDENHAG, J., HENRIKSSON, J. e JUHLIN-DANNFELT, A. **Beta-adrenergic blockade and training in human subjects: effects on muscle metabolic capacity.** *Am J Physiol* 247(3 Pt 1): E305-311. 1984
- TADAISHI, M., MIURA, S., KAI, Y., KAWASAKI, E., KOSHINAKA, K., KAWANAKA, K., NAGATA, J., OISHI, Y. e EZAKI, O. **Effect of exercise intensity and AICAR on isoform-specific expressions of murine skeletal muscle PGC-1alpha mRNA: a role of beta(2)-adrenergic receptor activation.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(2): E341-349. 2011
- TAHARA, E. B., NAVARETE, F. D. e KOWALTOWSKI, A. J. **Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation.** *Free Radic Biol Med* 46(9): 1283-1297. 2009

- THOMSON, A. W., BONHAM, C. A. e ZEEVI, A. **Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms.** *Ther Drug Monit* 17(6): 584-591. 1995
- TOLEDO, M., SPRINGER, J., BUSQUETS, S., TSCHIRNER, A., LOPEZ-SORIANO, F. J., ANKER, S. D. e ARGILES, J. M. **Formoterol in the treatment of experimental cancer cachexia: effects on heart function.** *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014
- TONKONOGLI, M., HARRIS, B. e SAHLIN, K. **Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise.** *J Physiol* 510 (Pt 1): 279-286. 1998
- TONKONOGLI, M., WALSH, B., TIIVEL, T., SAKS, V. e SAHLIN, K. **Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise.** *Pflugers Arch* 437(4): 562-568. 1999
- URHAUSEN, A., WEILER, B., COEN, B. e KINDERMANN, W. **Plasma catecholamines during endurance exercise of different intensities as related to the individual anaerobic threshold.** *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69(1): 16-20. 1994
- VALSECCHI, F., RAMOS-ESPIRITU, L. S., BUCK, J., LEVIN, L. R. e MANFREDI, G. **cAMP and mitochondria.** *Physiology (Bethesda)* 28(3): 199-209. 2013
- VIOLIN, J. D. e LEFKOWITZ, R. J. **Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors.** *Trends Pharmacol Sci* 28(8): 416-422. 2007
- VIRBASIOUS, J. V., VIRBASIOUS, C. A. e SCARPULLA, R. C. **Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters.** *Genes Dev* 7(3): 380-392. 1993
- VOLTARELLI, V. A., BECHARA, L. R., BACURAU, A. V., MATTOS, K. C., DOURADO, P. M., BUENO, C. R., JR., CASARINI, D. E., NEGRAO, C. E. e BRUM, P. C. **Lack of beta2 -adrenoceptors aggravates heart failure-induced skeletal muscle myopathy in mice.** *J Cell Mol Med* 18(6): 1087-1097. 2014
- WANNENES, F., MAGNI, L., BONINI, M., DIMAURO, I., CAPOROSSO, D., MORETTI, C. e BONINI, S. **In vitro effects of Beta-2 agonists on skeletal muscle differentiation, hypertrophy, and atrophy.** *World Allergy Organ J* 5(6): 66-72. 2012
- WAUSON, E. M., DBOUK, H. A., GHOSH, A. B. e COBB, M. H. **G protein-coupled receptors and the regulation of autophagy.** *Trends Endocrinol Metab* 25(5): 274-282. 2014
- WESTERMANN, B. **Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission.** *Biochim Biophys Acta* 1817(10): 1833-1838. 2012
- WILLIAMS, J. H. e BARNES, W. S. **The positive inotropic effect of epinephrine on skeletal muscle: a brief review.** *Muscle Nerve* 12(12): 968-975. 1989
- WILLIAMS, R. S., CARON, M. G. e DANIEL, K. **Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training.** *Am J Physiol* 246(2 Pt 1): E160-167. 1984
- WILLKOMM, L., SCHUBERT, S., JUNG, R., ELSSEN, M., BORDE, J., GEHLERT, S., SUHR, F. e BLOCH, W. **Lactate regulates myogenesis in C2C12 myoblasts in vitro.** *Stem Cell Res* 12(3): 742-753. 2014

- WILLS, L. P., TRAGER, R. E., BEESON, G. C., LINDSEY, C. C., PETERSON, Y. K., BEESON, C. C. e SCHNELLMANN, R. G. **The beta2-adrenoceptor agonist formoterol stimulates mitochondrial biogenesis.** *J Pharmacol Exp Ther* 342(1): 106-118. 2012
- WILLS, L. P., TRAGER, R. E., BEESON, G. C., LINDSEY, C. C., PETERSON, Y. K., BEESON, C. C. e SCHNELLMANN, R. G. **beta2 Adrenoceptor Agonist Formoterol Stimulates Mitochondrial Biogenesis.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2012
- WU, M., NEILSON, A., SWIFT, A. L., MORAN, R., TAMAGNINE, J., PARSLow, D., ARMISTEAD, S., LEMIRE, K., ORRELL, J., TEICH, J., CHOMICZ, S. e FERRICK, D. A. **Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C125-136. 2007
- XIANG, Y. e KOBILKA, B. **The PDZ-binding motif of the beta2-adrenoceptor is essential for physiologic signaling and trafficking in cardiac myocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10776-10781. 2003
- YAN, Z., LIRA, V. A. e GREENE, N. P. **Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality.** *Exerc Sport Sci Rev* 40(3): 159-164. 2012
- YANG, Y. T. e MCELLIGOTT, M. A. **Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue.** *Biochem J* 261(1): 1-10. 1989
- YOULE, R. J. e VAN DER BLIEK, A. M. **Mitochondrial fission, fusion, and stress.** *Science* 337(6098): 1062-1065. 2012
- ZHANG, F., ZHANG, L., QI, Y. e XU, H. **Mitochondrial cAMP signaling.** *Cell Mol Life Sci.* 2016
- ZHOU, W., CHEN, K. H., CAO, W., ZENG, J., LIAO, H., ZHAO, L. e GUO, X. **Mutation of the protein kinase A phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2.** *Atherosclerosis* 211(1): 216-223. 2010
- ZOUHAL, H., JACOB, C., DELAMARCHE, P. e GRATAS-DELAMARCHE, A. **Catecholamines and the effects of exercise, training and gender.** *Sports Med* 38(5): 401-423. 2008

ANEXOS

1. Aprovação do projeto de pesquisa na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E
ESPORTE

Of.CEUA/1015/EEFE/14092015

Senhor(a) Coordenador(a)

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada em 27 de agosto de 2015, aprovou o Projeto de Pesquisa nº 2015/06 – Contribuição dos receptores B2-adrenérgicos na função e dinâmica mitocondriais na musculatura esquelética em resposta ao exercício físico aeróbio, sob sua responsabilidade.

Atenciosamente

Assinatura manuscrita de Paulo Rizzo Ramires em tinta azul.

Prof. Dr. Paulo Rizzo Ramires
Coordenador

Imo(a). Sr(a).
Prof(a) . Dr(a). Patricia Chakur Brum
EEFEUSP

Av. Professor Mello Moraes, 65
Cep 05508-030 – São Paulo – SP –Brasil
Fone/fax: 55 11 3091-3097

2. Publicações de artigos em periódicos internacionais e nacionais durante o doutorado

Scand J Med Sci Sports 2012; 22: e125–e132
doi: 10.1111/j.1600-0838.2012.01519.x

© 2012 John Wiley & Sons A/S

SCANDINAVIAN JOURNAL OF
MEDICINE & SCIENCE
IN SPORTS

Lack of β_2 -AR improves exercise capacity and skeletal muscle oxidative phenotype in mice

V. A. Voltarelli¹, A. V. N. Bacurau¹, L. R. G. Bechara¹, C. R. Bueno Júnior², L. H. M. Bozi¹, K. C. Mattos¹, V. M. C. Salemi³, P. C. Brum¹

¹School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Human Genome Research Center, Biosciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Cardiomyopathy Unit, Heart Institute (InCor), University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

Corresponding author: Patrícia C. Brum, PhD, Departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, Av. Professor Mello Moraes, 65, Butantã, São Paulo, SP, CEP 05508-900, Brazil. Tel: (5511) 3091-3136, Fax: (5511) 3813 5921, E-mail: pcbrum@usp.br

Accepted for publication 24 July 2012

β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) agonists have been used as ergogenics by athletes involved in training for strength and power in order to increase the muscle mass. Even though anabolic effects of β_2 -AR activation are highly recognized, less is known about the impact of β_2 -AR in endurance capacity. We presently used mice lacking β_2 -AR [β_2 -knockout (β_2 KO)] to investigate the role of β_2 -AR on exercise capacity and skeletal muscle metabolism and phenotype. β_2 KO mice and their wild-type controls (WT) were studied. Exercise tolerance, skeletal muscle fiber typing, capillary-to-fiber ratio, citrate synthase activity and glycogen content were evaluated. When compared with WT, β_2 KO mice displayed increased exer-

cise capacity (61%) associated with higher percentage of oxidative fibers (21% and 129% of increase in soleus and plantaris muscles, respectively) and capillarity (31% and 20% of increase in soleus and plantaris muscles, respectively). In addition, β_2 KO mice presented increased skeletal muscle citrate synthase activity (10%) and succinate dehydrogenase staining. Likewise, glycogen content (53%) and periodic acid-Schiff staining (glycogen staining) were also increased in β_2 KO skeletal muscle. Altogether, these data provide evidence that disruption of β_2 -AR improves oxidative metabolism in skeletal muscle of β_2 KO mice and this is associated with increased exercise capacity.

β_1 - and β_2 -adrenergic receptors (AR) are expressed in both human and animal skeletal muscle. However, β_2 -AR subtype is highly prevalent (~90%), which increases the interest in better understanding the role of β_2 -AR in skeletal muscle phenotype (Elfellah et al., 1989; Kim et al., 1991; Jensen et al., 2002). β_2 -AR mediates the pharmacological effects of β_2 -agonists (i.e., clenbuterol, formoterol, and salmeterol) leading to skeletal muscle hypertrophy coupled with an increased protein synthesis and a reduced protein degradation (Kline et al., 2007). Regarding skeletal muscle function, β_2 -AR increases force producing capacity (Ryall et al., 2004) associated with faster excitation contraction coupling (van Mil et al., 1995) and fiber typing changes toward fast-twitch fibers (Bricout et al., 2004). This is particularly important considering that β_2 -AR agonists have been used as ergogenics by those engaged in competitive body building and by athletes involved in training for strength and power in order to increase the muscle mass and induce lypolysis (Lynch & Ryall, 2008).

Even though anabolic effects of β_2 -AR activation are highly recognized, less is known about the impact of

β_2 -AR in endurance capacity, because β_2 -AR activation leads to glycogenolysis, while increases energy expenditure and lipid mobilization in adipose tissue (Wolfarth et al., 2007). The potential involvement of β_2 -AR on endurance performance was first suggested by Chruscinski et al. (1999) while characterizing metabolic consequences of β_2 -AR target disruption in mice. β_2 -knockout (β_2 KO) mice exercised longer in a progressive exercise test until exhaustion with no changes in maximal oxygen uptake but lower respiratory exchange ratio (RER). Taken together, these data suggest that β_2 KO mice are prone to present an increased oxidative metabolism. However, further studies need to be conducted to better understand the role of β_2 -AR in endurance capacity considering the contribution of skeletal muscles comprised with different fiber types.

We presently used mice lacking β_2 -AR (β_2 KO) to investigate the role of β_2 -AR on exercise capacity, motor ability, and skeletal muscle phenotype considering muscles with different fiber type composition. Here we report that despite reduced skeletal muscle fiber type cross-sectional area in both soleus and plantaris, β_2 KO mice displayed improved exercise capacity associated

Combined Effect of AMPK/PPAR Agonists and Exercise Training in *mdx* Mice Functional Performance

Carlos R. Bueno Júnior¹, Lucas C. Pantaleão², Vanessa A. Voltarelli³, Luiz Henrique M. Bozi³, Patricia Chakur Brum³, Mayana Zatz^{1*}

¹ Human Genome Research Center - Institute of Biosciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, ² Department of Physiology and Biophysics - Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, ³ School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Abstract

The present investigation was undertaken to test whether exercise training (ET) associated with AMPK/PPAR agonists (EM) would improve skeletal muscle function in *mdx* mice. These drugs have the potential to improve oxidative metabolism. This is of particular interest because oxidative muscle fibers are less affected in the course of the disease than glycolytic counterparts. Therefore, a cohort of 34 male congenic C57Bl/10J *mdx* mice included in this study was randomly assigned into four groups: vehicle solution (V), EM [AICAR (AMPK agonist, 50 mg/Kg-1.day-1, ip) and GW 1516 (PPAR δ agonist, 2.5 mg/Kg-1.day-1, gavage)], ET (voluntary running on activity wheel) and EM+ET. Functional performance (grip meter and rotarod), aerobic capacity (running test), muscle histopathology, serum creatine kinase (CK), levels of ubiquitinated proteins, oxidative metabolism protein expression (AMPK, PPAR, myoglobin and SCD) and intracellular calcium handling (DHPR, SERCA and NCX) protein expression were analyzed. Treatments started when the animals were two months old and were maintained for one month. A significant functional improvement ($p < 0.05$) was observed in animals submitted to the combination of ET and EM. CK levels were decreased and the expression of proteins related to oxidative metabolism was increased in this group. There were no differences among the groups in the intracellular calcium handling protein expression. To our knowledge, this is the first study that tested the association of ET with EM in an experimental model of muscular dystrophy. Our results suggest that the association of ET and EM should be further tested as a potential therapeutic approach in muscular dystrophies.

Citation: Bueno Júnior CR, Pantaleão LC, Voltarelli VA, Bozi LHM, Brum PC, et al. (2012) Combined Effect of AMPK/PPAR Agonists and Exercise Training in *mdx* Mice Functional Performance. PLoS ONE 7(9): e45699. doi:10.1371/journal.pone.0045699

Editor: Carlo Gaetano, Goethe University, Germany

Received: July 3, 2012; **Accepted:** August 20, 2012; **Published:** September 21, 2012

Copyright: © 2012 Bueno Júnior et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - CEPID 98/14254-2), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: mayazatz@usp.br

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked lethal genetic disease caused by the absence of the protein dystrophin [1]. This subsarcolemmal protein transmits the tension from the contractile proteins to the extracellular matrix and maintains the stability of the plasma membrane, avoiding the extrusion of intracellular constituents, including creatine kinase to blood serum, which is hallmark of the disease [2]. All patients have grossly increased serum CK levels [3–4] since birth, which decrease with the progression of the dystrophic process, reaching almost normal levels in the late stages. Affected boys are usually wheelchair-bound around age 10–12 and assisted ventilation is required in order to prolong survival after adolescence. The *mdx* mouse also lack muscle dystrophin and is the most widely used animal model for DMD [5].

Many investigators suggest that exercise training is beneficial in muscular dystrophies, since it results in better intracellular calcium handling, activation of compensatory or antagonistic signaling pathways, increased antioxidant capacity and angiogenesis, improved ability to blunt alpha-adrenergic vasoconstriction, increased iNOS activity and membrane protective effects [6–12]. However, others claim it has detrimental effects, which could be

caused by the increased susceptibility of dystrophic muscle to exercise-induced injury. It is also known that these contradictory results are mainly related to type and intensity of exercise [13–15].

AMPK (AMP-activated protein kinase) and PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) agonists are exercise mimetics. In 2009, Miura et al. demonstrated that a PPAR agonist reduced the number of skeletal muscle fiber membrane lesions and decreased force drop due to eccentric contractions in *mdx* mice [16]. It has been demonstrated that these drugs are able to improve the oxidative metabolism - they induce mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation [17]. The improvement of the oxidative metabolism in muscular dystrophies is critical since it has been demonstrated, both in experimental models and humans, that slow oxidative muscles display reduced damage when compared to the glycolytic counterparts [18–19].

As exercise training and its mimetics present both coincident and different beneficial effects [17], the aim of the present study was to test the hypothesis that the association of exercise training with AMPK and PPAR agonists can improve *mdx* functional performance, reducing the impact of muscle dystrophin deficiency. In order to address this question, several parameters, such as functional tests, histopathology, skeletal muscle protein expression

EFEITOS DOS TREINAMENTOS FÍSICOS AERÓBICO E RESISTIDO SOBRE A ATROFIA MUSCULAR ESQUELÉTICA NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

VANESSA AZEVEDO VOLTARELLI¹, LUIZ ROBERTO GRASSMANN BECHARA², PATRICIA CHAKUR BRUM³

Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2013;23(1 Supl A):00-00
RSCESP (72594)-0000

A insuficiência cardíaca é uma síndrome que envolve múltiplos sistemas e mecanismos compensatórios neuro-hormonais, acompanhada de altos índices de morbidade e mortalidade, caracterizada por sintomas clínicos como fadiga, dispnéia e intolerância aos esforços físicos. Além do comprometimento cardíaco, observam-se importantes alterações periféricas, como a atrofia muscular esquelética, a qual contribui para o mau prognóstico e para o aumento da mortalidade dos pacientes. Estudos têm demonstrado que essa atrofia muscular pode ser causada por um desbalanço entre vias de síntese e degradação proteica, principalmente pelo aumento da ativação do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma e pela diminuição da ativação da via IGF-1/Akt. O treinamento físico, estratégia não farmacológica no tratamento da insuficiência cardíaca, tem se mostrado capaz de atenuar ou reverter o quadro de miopatia esquelética encontrado nessa síndrome. Portanto, foi objetivo da presente revisão discutir em maiores detalhes a atrofia muscular esquelética observada na insuficiência cardíaca e os efeitos dos treinamentos físicos aeróbico e resistido sobre esta condição. Embora o treinamento físico aeróbico, de moderada ou alta intensidade, não seja conhecido por promover aumento da massa muscular esquelética, alguns estudos demonstram que este tipo de treinamento promove adaptações importantes na regulação da massa muscular na insuficiência cardíaca, prevenindo a atrofia e, consequentemente, contribuindo para a melhora da tolerância ao esforço físico. Por outro lado, o treinamento físico resistido parece ser mais eficaz em atenuar ou reverter a atrofia muscular esquelética presente na insuficiência cardíaca. No entanto, os benefícios promovidos pelo treinamento físico aeróbico em diversos aspectos da insuficiência cardíaca são mais bem estabelecidos na literatura, sendo, portanto, indispensável ao tratamento dessa síndrome e podendo ser indicado em associação com o treinamento físico resistido com a finalidade de obter melhores resultados.

Descritores: atrofia muscular, exercício, insuficiência cardíaca, miocárdio, músculo esquelético.

EFFECTS OF AEROBIC AND RESISTANCE EXERCISE TRAINING ON SKELETAL MUSCLE ATROPHY INDUCED BY HEART FAILURE

Heart failure is a complex syndrome involving multiple systems and neurohumoral compensatory mechanisms accompanied by high morbidity and mortality, and it is characterized by clinical signs such as fatigue, dyspnea, and exercise intolerance. Although heart failure is a syndrome of cardiac origin, it promotes changes in other tissues, such as skeletal muscle, where modifications of muscle phenotype and the loss of skeletal muscle mass observed in heart failure contribute to poor prognosis and increased mortality of patients. Studies have shown that skeletal muscle atrophy is caused by an imbalance between the process of protein synthesis and degradation, mainly due to increased activation of ubiquitin-proteasome proteolytic system and decreased activation of IGF-1/Akt pathway. Exercise training, a non-pharmacological strategy to treat heart failure, has been shown to attenuate or reverse the skeletal myopathy in this syndrome. This review aimed to discuss in details the muscular atrophy observed in heart failure and the effects of aerobic and resistance exercise training on skeletal muscle atrophy induced by this condition. Although aerobic exercise training, at moderate or high intensity, is not known for promoting skeletal muscle hypertrophy, some studies show that this type of exercise training promotes major changes in skeletal muscle mass in heart failure, preventing atrophy and consequently contributing to improved exercise tolerance. On the other hand, resistance exercise training appears to be more effective in attenuating or reversing the skeletal muscle atrophy in heart failure. However, the benefits promoted by aerobic exercise training in many aspects of heart failure are more established in the literature and should be considered in the treatment of this syndrome in association with resistance exercise training, in order to obtain better results.

Descriptors: exercise, heart failure, muscular atrophy, myocardium, skeletal muscle.

¹ Mestre em ciências e doutoranda em ciências pela Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP).

² Doutor em ciências pela Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP).

³ Professora livre docente da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP).

Endereço para correspondência:

Vanessa Azevedo Voltarelli. Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, Departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano. Av. Professor Mello Moraes, nº 65. Butantã, São Paulo - SP, Brasil. CEP: 05508-900.

Telefone: (011) 3091-2149. Fax: (011) 3813-5921.

E-mail: vavoltarelli@gmail.com

Cardiac sympathetic neurons provide trophic signal to the heart via β 2-adrenoceptor-dependent regulation of proteolysis

Tania Zaglia^{1,2}, Giulia Milan², Mauro Franzoso^{1,2}, Enrico Bertaggia², Nicola Pianca², Eleonora Piasentini², Vanessa A. Voltarelli³, David Chiavegato², Patricia C. Brum³, David J. Glass⁴, Stefano Schiaffino^{2,5}, Marco Sandri^{1,2,5}, and Marco Mongillo^{1,2,5*}

¹Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Viale G. Colombo 3, Padova 35121, Italy; ²Venetian Institute of Molecular Medicine (VIMM), University of Padova, Via. Orus 2, Padova 35129, Italy; ³Affiliation-School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, 65 Butantã, São Paulo 05508-900, Brazil; ⁴Muscle Diseases, Novartis Institutes for Biomedical Research, 100 Technology Square, Cambridge, MA 02139, USA; and ⁵CNR Institute of Neuroscience, Viale G. Colombo 3, Padova 35121, Italy

Received 4 July 2012; revised 30 September 2012; accepted 15 October 2012; online publish-ahead-of-print 22 October 2012

Time for primary review: 33 days

Aims	Increased cardiac sympathetic neuron (SN) activity has been associated with pathologies such as heart failure and hypertrophy, suggesting that cardiac innervation regulates cardiomyocyte trophism. Whether continuous input from the SNs is required for the maintenance of the cardiomyocyte size has not been determined thus far.
Methods and results	To address the role of cardiac innervation in cardiomyocyte size regulation, we monitored the effect of pharmacological sympathetic denervation in mice on cardiac structure, function, and signalling from 24 h to 30 days in the absence of other pathological stimuli. SN ablation caused an immediate reduction in the cardiomyocyte size with minimal consequences on the resting contractile function. Atrophic remodelling was mediated by the ubiquitin–proteasome system through FOXO-dependent early induction of the muscle-specific E3 ubiquitin ligases Atrogin-1/MAFbx and MuRF1, which was followed by activation of the autophagy–lysosome system. MuRF1 was found to be determinant in denervation atrophy as remodelling did not develop in denervated MuRF1 knock-out (KO) hearts. These effects were caused by decreased basal stimulation of cardiomyocyte β 2-adrenoceptor (AR), as atrophy was prevented by treatment of denervated mice with the β 2-AR agonist clenbuterol. Consistent with these data, we also observed that β 2-AR KO mice showed cardiac atrophy at rest.
Conclusion	Cardiac SNs are strong regulators of the cardiomyocyte size via β 2-AR-dependent repression of proteolysis, demonstrating that the neuro-cardiac axis operates constitutively for the determination of the physiological cardiomyocyte size. These results are of great clinical relevance given the role of β -AR in cardiovascular diseases and their modulation in therapy.
Keywords	β -adrenoceptors • Ubiquitin–proteasome system • Atrophy • Sympathetic nervous system • Cardiac remodelling

1. Introduction

The heart adapts its mass in response to various stimuli including mechanical, metabolic, and neuro/hormonal signals, all of which cause changes in the relative rates of protein synthesis and degradation.¹ Protein degradation occurs either via autophagy–lysosome system, mainly involved in organelle removal, or through the ubiquitin–proteasome system (UPS).² The UPS relies on the activity of three enzymes: E1, a ubiquitin-activating enzyme; E2, mediating

ubiquitin conjugation; and E3, a ubiquitin ligase enzyme.^{2,3} Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are muscle-specific ubiquitin ligases^{4,5} whose activity contributes to cell size regulation both in skeletal and cardiac muscles. Consistent with their role in mediating proteolysis, over-expression of cardiac atrogin-1/MAFbx or MuRF1 has been shown to prevent surgically or pharmacologically induced cardiomyocyte hypertrophy,^{6–8} while genetic ablation of MuRF1 increases the propensity to develop cardiac hypertrophy upon pressure overload.⁹ Conversely, it has been demonstrated that MuRF1 is up-regulated

* Corresponding author. Tel: +39 0497923229; fax: +39 0497923250, Email: marco.mongillo@unipd.it

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2012. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

Lack of β_2 -adrenoceptors aggravates heart failure-induced skeletal muscle myopathy in mice

Vanessa A. Voltarelli^a, Luiz R.G. Bechara^a, Aline V.N. Bacurau^a, Katt C. Mattos^a,
Paulo M.M. Dourado^b, Carlos R. Bueno Jr.^c, Dulce E. Casarini^d, Carlos E. Negrao^{a, b},
Patricia C. Brum^{a, *}

^a School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Heart Institute, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^d Department of Medicine, Division of Nephrology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received: August 3, 2013; Accepted: January 20, 2014

Abstract

Skeletal myopathy is a hallmark of heart failure (HF) and has been associated with a poor prognosis. HF and other chronic degenerative diseases share a common feature of a stressed system: sympathetic hyperactivity. Although beneficial acutely, chronic sympathetic hyperactivity is one of the main triggers of skeletal myopathy in HF. Considering that β_2 -adrenoceptors mediate the activity of sympathetic nervous system in skeletal muscle, we presently evaluated the contribution of β_2 -adrenoceptors for the morphofunctional alterations in skeletal muscle and also for exercise intolerance induced by HF. Male WT and β_2 -adrenoceptor knockout mice on a FVB genetic background (β_2 KO) were submitted to myocardial infarction (MI) or SHAM surgery. Ninety days after MI both WT and β_2 KO mice presented to cardiac dysfunction and remodelling accompanied by significantly increased norepinephrine and epinephrine plasma levels, exercise intolerance, changes towards more glycolytic fibres and vascular rarefaction in plantaris muscle. However, β_2 KO MI mice displayed more pronounced exercise intolerance and skeletal myopathy when compared to WT MI mice. Skeletal muscle atrophy of infarcted β_2 KO mice was paralleled by reduced levels of phosphorylated Akt at Ser 473 while increased levels of proteins related with the ubiquitin–proteasome system, and increased 26S proteasome activity. Taken together, our results suggest that lack of β_2 -adrenoceptors worsen and/or anticipate the skeletal myopathy observed in HF.

Keywords: heart failure • skeletal muscle • β_2 -adrenoceptors • proteasome

Introduction

Heart failure (HF) is a complex syndrome involving multiple systems and neurohumoral compensatory mechanisms accompanied by high morbidity and mortality, and it is characterized by clinical signs, such as fatigue, dyspnoea and exercise intolerance [1, 2]. Although HF is a syndrome of cardiac origin, it leads to skeletal muscle atrophy, a co-morbidity that is associated with poor prognosis [3–5].

Short-term increases in sympathetic activity lead to increases in skeletal muscle mass. Conversely, chronic sympathetic hyperactivity is detrimental, contributing to muscle wasting in HF, as demonstrated previously [6]. In fact, sympathetic hyperactivity in HF could decrease

the density and sensitivity of skeletal muscle β_2 -adrenoceptor (β_2 -AR), reducing anabolic and anti-catabolic stimuli promoted by these receptors on skeletal muscle fibres.

It is known that β_2 -AR subtype is highly prevalent (~90%) in skeletal muscle and plays a key role in regulating skeletal muscle mass in both anabolic and catabolic conditions [7]. The activation of these receptors leads to increased protein synthesis and inhibition of protein degradation pathways [8, 9]. Furthermore, we have shown recently that β_2 -ARs are also involved in endurance capacity [10]. However, the involvement of β_2 -AR signalling in skeletal muscle morphology and functional capacity changes observed in HF is not known yet. Taking into consideration that β_2 -ARs mediate the activity of sympathetic nervous system in skeletal muscle and that sympathetic hyperactivity is one of the main components involved in HF-induced skeletal myopathy [11], one would suggest that chronic activation of β_2 -AR is associated with skeletal muscle morphofunctional alterations in HF.

*Correspondence to: Patricia Chakur BRUM, Ph.D.,
Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo,
Av. Professor Mello Moraes, 65 – Butantã – São Paulo 05508-900, Brazil.
Tel.: (+55)1130913136; Fax: (+55)1138135921
E-mail: pcbrum@usp.br

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard

NADPH oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats

Luiz R.G. Bechara^a, Jose B.N. Moreira^{a,b}, Paulo R. Jannig^a, Vanessa A. Voltarelli^a, Paulo M. Dourado^c, Andrea R. Vasconcelos^d, Cristoforo Scavone^d, Paulo R. Ramires^a, Patricia C. Brum^{a,*}

^a School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, Brazil

^b K.G. Jebsen Center of Exercise in Medicine, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Trondheim, Norway

^c Heart Institute, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Brazil

^d Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2014

Received in revised form 28 May 2014

Accepted 24 June 2014

Available online 2 July 2014

Keywords:

Heart failure

Skeletal muscle

Oxidative stress

NADPH oxidase

Atrophy

ABSTRACT

Background: Skeletal muscle wasting is associated with poor prognosis and increased mortality in heart failure (HF) patients. Glycolytic muscles are more susceptible to catabolic wasting than oxidative ones. This is particularly important in HF since glycolytic muscle wasting is associated with increased levels of reactive oxygen species (ROS). However, the main ROS sources involved in muscle redox imbalance in HF have not been characterized. Therefore, we hypothesized that NADPH oxidases would be hyperactivated in the plantaris muscle of infarcted rats, contributing to oxidative stress and hyperactivation of the ubiquitin-proteasome system (UPS), ultimately leading to atrophy.

Methods: Rats were submitted to myocardial infarction (MI) or Sham surgery. Four weeks after surgery, MI and Sham groups underwent eight weeks of treatment with apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, or placebo. NADPH oxidase activity, oxidative stress markers, NF- κ B activity, p38 MAPK phosphorylation, mRNA and sarcolemmal protein levels of NADPH oxidase components, UPS activation and fiber cross-sectional area were assessed in the plantaris muscle.

Results: The plantaris of MI rats displayed atrophy associated with increased Nox2 mRNA and sarcolemmal protein levels, NADPH oxidase activity, ROS production, lipid hydroperoxides levels, NF- κ B activity, p38 MAPK phosphorylation and UPS activation. NADPH oxidase inhibition by apocynin prevented MI-induced skeletal muscle atrophy by reducing ROS production, NF- κ B hyperactivation, p38 MAPK phosphorylation and proteasomal hyperactivity.

Conclusion: Our data provide evidence for NADPH oxidase hyperactivation as an important source of ROS production leading to plantaris atrophy in heart failure rats, suggesting that this enzyme complex plays key role in skeletal muscle wasting in HF.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Although heart failure (HF) is a syndrome of cardiac origin, it promotes significant skeletal muscle wasting and cachexia in more advanced stages, which contribute to exercise intolerance and poor prognosis [1]. Features that typify skeletal muscle wasting and cachexia in HF include neurohumoral hyperactivation, circulating inflammatory factors, anabolic/catabolic imbalance and oxidative stress [2,3]. However, it is important to highlight that the response to cachectic stimuli differs between muscles with distinct fiber type distribution.

In this sense, glycolytic muscles are more prone to damage than oxidative, which is partially due to a reduced ability to counteract abnormal production of reactive oxygen species (ROS) [4–6]. Indeed, we have previously demonstrated that increased ROS production in glycolytic muscles of HF animals is associated with atrophy and an hyperactivity of ubiquitin-proteasome system (UPS) [7,8], the main muscle proteolytic system involved in several atrophying states [9].

Even though increased ROS production plays a crucial role in skeletal muscle wasting in HF, the sources of increased glycolytic muscle ROS generation have not been identified yet. Among the potential ROS sources, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Nox) comes in light since this enzyme complex is activated by proinflammatory cytokines and neurohumoral factors (e.g. TNF- α and angiotensin II) known to be increased in HF [10–13]. Current knowledge shows that the NADPH oxidase family is composed of seven isoforms, termed Nox1–5 and Duox1 and Duox2. Interestingly, it

* Corresponding author at: Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, Av. Professor Mello Moraes, 65, Butantã, São Paulo 05508-900, Brazil. Tel.: +55 1130913136; fax: +55 1138135921.

E-mail address: pcbrum@usp.br (P.C. Brum).

Review Article

Aerobic Exercise and Pharmacological Therapies for Skeletal Myopathy in Heart Failure: Similarities and Differences

Aline V. Bacurau, Telma F. Cunha, Rodrigo W. Souza, Vanessa A. Voltarelli, Daniele Gabriel-Costa, and Patricia C. Brum

School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, 05508-030 São Paulo, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Patricia C. Brum; pcbrum@usp.br

Received 25 July 2015; Accepted 29 September 2015

Academic Editor: Matthew C. Zimmerman

Copyright © 2016 Aline V. Bacurau et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Skeletal myopathy has been identified as a major comorbidity of heart failure (HF) affecting up to 20% of ambulatory patients leading to shortness of breath, early fatigue, and exercise intolerance. Neurohumoral blockade, through the inhibition of renin angiotensin aldosterone system (RAS) and β -adrenergic receptor blockade (β -blockers), is a mandatory pharmacological therapy of HF since it reduces symptoms, mortality, and sudden death. However, the effect of these drugs on skeletal myopathy needs to be clarified, since exercise intolerance remains in HF patients optimized with β -blockers and inhibitors of RAS. Aerobic exercise training (AET) is efficient in counteracting skeletal myopathy and in improving functional capacity and quality of life. Indeed, AET has beneficial effects on failing heart itself despite being of less magnitude compared with neurohumoral blockade. In this way, AET should be implemented in the care standards, together with pharmacological therapies. Since both neurohumoral inhibition and AET have a direct and/or indirect impact on skeletal muscle, this review aims to provide an overview of the isolated effects of these therapeutic approaches in counteracting skeletal myopathy in HF. The similarities and dissimilarities of neurohumoral inhibition and AET therapies are also discussed to identify potential advantageous effects of these combined therapies for treating HF.

1. Introduction

Heart failure (HF) is a significant cause of morbidity and mortality associated with high health care costs [1]. More than 20 million people worldwide are estimated to have HF, and this situation is more critical considering that the prevalence of HF will rise as the mean age of the population increases [1].

Cardiac cachexia is a serious complication of HF with a prevalence of 16–42% [2] and associated with loss of appetite (anorexia), anemia, systemic inflammation, altered hormones, metabolic abnormalities, and skeletal myopathy. Altogether, these features lead to severe and unintentional body weight loss that occurs in cachectic states. Skeletal myopathy is one of the main features of cardiac cachexia associated with HF progression and severity. It is characterized by abnormalities in skeletal muscle structure and function that include atrophy, a shift toward fast twitch fibers, muscle metabolic dysfunction, and impaired muscle contractility

that, combined, play a major role in shortness of breath, early fatigue, and exercise intolerance observed in HF [3–6].

Chronic muscle underperfusion and/or metabolic disturbance in HF lead to an overactivation of muscle afferents, such as mechano-metaboreceptors [7, 8], exacerbating sympathetic nervous system. Importantly, sustained sympathetic hyperactivity adversely affects muscle performance in HF by altering its metabolic status and limiting oxygen supply to exercising muscle contributing to exercise intolerance [9]. Furthermore, sustained sympathetic hyperactivity increases muscle reactive oxygen species (ROS) production (e.g., by catecholamine autooxidation and activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase-NADPH oxidase) and muscle inflammation [9–15], which contributes to skeletal myopathy in HF [10]. Altogether, these alterations will set up a vicious cycle between skeletal myopathy and progression of HF [6] being addressed as “muscle hypothesis” [16–18]. In fact, the clinical course of HF involves a continuous compensatory activation of neurohumoral systems, such as

Aerobic exercise training rescues cardiac protein quality control and blunts endoplasmic reticulum stress in heart failure rats

Luiz H. M. Bozi ^{a, b}, Paulo R. Jannig ^a, Natale Rolim ^c, Vanessa A. Voltarelli ^a,
Paulo M. M. Dourado ^d, Ulrik Wisløff ^c, Patricia C. Brum ^{a, *}

^a School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^b Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

^c K.G. Jebsen Center of Exercise in Medicine at Department of Circulation and Medical Imaging, Norwegian University of Science and Technology - NTNU, Trondheim, Norway

^d Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Received: February 15, 2016; Accepted: May 4, 2016

Abstract

Cardiac endoplasmic reticulum (ER) stress through accumulation of misfolded proteins plays a pivotal role in cardiovascular diseases. In an attempt to reestablish ER homeostasis, the unfolded protein response (UPR) is activated. However, if ER stress persists, sustained UPR activation leads to apoptosis. There is no available therapy for ER stress relief. Considering that aerobic exercise training (AET) attenuates oxidative stress, mitochondrial dysfunction and calcium imbalance, it may be a potential strategy to reestablish cardiac ER homeostasis. We test the hypothesis that AET would attenuate impaired cardiac ER stress after myocardial infarction (MI). Wistar rats underwent either MI or sham surgeries. Four weeks later, rats underwent to 8 weeks of moderate-intensity AET. Myocardial infarction rats displayed cardiac dysfunction and lung oedema, suggesting heart failure. Cardiac dysfunction in MI rats was paralleled by increased protein levels of UPR markers (GRP78, DERLIN-1 and CHOP), accumulation of misfolded and polyubiquitinated proteins, and reduced chymotrypsin-like proteasome activity. These results suggest an impaired cardiac protein quality control. Aerobic exercise training improved exercise capacity and cardiac function of MI animals. Interestingly, AET blunted MI-induced ER stress by reducing protein levels of UPR markers, and accumulation of both misfolded and polyubiquitinated proteins, which was associated with restored proteasome activity. Taken together, our study provide evidence for AET attenuation of ER stress through the reestablishment of cardiac protein quality control, which contributes to better cardiac function in post-MI heart failure rats. These results reinforce the importance of AET as primary non-pharmacological therapy to cardiovascular disease.

Keywords: exercise • myocardial infarction • endoplasmic reticulum stress • protein quality control

Introduction

Cardiovascular diseases are the main cause of morbidity and mortality worldwide [1]. The mechanisms involved in pathogenesis and progression of cardiovascular diseases include renin angiotensin and sympathetic systems hyperactivation, reduced mitochondrial function and Adenosine triphosphate (ATP) levels, calcium imbalance and increased reactive oxygen species production in hearts of patients and animal models of cardiovascular diseases [2–5]. Such maladaptations disrupt the proper protein folding leading to accumulation of misfolded proteins in endoplasmic reticulum (ER), which intensifies cardiomyocyte and heart dysfunctions [6, 7]. This condition referred as ER stress, triggers the unfolded protein response (UPR). Initially,

UPR inhibits protein synthesis and increases both ER protein folding and degradation capacities, making an effort to reestablish the ER homeostasis [6]. However, if the ER stress persists, prolonged UPR activation leads to apoptotic cell death [6]. Although progression towards apoptotic phase of UPR seems to contribute to onset of heart failure, there are no pharmacological or non-pharmacological strategies available to counteract cardiac ER stress.

Aerobic exercise training (AET) is an efficient adjuvant therapy for prevention and treatment of a variety of cardiovascular diseases, since it improves exercise capacity, cardiac function and attenuates cardiac remodelling [8–10]. In the last years, our lab has demonstrated in heart failure animal models that AET promotes a broad range of cardiac beneficial effects, such as attenuation of calcium imbalance, renin angiotensin and sympathetic systems activation, mitochondrial dysfunction and oxidative stress [2, 3, 11], being a

*Correspondence to: Patricia C. BRUM.
E-mail: pcbrum@usp.br

3. Publicação de capítulos em livros internacionais e nacionais durante o doutorado

Chapter 5

The Cardiovascular Adrenergic System and Physical Exercise

Vanessa Azevedo Voltarelli, Paulo Roberto Jannig, Daniele Gabriel Costa, Luiz Henrique Marchesi Bozi, Carlos Roberto Bueno Júnior and Patricia Chakur Brum

Abbreviations

Akt	Protein kinase B
EC	Excitation–contraction
GRK2	G-protein-coupled kinase-2
HCN4	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
HF	Heart failure
I _{Ca}	L-type Ca ²⁺ channels
NCX	Sarcolemmal Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
NFAT	Calcineurin/nuclear factor of activated T cell
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protein kinase A
PLB	Phospholamban
RyR	Ryanodine receptors
SERCA	SR Ca ²⁺ ATPase
SR	Sarcoplasmic reticulum
T-tubule	Transverse tubule
β-AR	β-Adrenergic receptor

P. C. Brum (✉) · V. A. Voltarelli · P. R. Jannig · D. G. Costa · L. H. M. Bozi
School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, Av. Professor Mello Moraes,
65, Butantã, SP 05508-900, Brazil
e-mail: pcbrum@usp.br

C. R. B. Júnior
School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

© Springer International Publishing Switzerland 2015
A. Lymperopoulos (ed.), *The Cardiovascular Adrenergic System*,
DOI 10.1007/978-3-319-13680-6_5

77

CAPÍTULO 3

Adaptações Fisiológicas ao Treinamento Físico Aeróbico

JOSÉ BIANCO NASCIMENTO MOREIRA

VANESSA AZEVEDO VOLTARELLI

LUIZ HENRIQUE MARCHESI BOZI

CARLOS ROBERTO BUENO JÚNIOR

PATRICIA CHAKUR BRUM

Há séculos o homem tem voltado sua atenção à prática de exercícios físicos. Hipócrates, o mais notável médico da Antiguidade, a partir de suas observações já aconselhava seus pacientes: “É bom acostumar-se à fadiga, à corrida de duplo-estádio, sem forçar a passada”.

Registros mais recentes, notoriamente das últimas cinco décadas, indicam que a prevalência de doenças crônicas é crescente, com grande destaque para os acometimentos cardiovasculares derivados em grande parte do estilo de vida adotado pelo ser humano em sua evolução e uma das principais causas de morte no planeta. Os avanços tecnológicos permitiram que tivéssemos acesso a equipamentos que facilitassem a execução das atividades costumeiras, com um gasto mínimo de energia, além disso, o armazenamento de alimentos por longos períodos nos garantiu que o acesso a eles se desse com o mínimo de dispêndio energético. Assim, a sobrevivência humana é cada dia menos dependente do esforço físico.

Apesar disso, atualmente se sabe que a prática de exercícios físicos é altamente benéfica ao organismo humano, sendo capaz de retardar o aparecimento de doenças cardiovasculares ou melhorar o prognóstico de indivíduos acometidos, melhorando a qualidade de vida e aumentando a longevidade dos praticantes.

6

Exercício físico na insuficiência cardíaca

Patricia Chakur Brum

Juliane Cruz Campos

Luiz Roberto Grassmann Bechara

Paulo Roberto Jannig

Vanessa Azevedo Voltarelli

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de alta incidência e mau prognóstico que resulta da incapacidade do coração em bombear quantidades adequadas de sangue para manter a demanda metabólica do organismo. Ela é caracterizada pela diminuição do débito cardíaco (DC) associada à hiperatividade dos sistemas neuro-humorais e alterações periféricas secundárias¹.

Considerada a via final comum da maioria das cardiomiopatias e outras doenças do aparelho circulatório, a IC representa um importante problema de saúde pública no Brasil em virtude de sua crescente prevalência e morbimortalidade associada². Segundo dados do Siste-