UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

“Caracterização da disfunção cardíaca induzida pelo estresse do
retículo endoplasmático: papel do treinamento físico aeróbico”

Luiz Henrique Marchesi Bozi

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

“Caracterização da disfunção cardíaca induzida pelo estresse do
retículo endoplasmático: papel do treinamento físico aeróbico”

Luiz Henrique Marchesi Bozi

São Paulo
2015

LUIZ HENRIQUE MARCHESI BOZI

“Caracterização da disfunção cardíaca induzida pelo estresse do retículo endoplasmático: papel do treinamento físico aeróbico”

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

Área de concentração:
Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Patricia Chakur Brum

Coorientadora:
Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Moraes Barretos de Chaves

SÃO PAULO

2015

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Bozi, Luiz Henrique Marchesi

Caracterização da disfunção cardíaca induzida pelo estresse
do retículo endoplasmático: papel do treinamento físico aeróbio /
Luiz Henrique Marchesi Bozi. – São Paulo :[s.n.], 2015.
161p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e
Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profª. Dra. Patrícia Chakur Brum.

1. Infarto do miocárdio 2. Treinamento físico
3. Retículo endoplasmático I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: BOZI, Luiz Henrique Marchesi

Título: Caracterização da disfunção cardíaca induzida pelo estresse do retículo endoplasmático: papel do treinamento físico aeróbico

Tese apresentada a Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para 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: _____

À minha mãe, Dora, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Agradecimentos

À Professora Patricia Brum, por ter tornado meu sonho de ser doutor pela Universidade de São Paulo realidade, pelas horas de orientação, pelos conselhos, profissionais ou não, pela preocupação com a minha formação e por ter contribuído para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigado por acreditar em mim e por ser esse exemplo de pessoa e profissional.

À minha irmã, Tais, pelo apoio e amor.

À minha namorada, Juliane, pelo carinho, incentivo e apoio.

A todos os amigos e familiares que sempre torceram e fazem parte da minha vida.

À família “República filhos de Patrícia”, Bechara, Van, Paulo, Ivetyinha e Carmão, pelo convívio e por poder contar sempre com vocês.

Aos moradores da “Eh Dokks”, Jhowanni, Jhow Ricardo e Jhow Thiago, por todo o suporte e diversão durante o ano em que passei na Noruega.

Ao Prof. Antônio José Natali, por ter despertado meu interesse pelo meio científico e pelos anos de orientação.

Ao Prof. Ulrik Wisloff por ter disponibilizado seu laboratório para realização do meu estágio de doutorado no exterior.

À Professora Maria Luiza e à Ana Paula Takano pela colaboração nesse projeto.

Aos meus colegas de laboratório Chris, Aline, Nathalie, Fabi, Max, Alessandra, Fafá, Telma, Dani, Stéphan, Clara, Úrsula, Vander, Tiago, Fe, Casa, João, Larissa, Gabriel, Katia, Anne Berit, Ana Maria, Bianco, Gury, Morten, Kine, Trude, Ana Paula, Carolzinha, Ivson e Vanis.

À Natale, Gusão, Bianco e Marcinha, pela hospitalidade, orientação e pelas várias aulas de norueguês.

Aos técnicos Alex, Ney Robs, Katt, Marcelle, Luciano, Úrsula, Glorinha, Marina, Ragnhild e Toril.

Ao Dr. Paulo Magno Dourado, pela realização das avaliações ecocardiográficas.

À todos os funcionários da Escola de Educação física e Esporte da USP, em especial aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Ilza, Márcio, Mariana e Paulo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

BOZI, L.H.M. **Caracterização da disfunção cardíaca induzida pelo estresse do retículo endoplasmático: papel do treinamento físico aeróbico**. 2015. 161 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo. 2015.

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, sendo a cardiomiopatia isquêmica a mais prevalente. Independente da sua etiologia, a via final comum da maioria das doenças cardiovasculares é a insuficiência cardíaca. Nos últimos anos, tem sido reportado que o acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático (estresse do RE) pode contribuir para redução da função cardíaca e instalação da insuficiência cardíaca. Apesar do mecanismo responsável pela disfunção contrátil induzida pelo estresse do RE ainda não ser conhecido, evidências sugerem que a inibição da via de sinalização PI3K/AKT pela proteína JNK pode estar envolvida nessa resposta. Na primeira parte desta tese, verificamos que a indução do estresse do RE em cardiomiócitos isolados ativou a JNK, mas não inibiu a via de sinalização PI3K/AKT. A inativação de JNK reverteu a disfunção contrátil e a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos causados pelo estresse do RE. Pelo fato da via sinalização PI3K/AKT não estar envolvida na disfunção contrátil causada pelo estresse do RE, analisamos outro alvo de JNK, a proteína BNIP3, proteína pró-apoptótica e envolvida no controle de qualidade mitocondrial promovendo mitofagia quando ativada. O estresse do RE aumentou a expressão de BNIP3, a qual foi atenuada pela inibição de JNK. A depleção de BNIP3 impediu a disfunção contrátil dos cardiomiócitos e a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} induzidos pelo estresse do RE. Na segunda parte da tese, o objetivo foi avaliar se os efeitos observados em cardiomiócitos submetidos a estresse do RE poderiam ser observados em modelo experimental de doença cardiovascular. Nesse sentido, observamos que a disfunção cardíaca provocada pelo infarto do miocárdio em ratos foi acompanhada pelo quadro de estresse do RE e pela ativação da via de sinalização JNK/BNIP3. Entretanto, o treinamento físico aeróbico (TFA), uma das principais terapias não farmacológicas mais eficazes das doenças cardiovasculares, foi capaz de atenuar o estresse RE, a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 e a disfunção cardíaca de ratos infartados. Na terceira parte da tese, verificamos que o TFA aumentou a expressão proteica de DERLIN-1, uma proteína que atua retro-translocando proteínas mal enoveladas para o citosol, no miocárdio de ratos saudáveis. O aumento dos níveis proteicos de DERLIN-1 observado em ratos infartados foi atenuado pelo TFA. Apesar do aumento da proteína DERLIN-1, observamos que nos animais infartados as proteínas mal enoveladas acumulavam na forma de oligômeros e que o TFA atenuou essa resposta. Em conjunto, os resultados da presente tese sugerem que a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 pelo estresse do RE causa disfunção contrátil de cardiomiócitos e que o TFA é capaz de atenuar essa resposta no coração de ratos infartados, melhorando o controle de qualidade de proteína no músculo cardíaco.

Palavras chaves: infarto do miocárdio, treinamento físico aeróbico, estresse do RE, BNIP3, disfunção cardíaca

ABSTRACT

BOZI, L.H.M. **Characterization of endoplasmic reticulum stress-induced cardiac dysfunction: role of aerobic exercise training**. 2015. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo. 2015.

Cardiovascular diseases are currently the main cause of death worldwide, with the ischemic cardiomyopathy as the most prevalent etiology. This is of particular interest, since ischemic cardiomyopathy advances to heart failure, a common endpoint of the most cardiovascular disease. In the last years, it has been showed that accumulation of unfolded protein in the endoplasmic reticulum (ER stress) may cause cardiac dysfunction and heart failure development. Despite the mechanisms behind this cardiac deterioration is still unknown, evidences suggest that ER stress-induced cardiomyocytes contractile dysfunction results from PI3K/AKT signaling pathway inhibition, which would be caused by JNK activation. In the first part of this thesis, we found that the ER stress activated JNK, but different from our hypothesis it was not accompanied by an inactivation of PI3K/AKT signaling pathway. The inhibition of JNK mitigated the reduction in cardiomyocytes shortening and amplitude of Ca^{+2} transient caused by ER stress. Once the PI3K/AKT signaling pathway was not involved in the ER stress-induced cardiomyocytes contractile dysfunction, we have analyzed protein expression of BNIP3, another JNK target involved in apoptosis and mitochondria quality control. We observed that the elevation in BNIP3 proteins levels after ER stress induction was prevented by inhibition of JNK. BNIP3 depletion attenuated the reduction in cardiomyocytes contractility and amplitude of Ca^{+2} transient induced by ER stress. In the second part of the thesis, we found that myocardial infarction-induced cardiac dysfunction in rats was accompanied by ER stress and activation of JNK/BNIP3 signaling pathway. However, the AET mitigated ER stress, activation of JNK/BNIP3 signaling pathway and cardiac dysfunction in infarcted rats. In third part of the thesis, we have identified that AET increased the protein expression of DERLIN-1 an ER membrane protein that retro-translocates unfolded proteins to cytosol in the myocardial of healthy rats. We observed that the increased DERLIN-1 protein levels in infarcted rats were mitigated by AET. Despite increased DERLIN-1 protein expression, we found high levels of oligomers in the myocardium of infarcted rat, which was reduced by AET. It suggests that unfolded protein degradation was reduced in infarcted hearts. Taken together, these results suggest that ER stress causes cardiomyocytes contractile dysfunction through JNK/BNIP3 signaling pathway activation and that AET mitigates the myocardial infarction-induced ER stress and activation of JNK/BNIP3 signaling pathway by restoring of ER-associated protein quality control in the cardiac muscle.

Keywords: Myocardial infarction, cardiac dysfunction, cardiomyocytes, aerobic exercise training, endoplasmic reticulum stress.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ativação da UPR	24
FIGURA 2 - Vias de sinalização envolvidas na morte celular durante a fase de apoptose da UPR.....	26
FIGURA 3 - Alterações intracelulares provocadas pelas doenças cardiovasculares de etiologia hipertrófica e isquêmica que causam o estresse do RE (Adaptado de TOTH et al. (2007)).....	28
FIGURA 4 - Sequência experimental referente a etapa 1 do estudo.....	40
FIGURA 5 - Avaliação da fosforilação de AKT e da expressão da proteína normalizadora GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) em cardiomiócitos incubados com 0, 10, 20 ou 30 μ M de PI3K α inibitor II por 15 horas.....	41
FIGURA 6 - Avaliação da expressão proteica de BNIP3 em cardiomiócitos isolados incubados com 0, 12,5 ou 25 pmol de siRNA (small interfering RNA) para BNIP3 por 24 horas.....	45
FIGURA 7 - Sequência experimental referente a etapa 2 do estudo.....	46
FIGURA 8 - Expressão das proteínas A) GRP78 e B) CHOP em cardiomiócitos isolados incubados com 1, 10 ou 20 μ g/ml de tunicamicina por 15 horas.....	57
FIGURA 9 - Contratilidade de cardiomiócitos isolados tratados com 1, 10 e 20 μ g/ml de tunicamicina por 15 horas.....	58
FIGURA 10 - Transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados tratados com 1, 10 e 20 μ g/ml de tunicamicina por 15 horas.....	60
FIGURA 11 - Expressão das proteínas A) GRP78 e B) CHOP em cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M), PI3K α inibitor II (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	62
FIGURA 12 - Níveis proteicos de A) JNK, B) JNK fosforilada nos sítios Thr183/Tyr185, C) AKT e D) AKT fosforilada no sítio Ser ⁴⁷³ em cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M), PI3K α inibitor II (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	64
FIGURA 13 - Contratilidade de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M), PI3K α inibitor II (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	67
FIGURA 14 - Transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M), PI3K α inibitor II (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	69

FIGURA 15 - Expressão proteica de BNIP3 em cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	71
FIGURA 16 - Expressão proteica de A) BNIP3, B) GRP78 e C) CHOP em cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com siRNA para BNIP3 (12,5 pmol) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	73
FIGURA 17 - Contratilidade de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com siRNA para BNIP3 (12,5 pmol) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	75
FIGURA 18 - Transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com siRNA para BNIP3 (12,5 pmol) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	78
FIGURA 19 - Níveis proteicos de A) Canal de Ca^{+2} tipo-L, subunidade β 1A, B) Trocador Na^{+}/Ca^{+2} (NCX1), C) SERCA2, D) Fosfolambam (PLB) e E) PLB fosforilada nos sítios Ser ¹⁶ /Thr ¹⁷ , de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com siRNA para BNIP3 (12,5 pmol) e tunicamicina (10 μ g/ml).....	80
FIGURA 20 - Distância máxima percorrida pelos animais dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, , n = 5) no teste de tolerância ao esforço realizado pré e pós o treinamento físico aeróbico.....	84
FIGURA 21 - Expressão proteica de A) GRP78 e B) CHOP no miocárdio dos ratos dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, n = 5).....	88
FIGURA 22 - Níveis proteicos de A) JNK, B) JNK fosforilada e C) BNIP3 no miocárdio dos ratos dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, n = 5).....	90
FIGURA 23 - Expressão proteica de A) GRP78, B) DNAJC3, C) CHOP, D) VCP e E) DERLIN-1 no coração de ratos sedentários (SED, n = 6) e treinados (TF, n = 5).....	102
FIGURA 24 - Expressão proteica de DERLIN-1 no coração dos ratos dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, n = 5).....	104
FIGURA 25 - Níveis de oligômeros solúveis no coração dos ratos dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, n = 5).....	105

FIGURA 26 - Efeito do infarto do miocárdio (setas vermelhas) e do treinamento físico aeróbico (setas azuis) no estresse do RE, na via de sinalização JNK/BNIP3 e contratilidade cardíaca..... 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Soluções utilizadas para o isolamento de cardiomiócitos.....	40
Tabela 2 -	Lista de genes analisados no PCR array.....	51
Tabela 3 -	Parâmetros ecocardiográficos.....	83
Tabela 4 -	Características gerais dos animais.....	86
Tabela 5 -	Massa tecidual e distância percorrida.....	93
Tabela 6 -	Perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR.....	94

LISTA DE ABERVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AKT	<i>Protein Kinase B</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BNIP3	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3</i>
Ca ²⁺	Cálcio
CAMKII	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
DNAJC3	<i>DnaJ homolog subfamily C member 3</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic initiation factor 2-alpha</i>
ERAD	<i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERO1 α	<i>Endoplasmic Reticulum oxidase 1α</i>
FOXO3a	<i>Forkhead box O3a</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GRP78	<i>Glucose-regulated protein 78</i>
IC	Insuficiência cardíaca
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IM	Infarto do miocárdio

IRE-1	<i>Inositol-Requiring Protein-1</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
NCX1	<i>Sodium calcium exchanger 1</i>
PDI	<i>Protein disulfide isomerase</i>
PERK	<i>Protein kinase R-like ER kinase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3 kinase</i>
PLB	<i>Phospholamban</i>
RE	Retículo endoplasmático
RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA2	<i>Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>
TFA	Treinamento físico aeróbico
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VCP	<i>Valosin-containing protein</i>
XBP-1	<i>X box protein 1</i>

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABERVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	15
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Fisiopatologia do IM	20
2.2 O estresse do RE	22
2.2.1 A UPR: fase de adaptação	22
2.2.2 A fase de apoptose da UPR	25
2.4 O estresse do RE e a disfunção contrátil de cardiomiócitos	31
2.5 Estresse do RE e sua relação com a via de sinalização PI3K/Akt	32
2.6 O TFA como adjuvante no tratamento das doenças cardiovasculares	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Geral	38
3.2 Específicos	38
4 MÉTODOS	39
4.1 Primeira etapa	39
4.1.1 Isolamento dos cardiomiócitos de ratos adultos e tratamentos	39
4.1.2 Análise da expressão proteica (<i>Western blotting</i>)	42
4.1.3 Análise da contratilidade de cardiomiócitos isolados	43
4.1.4 Análise do transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados	44
4.1.5 <i>Small interfering RNA</i> (siRNA)	44
4.2 Segunda etapa	45
4.2.1 Animais de experimentação e tratamento	45
4.2.2 Teste de corrida em esteira rolante	46
4.2.3 Protocolo de treinamento físico em esteira rolante	47
4.2.4 Análise ecocardiográfica	47
4.2.5 Avaliação do tamanho do IM	48
4.2.6 Análise da expressão proteica (<i>Western blotting</i>)	48
4.3 Terceira etapa	49
4.3.1 Animais de experimentação e tratamento	49
4.3.2 Teste de corrida em esteira rolante	50
4.3.3 Análise da expressão de genes envolvidos na UPR (<i>PCR array</i>)	50
4.3.4 Análise da expressão proteica (<i>Western blotting</i>)	53
4.3.5 Avaliação dos níveis de oligômeros solúveis (<i>Slot blot</i>)	54
4.4 Análise estatística	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Primeira etapa	56
5.1.1 Efeito de diferentes doses de tunicamicina na expressão proteica dos marcadores de estresse do RE	56
5.1.2 Efeito do estresse do RE na contratilidade de cardiomiócitos isolados	57

5.1.3	Efeito do estresse do RE no transiente de Ca^{+} de cardiomiócitos isolados.....	59
5.1.4	Papel do estresse do RE na inibição da via de sinalização PI3K/AKT	61
5.1.5	Participação da proteína JNK na disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados induzida pelo estresse do RE	65
5.1.6	Efeito da inibição da proteína JNK na alteração do transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos em resposta ao estresse do RE.....	68
5.1.7	Efeito da ativação de JNK em resposta ao estresse do RE, na expressão da proteína BNIP3.....	70
5.1.8	Efeito da proteína BNIP3 na expressão dos marcadores de estresse do RE	71
5.1.9	Papel da proteína BNIP3 na disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados induzida pelo estresse do RE	74
5.1.10	Efeito da atenuação da expressão proteica de BNIP3 na alteração do transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados em resposta ao estresse do RE	77
5.1.11	Expressão de proteínas envolvidas na regulação da dinâmica do Ca^{+2} em cardiomiócitos com estresse do RE	79
5.2	Segunda etapa	81
5.2.1	Parâmetros ecocardiográficos	82
5.2.2	Avaliação da tolerância a realização de esforço físico	84
5.2.3	Massa tecidual e tamanho do IM.....	85
5.2.4	Efeito do TFA no estresse do RE e na ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 no coração de ratos infartados	87
5.3	Terceira etapa	92
5.3.1	Massa tecidual e tolerância a realização de esforço físico.....	92
5.3.2	Perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR	93
5.3.3	Expressão proteica de genes envolvidos na UPR no coração de ratos treinados	101
5.3.4	Expressão proteica de DERLIN-1 e níveis de oligômeros solúveis no coração de ratos infartados submetidos ao TFA	103
6	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	106
7	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
	APÊNDICES.....	119

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, com impacto direto nos sistemas de saúde pública e financeiro (WHO, 2011). Dentre as doenças do aparelho circulatório, a doença arterial coronariana é a mais prevalente e tem o infarto do miocárdio (IM) como principal causa (HUNT et al., 2005; GO et al., 2014). Entretanto, independente da sua etiologia, a maioria das doenças cardiovasculares tem como via final comum a insuficiência cardíaca (IC).

Nos últimos anos, o estudo de anormalidades celulares associadas à disfunção ventricular tornou-se grande foco de interesse para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela disfunção cardíaca nas doenças cardiovasculares (HOUSER e MARGULIES, 2003; CARNEIRO-JUNIOR et al., 2013; GOMES et al., 2014). Nesse sentido, foi demonstrado que diferentes tipos de doenças cardiovasculares, dentre elas o IM, interferem no enovelamento de proteínas, causando o acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo endoplasmático (RE) (GLEMBOTSKI, 2007; GROENENDYK et al., 2010).

Esse quadro, conhecido como estresse do RE, ativa uma complexa via de sinalização intracelular, conhecida como resposta às proteínas mal enoveladas (*Unfolded Protein Response* - UPR), que se constitui, em um primeiro momento, em mecanismo de defesa que tem por objetivo restaurar a proteostase do RE. Entretanto, o acúmulo excessivo ou prolongado de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE ativa uma resposta patológica envolvida no processo de morte celular (GLEMBOTSKI, 2007; TOTH et al., 2007; GLEMBOTSKI, 2008; GROENENDYK et al., 2010).

Neste sentido, estudos têm reportado que alterações na homeostase do RE podem causar disfunção cardíaca e contribuir para o desenvolvimento da IC (OKADA et al., 2004; HAMID et al., 2010; ZHANG et al., 2011). Contudo, ainda pouco se sabe sobre as vias de sinalização intracelulares que participam dessa resposta.

Nesse contexto, o treinamento físico aeróbico (TFA) é, atualmente, uma das principais estratégia de prevenção e tratamento das doenças

cardiovasculares. Nos últimos anos, trabalhos do nosso e de outros grupos de pesquisa demonstraram que o TFA promove importantes adaptações cardiovasculares que contribuem para atenuação da disfunção cardíaca e prevenção da IC (JUDGE et al., 2005; BOVERIS e NAVARRO, 2008; MEDEIROS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; CAMPOS et al., 2012; BOZI et al., 2013). Além disso, essas adaptações também podem contribuir para redução do acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE. Entretanto, ainda não é conhecido se uma possível atenuação do estresse do RE pelo TFA está associada a uma melhora da função cardíaca de corações infartados.

Assim, na primeira parte dessa tese, caracterizamos a via de sinalização pela qual o estresse do RE leva a disfunção contrátil em cardiomiócitos isolados. Na segunda parte, investigamos se a via de sinalização envolvida na disfunção contrátil dos cardiomiócitos isolados estaria alterada em modelo experimental de IM em ratos, e se o TFA seria capaz de atenuar essa resposta. Por fim, na terceira parte, caracterizamos o mecanismo envolvido na atenuação do estresse do RE pelo TFA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiopatologia do IM

As doenças cardiovasculares são atualmente as principais causas de morte e incapacidade física no Brasil e no mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, 26,8% dos óbitos ocorridos no ano de 2004 tiveram como causa a doença arterial coronária (WHO, 2004). Nos Estados Unidos, estimou-se que 3,6% da população sofriam de IM no ano de 2006, com uma previsão de custos diretos e indiretos na ordem de 11,7 bilhões de dólares para o tratamento de pacientes com algum tipo de doença cardíaca coronariana (LLOYD-JONES et al., 2010). Segundo dados do DATASUS, no ano de 2007 ocorreram 308.466 óbitos no Brasil devido a doenças do aparelho circulatório, o que representou aproximadamente 30% dos óbitos ocorridos no Brasil naquele ano.

Dentre as doenças cardiovasculares de diferentes etiologias, destaca-se

o IM como a mais prevalente (DATASUS). O IM é causado pela obstrução parcial ou total das artérias coronárias que irrigam o miocárdio. Quando o fluxo coronariano é obstruído, parte do tecido cardíaco deixa de receber oxigênio e nutrientes provocando necrose tecidual.

A morte de uma determinada área do tecido cardíaco induz um rearranjo estrutural e molecular, além de ativação dos sistemas neuro-humorais, na tentativa de reparar a área lesada e restaurar a função cardíaca (MILL et al., 1990; DAYAN et al., 2005; DOBACZEWSKI, GONZALEZ-QUESADA e FRANGOIANNIS, 2009; BRUM et al., 2011). Inicialmente, essa resposta é compensatória, mas com o passar do tempo, a hiperatividade neuro-humoral torna-se tóxica, agravando ainda mais a disfunção cardíaca. Nesse estágio da doença destacam-se alguns sintomas, como por exemplo: redução do débito cardíaco, intolerância ao exercício físico e falta de ar, que sugerem a instalação de um quadro de IC (BRAUNWALD e BRISTOW, 2000; FRANCIS, 2001; ROLIM et al., 2007). Neste sentido, foram diversos os mecanismos propostos para explicar a instalação da IC e de uma forma geral, foi demonstrado que essa síndrome estava associada a: distúrbios neuro-hormonais, alteração da estrutura e reatividade vascular, alteração metabólica e morte celular (HOUSER e MARGULIES, 2003). Apesar desses fatores, de fato, contribuírem para o agravamento da disfunção cardíaca, ainda pouco se sabe sobre o que acontece e quais são as vias de sinalização envolvidas na redução da contratilidade dos cardiomiócitos durante a progressão do IM.

Nos últimos anos, a comunidade científica voltou sua atenção para o entendimento das alterações intracelulares envolvidas na disfunção cardíaca (CARNEIRO-JUNIOR et al., 2013; GOMES et al., 2014). Nesse sentido, foi demonstrado que os diferentes tipos de acometimentos cardiovasculares interferem no enovelamento de proteínas, causando o estresse do retículo RE, o qual provoca disfunção cardíaca e parece contribuir para o desenvolvimento da IC (OKADA et al., 2004; GLEMBOTSKI, 2007; GROENENDYK et al., 2010).

2.2. O estresse do RE

O RE é uma organela que participa de diversos processos intracelulares. Por este motivo, seu funcionamento de maneira adequada é de importância fundamental para a manutenção da homeostase celular. Entretanto, alguns fatores ambientais ou genéticos, tais como, depleção de Ca^{+2} , distúrbios metabólicos, estresse oxidativo e redução dos níveis de ATP intracelular, prejudicam o enovelamento de proteínas no RE e provocam o seu acúmulo no lúmen dessa organela. Esse quadro é conhecido como estresse do RE e está associado a várias doenças, dentre elas as cardiovasculares (GLEMBOTSKI, 2007; TOTH et al., 2007; GROENENDYK et al., 2010; KITAKAZE e TSUKAMOTO, 2010).

As células eucariontes, entretanto, desenvolveram um mecanismo sofisticado para o restabelecimento da homeostase celular em resposta ao estresse do RE. Esse mecanismo, conservado entre as diferentes espécies, é conhecido como UPR e dá início a uma cascata de sinalização para ativar vários fatores de transcrição, os quais induzem a síntese de proteínas envolvidas no aumento da capacidade celular de enovelar e degradar proteínas, além de inibir a síntese de novas cadeias polipeptídicas até que a homeostase dessa organela seja restabelecida (Figura 1) (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; GLEMBOTSKI, 2007; TOTH et al., 2007; GLEMBOTSKI, 2008).

2.2.1. A UPR: fase de adaptação

A UPR é uma complexa via de sinalização intracelular que funciona como um mecanismo de controle de qualidade para impedir o acúmulo de cadeia polipeptídicas mal enoveladas no RE (GLEMBOTSKI, 2007; TOTH et al., 2007; GLEMBOTSKI, 2008; GROENENDYK et al., 2010).

Um componente importante dessa cascata de sinalização é a GRP78 (*Glucose-regulated protein 78*). Essa proteína é uma chaperona presente no RE que além de participar do enovelamento ou re-enovelamento de cadeias polipeptídicas, atua como sensor detectando o acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen dessa organela. Em condições normais, a GRP78

encontra-se ligada a três proteínas transmembrana, PERK (*Protein kinase R-like ER kinase*), IRE-1 (*Inositol-Requiring Protein-1*) e ATF6 (*Activating transcription factor 6*), as quais atuam como efetores da UPR. Nesse estado, as três proteínas transmembrana são inativas e incapazes de iniciar a cascata de reação da UPR. Entretanto, quando fatores ambientais ou genéticos perturbam a homeostase do RE, provocando o acúmulo de proteínas mal enoveladas, a GRP78 se desliga das proteínas transmembrana, permitindo que elas iniciem a UPR (Figura 1) (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; GLEMBOTSKI, 2007).

A PERK é uma proteína quinase que quando ligada à GRP78 encontra-se na forma monomérica, contudo, em situações de estresse do RE, a GRP78 se desliga dos monômeros de PERK para participar do enovelamento de proteínas. A translocação da GRP78 promove a ativação da PERK, pois permite sua dimerização e autofosforilação. Uma vez ativada, PERK promove a fosforilação na serina 51 do eIF2 α (*Eukaryotic Initiation Factor 2 α*), um fator de alongamento ribossomal, fato que impede que novas cadeias polipeptídicas entrem no RE devido a inibição da maquinaria de tradução de RNAm (Figura 1). Além disso, a inibição do eIF2 α permite que o fator de transcrição ATF4 (*Activating transcription factor 4*) seja expresso. Este, por sua vez, vai atuar no núcleo das células induzindo a expressão de proteínas que auxiliem na redução do estresse do RE, como, por exemplo, translocadores proteicos e chaperonas do RE (Figura 1) (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; GLEMBOTSKI, 2007).

A IRE-1, assim como a PERK, está presente na forma monomérica e ligada a GRP78 na ausência de estresse. A dissociação de GRP78 também provoca sua dimerização e autofosforilação. Entretanto, além da atividade de quinase apresentada por PERK, a IRE-1 tem função de endoribonuclease que permite atuar no processamento do RNAm da XBP1 (*X box protein 1*). Quando processado, o RNAm da XBP1 codifica a forma ativa da XBP1, a qual atua como fator de transcrição promovendo a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse do RE (Figura 1) (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005).

Figura 1. Ativação da UPR. O acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE provoca o desligamento da GRP78 dos sensores presentes na membrana dessa organela. Na ausência da GRP78, a PERK e a IRE-1 são ativadas e iniciam uma cascata de reação que culmina na inibição da tradução de RNAm e ativação da transcrição gênica. Quando a GRP78 se desliga, a ATF6 é translocada para o Complexo de Golgi, onde ela será clivada. Sua porção citoplasmática migrará para o núcleo onde irá atuar como um fator de transcrição. Durante a fase de adaptação da UPR (setas verdes) ocorre a transcrição de genes envolvidos no aumento da capacidade celular de degradar e enovelar proteínas, além da inibição da tradução de RNAm. Entretanto, quando o estresse do RE é prolongado ou intenso a própria UPR ativa vias de sinalização envolvidas no processo de morte celular (setas vermelhas).

A ATF6, por sua vez, é encontrada na forma de dímero quando ligada a GRP78. Contudo, a dissociação da GRP78 provoca sua translocação para o complexo de Golgi, onde a ATF6 será clivada pela ação de duas proteases, *site 1* e *site 2*. Sua porção citoplasmática é liberada no citosol e, em seguida, translocada para o núcleo onde atua na regulação de genes envolvidos na

UPR, como, por exemplo, da XBP1 (Figura 1) (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; GROENENDYK et al., 2010).

De uma forma geral, a UPR em um primeiro momento induz a expressão de genes envolvidos nos processos de enovelamento de proteínas, degradação de proteínas associada ao RE (ERAD – endoplasmic reticulum-associated degradation) e controle da transcrição e tradução (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; GLEMBOTSKI, 2007; GROENENDYK et al., 2010). Essa resposta tem como objetivo adaptar as células a uma determinada alteração nos fatores ambientais ou genéticos, no sentido de restabelecer o funcionamento normal do RE, restaurar a homeostase celular e aumentar a sobrevivência. Contudo, em alguns casos essa resposta adaptativa pode falhar, devido ao acúmulo prolongado e/ou excessivo de proteínas mal enoveladas no RE. Como resultado, a própria UPR ativa vias de sinalização envolvidas no processo de morte celular (Figura 1 e 2).

2.2.2. A fase de apoptose da UPR

O progresso da fase de adaptação para a fase de apoptose da UPR está relacionado à indução de outros fatores de transcrição e a ativação direta de proteases, quinases e proteínas da família da Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; GLEMBOTSKI, 2007; GROENENDYK et al., 2010). Até o momento, sabe-se que essa resposta é coordenada, principalmente, pela atividade das proteínas IRE-1 e CHOP (*C/EBP homologous protein*) (TABAS e RON, 2011).

Apesar de participar da fase de adaptação da UPR, promovendo o *splicing* do RNAm da XBP1 (Figura 1), a IRE-1, quando o estresse do RE torna-se irreversível, dá início à apoptose por meio da ativação da quinase JNK (*Jun N-terminal kinase*). Quando ativada, a JNK inibe as proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 e Bcl-x, e ativa a Bim, uma proteína pró-apoptótica (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005) (Figura 2). Além disso, a IRE-1 cliva a caspase-12 para sua forma ativa, a qual também está envolvida no processo de morte celular programada (NAKAGAWA et al., 2000; XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005) (Figura 2).

Figura 2. Vias de sinalização envolvidas na morte celular durante a fase de apoptose da UPR. O acúmulo prolongado ou excessivo de proteínas mal enoveladas no RE induz a apoptose celular, a qual é coordenada pelos três efetores da UPR. A IRE-1 induz a apoptose por meio da ativação da caspase 12 e de JNK, que, por sua vez, inibe a Bcl-2 e ativa Bim. A Bim é uma proteína pró-apoptótica que participa da liberação do citocromo c das mitocôndrias. A Bcl-2 inibe a ação da Bim, bloqueando a liberação do citocromo c. Além disso, a IRE-1, assim como a PERK e a ATF6, ativa a CHOP, uma proteína que promove a apoptose, mediante a inibição de Bcl-2 e o aumento da expressão da ERO1α. Essa última induz a liberação de Ca^{2+} do RE pelo IP3R1. No citosol o Ca^{2+} ativa a CaMKII, a qual vai causar a liberação do citocromo c e, consequentemente, a apoptose celular.

CHOP, por sua vez, é um fator de transcrição expresso durante a fase de apoptose do estresse do RE. Seu gene tem sítios de ligação para os três principais efetores da UPR, ATF6, ATF4 e XBP1. Além disso, JNK e MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) p38, ambos ativados por IRE-1, aumentam sua atividade transcrricional e apoptótica. A forma como a CHOP induz a apoptose ainda não está totalmente clara, entretanto, isso pode ser explicado, pelo menos em parte, pela inibição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e pela indução de GADD34, Bax, Puma e Bim, as quais são proteínas pró-apoptóticas (Figura 2) (GOTOH et al., 2004; XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; GLEMBOTSKI, 2007; TABAS e RON, 2011).

Outro possível mecanismo envolvido na apoptose induzida por CHOP é o aumento da expressão de ERO1 α (*Endoplasmic reticulum oxidase 1 α*) (MARCINIAK et al., 2004). Essa proteína está envolvida na formação das pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas recém sintetizadas (MARCINIAK et al., 2004). Especula-se que em situações de estresse a ERO1 α torna o lúmen do RE hiperoxidado, o que causa danos à célula e ativa o processo apoptótico (TABAS e RON, 2011). Além disso, foi demonstrado que a ERO1 α promove a liberação de Ca⁺² do RE pelo IP3R1 (*Inositol1,4,5 trisphosphate receptor type 1*) (LI et al., 2009) (Figura 2). Esse aumento do Ca⁺² citosólico em resposta ao estresse do RE ativa a proteína CaMKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*) que, por sua vez, promove a apoptose por meio do extravasamento para o citoplasma do citocromo c mitocondrial (TIMMINS et al., 2009) (Figura 2).

2.3. Papel do estresse do RE na fisiopatologia das doenças cardiovasculares

O conceito de estresse de RE foi descrito há mais de duas décadas (KOZUTSUMI et al., 1988), porém apenas recentemente sua relação com as doenças cardiovasculares tornou-se objeto de pesquisa (BELMONT et al., 2010; GROENENDYK et al., 2010).

Nos cardiomiócitos, o RE apesar de ser reconhecido como uma organela multifuncional, assim como nas demais células eucariontes, apresenta-se como uma organela intracelular especializada na regulação do fluxo de Ca⁺² e controle do processo de acoplamento excitação-contração (BERS, 2002). Por muitas décadas o Retículo Sarcoplasmático (RS) foi considerado um termo único para essa forma especializada de RE presente nas células musculares. Contudo, ainda não está claro se o RS reflete apenas uma característica funcional específica do RE muscular ou se o RE existe como uma organela separada do tradicional RS. Evidências de que a síntese proteica pode ocorrer no RS e de que pelo menos parte do RS é contíguo ao RE perinuclear sugerem o RS como parte integrante do RE (VOLPE et al., 1992; KAISTO e METSIKKO,

2003). Por este motivo, utilizarei o termo RE quando estiver me referindo ao RS dos cardiomiócitos.

As primeiras evidências de que o estresse do RE estava associado às doenças cardiovasculares foram observadas em diferentes modelos animais (OKADA et al., 2004; AZFER et al., 2006; THUERAUF et al., 2007). Contudo, a forma como as diferentes doenças cardiovasculares interferem no enovelamento das proteínas apresenta relação direta com a etiologia da doença. Especula-se que na cardiomiopatia hipertrófica, o acúmulo de cadeias polipeptídicas mal enoveladas no RE ocorra, principalmente, em resposta à quantidade de proteína que está sendo sintetizada, a qual ultrapassa a capacidade do RE de enovelar proteínas (Figura 3) (TOTH et al., 2007).

Figura 3. Alterações intracelulares provocadas pelas doenças cardiovasculares de etiologia hipertrófica e isquêmica que causam o estresse do RE (Adaptado de TOTH et al. (2007)).

Já nas doenças cardíacas de etiologia isquêmica, ocorre uma série de alterações intracelulares que prejudicam o funcionamento do RE. A depleção dos estoques de ATP, em resposta à redução da produção de energia pelas mitocôndrias, compromete a capacidade de enovelamento das chaperonas do RE (TOTH et al., 2007). A concentração de Ca^{+2} também é outro fator

importante envolvido na função das chaperonas. Essas proteínas apresentam redução significativa da sua atividade em resposta à diminuição da concentração de Ca^{+2} no RE, causado pela isquemia (TOTH et al., 2007). A formação das pontes dissulfeto durante o processo de enovelamento e maturação das proteínas é prejudicada na vigência de isquemia pela mudança no estado redox do RE necessário para enzima ponte de dissulfeto isomerase (PDI - *protein disulfide isomerase*) formar as pontes dissulfeto (TOTH et al., 2007). Além disso, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a fase de reperfusão também contribui para o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, uma vez que as EROs alteram a estrutura terciária e quaternária das proteínas (Figura 3) (TOTH et al., 2007).

Como discutido anteriormente, a resposta ao estresse do RE ocorre em duas fases distintas. Neste sentido, parece haver uma relação entre a progressão do estresse do RE para fase apoptótica e a progressão da cardiomiopatia para a IC (OKADA et al., 2004; AZFER et al., 2006; BELMONT et al., 2010; HAMID et al., 2011). Foi observado que durante a fase de adaptação da UPR há indução de genes relacionados ao aumento da capacidade do RE enovelar e translocar proteínas para degradação (OKADA et al., 2004; AZFER et al., 2006; BELMONT et al., 2010; HAMID et al., 2011). Entretanto, com a progressão da cardiopatia concomitante ao estresse do RE mantido, há aumento de apoptose, a qual está associada ao aumento da expressão de CHOP e redução da expressão de chaperonas do RE (OKADA et al., 2004; AZFER et al., 2006; BELMONT et al., 2010; HAMID et al., 2011). Essa possível relação sugere a UPR como um alvo em potencial para o desenvolvimento de terapias que atenuem a progressão das doenças cardiovasculares.

Neste sentido, as primeiras evidências de que a fase de adaptação da UPR poderia atenuar os efeitos deletérios causados ao miocárdio foram observadas em estudos com pré- e pós-condicionamento isquêmico que reportaram uma associação entre a cardioproteção induzida pela restrição de oxigênio e a atenuação do estresse do RE (ZHU et al., 2006; LIU et al., 2008). A comprovação de que a fase de adaptação da UPR pode de fato reduzir os danos ao miocárdio, foi demonstrada por PETROVSKI et al. (2011). Os autores

observaram que a indução da fase de adaptação da UPR com doses baixas de tunicamicina, um inibidor da glicosilação de proteínas, e taspigargina, um inibidor da Ca^{2+} ATPase do RE (SERCA2 - *sarcoplasmic reticulum* Ca^{2+} -ATPase), aumentou a expressão proteica de GRP78 e Bcl-2 e diminuiu a área infartada, a apoptose e a disfunção cardíaca causados pela isquemia/reperfusão. Em contra partida, doses elevadas de ambos os fármacos aumentaram a expressão de CHOP (fase de apoptose da UPR) e os danos ao miocárdio causados pela isquemia/reperfusão.

A hipótese de que a fase de adaptação da UPR poderia proteger o coração contra acometimentos cardiovasculares e auxiliar no seu tratamento também foi comprovada por estudos utilizando animais com ganho ou perda de função de diferentes componentes da UPR. MARTINDALE et al. (2006) demonstraram que a ativação de ATF6 aumentou a expressão proteica de GRP78, GRP94 e PDI, melhorou a recuperação da função cardíaca e reduziu a apoptose e a necrose tecidual após isquemia/reperfusão. A superexpressão de GRP78 também se mostrou eficiente no sentido de reduzir os níveis de CHOP e a apoptose em cardiomiócitos (FU et al., 2008).

Já a expressão de uma forma inativa do translocador proteico DERLIN-3 aumentou a morte celular durante a isquemia (BELMONT et al., 2010). Essa proteína participa da ERAD translocando as proteínas mal enoveladas presentes no lúmen do RE para o citosol, onde serão degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma. A superexpressão da DERLIN-3, em contrapartida, atenuou o estresse do RE e reduziu a morte celular em resposta à isquemia (BELMONT et al., 2010).

De uma forma geral, esses achados da literatura apresentam evidências de que a fase de adaptação da UPR pode proteger o coração contra danos ao miocárdio e que terapias que aumentem a capacidade do RE enovelar e/ou degradar proteínas podem ser de grande valia para atenuar o estresse do RE e a progressão das doenças cardiovasculares.

2.4. O estresse do RE e a disfunção contrátil de cardiomiócitos

O mecanismo de contração celular é conhecido como acoplamento excitação-contração. Esse processo tem início pela estimulação elétrica dos cardiomiócitos por meio do potencial de ação. Esse ativa a abertura de canais de Ca^{+2} do tipo-L. A entrada desse íon nas células ativa os receptores de rianodina presentes na membrana do RE, promovendo a liberação do Ca^{2+} armazenado nessa organela. A combinação da entrada de Ca^{2+} e a liberação de íon pelo RE provoca o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} facilitando a ligação desse íon à troponina C, o que ativa o processo de contração celular. Para que o relaxamento ocorra, a concentração intracelular de Ca^{2+} deve ser reduzida, o que provocará a dissociação do Ca^{2+} da troponina C. Tal processo necessita do transporte de Ca^{2+} para fora do citosol, o que é realizado pela SERCA2, pelo trocador de sódio/cálcio (NCX1 - *sodium-calcium exchanger 1*), pela Ca^{2+} ATPase presente no sarcolema e na membrana mitocondrial (BERS, 2002).

Devido essa participação efetiva do RE no processo de acoplamento excitação-contração, não é surpreendente que o estresse do RE cause a disfunção contrátil de cardiomiócitos (ZHANG et al., 2011). Apesar de existirem várias hipóteses para explicar esse fenômeno, o mecanismo pelo qual o estresse do RE compromete a função cardíaca ainda não é conhecido.

Uma das possíveis causas para disfunção contrátil induzida pelo estresse do RE é o aumento da produção de EROs (ROE e REN, 2013). Essa relação entre estresse oxidativo e estresse do RE é complexa e apesar do aumento das EROs causar o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, componentes da UPR podem elevar ainda mais a produção de espécies reativas (SANTOS et al., 2009). Neste sentido, foi demonstrado que animais com superexpressão da enzima antioxidante catalase não apresentavam redução da função cardíaca em resposta ao estresse do RE (ROE e REN, 2013). Especula-se que o estresse oxidativo possa reduzir a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} . Isso porque, as EROs ativam quinases que fosforilam a troponina T e I, que, por sua vez, impedem a interação actina-miosina (HE et al., 2003). Além disso, as EROs ativam a CaMKII, uma enzima redox-sensível, que quando ativada pode fosforilar proteínas reguladoras do fluxo intracelular

de Ca^{+2} , como, por exemplo, os canais de rianodina, causando disfunção contrátil e alteração da dinâmica do Ca^{+2} (BERS e GRANDI, 2009; ERICKSON et al., 2011; ROE e REN, 2013).

A redução das chaperonas presentes no RE durante a progressão da UPR para a fase apoptótica é outro fator que pode comprometer o processo de acoplamento excitação-contração. Essas proteínas, além de participarem do enovelamento das cadeias polipeptídicas, são importantes na regulação do Ca^{+2} intracelular, atuando principalmente na manutenção dos estoques desse íon no RE (LIU et al., 1997; VITADELLO et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Experimentos demonstraram que a superexpressão de GRP78 e 94 aumentava a capacidade de armazenamento e a resistência à depleção do Ca^{+2} presente no RE, além de impedir o aumento da sua concentração citosólica (VITADELLO et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Vale ressaltar, que a redução da quantidade de Ca^{+2} presente no RE e o aumento da disponibilidade desse íon no citosol cursa com a instalação da síndrome da IC (HOUSER e MARGULIES, 2003).

Evidências de que a inibição da quinase AKT (*Protein Kinase B*) pelo estresse do RE também possa alterar a contratilidade de cardiomiócitos foram demonstradas por ZHANG et al. (2011). Os autores reportaram que a disfunção contrátil e as alterações na dinâmica do Ca^{+2} induzidas pelo estresse do RE não foram observadas nos cardiomiócitos que expressavam uma forma ativa de AKT. Apesar da via de sinalização PI3K (*Phosphoinositide-3 kinase*)/AKT ser amplamente estudada no âmbito da fisiopatologia cardiovascular, devido ao seu papel cardioprotetor e a participação nos processos de hipertrofia do miocárdio e regulação da dinâmica do Ca^{+2} , ainda não se sabe ao certo o modo pelo qual o estresse do RE inibe essa via de sinalização nos cardiomiócitos (KIM et al., 2003; MCMULLEN et al., 2004; KEMI et al., 2008).

2.5. Estresse do RE e sua relação com a via de sinalização PI3K/Akt

No músculo cardíaco, a via de sinalização PI3K/AKT está envolvida em diversos processos intracelulares, dentre eles hipertrofia fisiológica, aumento do inotropismo e regulação metabólica (PARRIZAS, SALTIEL e LEROITH,

1997; WANG et al., 1998; KIM et al., 2003; CECI, ROSS e CONDORELLI, 2004; MCMULLEN et al., 2004; KEMI et al., 2008). Essa via de sinalização tem início a partir da fosforilação dos resíduos de tirosina do IRS-1 (*Insulin receptor substrate-1*). Essa série de fosforilações catalisada pelos receptores de insulina ou IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) permite que o IRS-1 interaja com o domínio SH2 (*Srchomology2*) de outras proteínas, dentre elas a PI3K (DUAN, REN e GAO, 2010). Essa interação ativa a PI3K, que, por sua vez, ativa as PDKs (*phosphoinositol-dependent kinases*), as quais, em seguida, fosforilam e, consequentemente, ativam outras quinase, incluindo a AKT.

A via de sinalização PI3K/AKT tem um efeito cardioprotetor importante contra acometimentos cardiovasculares (MATSUI et al., 1999; FUJIO et al., 2000; ZHANG et al., 2007; WAGNER et al., 2010). Sua ativação em corações isquêmicos reduz o tamanho do infarto do miocárdio, a apoptose e atenua o remodelamento cardíaco e a hipertrofia patológica (WAGNER et al.; LI et al., 1997). Além disso, ZHANG et al. (2007) observaram que parte do efeito cardioprotetor promovido pelo treinamento físico em animais submetidos à isquemia/reperfusão é mediado, pelo menos em parte, pela PI3K. Os autores reportaram que a inibição da PI3K bloqueava a redução da área infartada, da necrose tecidual, da apoptose e a atenuação da disfunção cardíaca, promovidos pelo TFA.

A explicação para esse efeito cardioprotetor da via de sinalização PI3K/AKT tem se baseado no fato da AKT interagir com proteínas-chave para a manutenção da homeostase celular. Foi reportado que a AKT fosforila e inativa a Bad, uma proteína pró-apoptótica pertencente à família da Bcl-2 (MATSUI e ROSENZWEIG, 2005). Outras duas proteínas sujeitas a inativação por fosforilação pela AKT são a caspase 9 e a FoxO3a (*Forkhead box O3a*) (BRUNET et al., 1999; MATSUI e ROSENZWEIG, 2005), sendo que a última, além de participar da regulação de vários genes pró-apoptóticos, também aumenta o catabolismo proteico (BRAUN e GAUTEL; BRUNET et al., 1999).

A via de sinalização PI3K/AKT também exerce um efeito inotrópico positivo no miocárdio de corações acometidos pela IC. A ativação dessa via de sinalização aumenta a força de contração do músculo cardíaco e a amplitude de contração de cardiomiócitos de animais com IC (KINUGAWA et al., 1999;

VON LEWINSKI et al., 2003). Parte dessa resposta pode ser explicada pela alteração na dinâmica do Ca^{+2} durante o processo de acoplamento excitação/contração. Quando ativada, a via de sinalização PI3K/AKT melhora o transiente de Ca^{+2} , o que é devido a uma maior corrente desse íon pelos canais de Ca^{+2} do tipo L e pelo NCX1 (VON LEWINSKI et al., 2003). Outro estudo, por sua vez, demonstrou que esse aumento na disponibilidade de Ca^{+2} para a contração celular também é devido à maior liberação desse íon pelo RE, em um processo dependente de IP3 (*inositol1,4,5-trisphosphate*). Essa resposta, entretanto, foi bloqueada pela utilização de wortmannin, um inibidor de PI3K (IBARRA et al., 2004). Além da maior disponibilidade de Ca^{+2} para contração, o aumento na capacidade contrátil do miocárdio promovido pela ativação da via de sinalização PI3K/AKT, também está relacionada a uma maior sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} (CITTADINI et al., 1998).

De forma crônica, essa cascata de reações também pode promover adaptações que contribuem para a melhora da função cardíaca. Foi demonstrado que a indução da expressão de AKT aumentou os níveis de SERCA2a e a fosforilação de fosfolambam (PLB) no músculo cardíaco (ROTA et al., 2005; CITTADINI et al., 2006). A PLB é uma proteína que regula a atividade da SERCA2. No seu estado desfosforilado, a PLB inativa a SERCA2, prejudicando a remoção do Ca^{+2} citosólico. Neste sentido, ROTA et al. (2005) e CITTADINI et al. (2006) reportaram que o aumento da concentração de SERCA2 e da fosforilação de PLB estava associado a uma elevação na taxa de remoção do Ca^{+2} citosólico, no conteúdo de Ca^{+2} do RE e na melhora da função cardíaca.

Apesar desses resultados sugerirem a via da PI3K/AKT como um possível alvo para o tratamento das doenças cardiovasculares, algumas questões sobre a regulação dessa via ainda não foram elucidadas, como, por exemplo, o mecanismo responsável por sua inativação em situações patológicas (KEMI et al., 2008). Neste sentido, OZCAN et al. (2004) mostraram que a via da PI3K/AKT é inativada pelo estresse do RE no fígado de animais com resistência à insulina. De acordo com os autores, a inativação da via PI3K/AKT é mediada pela proteína JNK. A fosforilação de IRE-1 em resposta ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE leva à ativação da JNK que,

por sua vez, fosforila a IRS-1 no resíduo ser³⁰⁷. A fosforilação da IRS-1 nesse sítio de ligação impede que a PI3K e seus efetores sejam ativados.

Outro mecanismo para explicar a inativação da via de sinalização PI3K/AKT pelo estresse do RE foi sugerido recentemente por KATO et al. (2012). Conforme o proposto, o RE em situações de estresse aumenta a atividade do mTORC1, por uma via ainda não conhecida. Esse complexo proteico, após sua ativação, inibe a via PI3K/AKT pela inativação direta de AKT. Além disso, os autores reportaram a existência de uma relação inversa entre a atividade da JNK e a fosforilação de AKT. Esse resultado, associado ao modo ainda não conhecido pelo qual a mTORC1 é ativada pelo estresse do RE, sugere o mecanismo proposto por OZCAN et al. (2004) como um dos mais plausíveis até o momento para explicar a inativação da via de sinalização PI3K/AKT no fígado.

Em paralelo à participação no controle metabólico, a inativação da via de sinalização PI3K/AKT pelo estresse do RE também está envolvida na manutenção da integridade tecidual e na disfunção contrátil. ZHANG et al. (2011) reportaram que a expressão de uma forma constitutivamente ativa de AKT atenuou a disfunção contrátil, a alteração na dinâmica do Ca^{+2} e a ativação de caspase 3, além de aumentar a viabilidade de cardiomiócitos em resposta ao estresse do RE induzido pelo tratamento com tunicamicina.

Todavia, a inativação da via da PI3K/AKT parece ser dependente da fase da UPR. O pré-tratamento com baixas doses de tunicamicina ou taspigargina antes da isquemia/reperfusão aumentou a fosforilação de AKT e os níveis de GRP78 no coração de ratos (fase de adaptação da UPR). Em contrapartida, o pré-tratamento com altas doses desses fármacos, reduziu a fosforilação de AKT e aumentou a concentração de CHOP (fase apoptótica da UPR) (PETROVSKI et al., 2011). Esses resultados sugerem que a inativação da via de sinalização PI3K/AKT ocorre apenas durante a fase apoptótica do estresse do RE.

Contudo, a via pela qual o estresse do RE inativa a via de sinalização PI3K/AKT em cardiomiócitos, assim como sua relevância para fisiopatologia cardiovascular, ainda não são conhecidas. O esclarecimento dessas questões poderá fornecer informações importantes para a melhor compreensão do

envolvimento do estresse do RE na disfunção cardíaca e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as doenças cardiovasculares.

2.6. O TFA como adjuvante no tratamento das doenças cardiovasculares

Inicialmente, as várias diretrizes para o tratamento dos diferentes tipos cardiomiopatias sugeriam que o esforço físico deveria ser evitado em portadores de doenças cardiovasculares (COATS, 2011). Na década de 80, entretanto, começaram a surgir as primeiras evidências de que um programa regular de exercício físico aeróbico é seguro e, sobretudo, eficiente para aumentar a capacidade funcional de pacientes infartados com disfunção ventricular esquerda (CONN, WILLIAMS e WALLACE, 1982).

Em indivíduos acometidos pela IC, os benefícios do TFA, como, aumento da tolerância ao esforço físico e melhora da qualidade e expectativa de vida, são resultado de uma série de adaptações centrais e periféricas, decorrentes da redução da hiperatividade neuro-humoral e melhora da função cardíaca (NEGRAO et al., 1993; ROVEDA et al., 2003; PIEPOLI et al., 2011).

Estudos utilizando diferentes modelos animais demonstraram que essa atenuação da disfunção cardíaca promovida pelo TFA está relacionada a alterações intracelulares que contribuem para melhora da capacidade contrátil dos cardiomiócitos de corações com IM (BOVERIS e NAVARRO, 2008; MEDEIROS et al., 2008; CAMPOS et al., 2012). Trabalhos do nosso e de outros grupos de pesquisa têm reportado que o TFA melhora o transiente de Ca^{+2} (MEDEIROS et al., 2008), a função mitocondrial (BOVERIS e NAVARRO, 2008; CAMPOS et al., 2012) e atenuam a produção de espécies reativas (JUDGE et al., 2005), além de desativar a via de sinalização calcineurina/NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) e aumentar a expressão proteica de HSP 72 (*Heat Shock Protein 72*), uma chaperona citoplasmática que atua no enovelamento de proteínas no coração de roedores com algum acometimento cardiovascular (REGGER et al., 2006).

Apesar desses resultados apontarem o TFA como recurso terapêutico capaz de promover adaptações que contribuam para atenuação do acúmulo de

proteínas mal enoveladas no RE, ainda não foi investigado se a melhora da função cardíaca de animais infartados pelo TFA está associado a uma possível atenuação do estresse RE.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar se o estresse do RE causa a disfunção contrátil de cardiomiócitos e verificar se a via JNK/PI3K/AKT estaria envolvida nessa disfunção e investigar se o TFA é capaz de atenuar o estresse do RE e a possível alteração na via JNK/PI3K/AKT.

3.2. Específicos

- a. Investigar se a inibição da via de sinalização PI3K/AKT está envolvida na disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados causada pelo estresse do RE;
- b. Verificar se uma possível inativação da via de sinalização PI3K/AKT pelo estresse do RE ocorre no miocárdio de ratos com IM;
- c. Investigar se o TFA é capaz de atenuar o estresse do RE e uma possível inibição da via de sinalização PI3K/AKT no coração de ratos infartados.

4. MÉTODOS

O presente projeto foi dividido em 3 etapas, de acordo com o objetivo e desenho experimental utilizado. Neste tópico, descrevemos a sequência dos experimentos realizados em cada uma dessas etapas.

4.1. Primeira etapa

Nesta etapa, realizamos experimentos *in vitro*, utilizando cardiomiócitos isolados de ratos adultos, no intuito de caracterizar a via de sinalização pela qual o estresse do RE causa a disfunção contrátil de cardiomiócitos.

4.1.1. Isolamento dos cardiomiócitos de ratos adultos e tratamentos

Para caracterizar a via de sinalização pela qual o estresse do RE causa a disfunção contrátil de cardiomiócitos, isolamos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de ratos (*Rattus Norvergicus*) Wistar (~200g) por um processo digestão enzimática, conforme descrito por WISLOFF et al. (2002). Para isso, os corações foram removidos e montados em um Langendorff (*Radnoti*, EUA), onde foi realizada a perfusão retrograda pela artéria aorta (7.5 ml.min^{-1}) com solução A (Tabela 1), contendo 0,225 mM de EGTA (*Ethyleneglycol-bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'- tetra acetic acid*). Após 5 min, essa solução foi substituída pela solução B (Tabela 1), que foi perfundida por 20 min. Em seguida, o ventrículo esquerdo foi dissecado, cortado, colocado em um tubo de 50 ml contendo as soluções B e C (Tabela 1) e agitado por 5 min, a 150 ciclos por min. A seguir, a solução foi filtrada e centrifugada por 30 seg, a 600 ciclos por min. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo os cardiomiócitos ressuspensionado em solução D (Tabela 1). Os cardiomiócitos foram centrifugados mais uma vez (30 seg, a 600 ciclos por min) e ressuspensionados em solução E (Tabela 1). Em seguida, os cardiomiócitos foram centrifugados (30 seg, a 600 ciclos por min), ressuspensionados e mantidos em meio de cultura (Tabela 1).

Tabela 1. Soluções utilizadas para o isolamento de cardiomiócitos

Solução	Reagentes
A	130 mM NaCl; 1 mM ácido láctico; 5,4 mM KCl; 3 mM ácido pirúvico; 25 mM HEPES; 0,5 mM MgCl ₂ ; 0,33 mM NaH ₂ PO ₄ ; 22 mM D-Glucose; 0,1 U/ml insulina.
B	Solução A; 150 U/ml collagenase tipo II; 0,048 mM de CaCl ₂ .
C	Solução A; 150 U/ml collagenase tipo II; 0,1% BSA; 0,06 mM de CaCl ₂ .
D	Solução A; 0,1% BSA; 0,25 mM CaCl ₂ .
E	Solução A; 0,1% BSA; 0,5 mM CaCl ₂ .
Meio de cultura	M199; 2 mg/ml BSA; 1 µM insulina; 2 mM L-carnitina; 5 mM creatina; 5 mM taurina; 100 IU/ml penicilina; 100 µg/ml estreptomicina.

BSA (albumina bovina sérica); M199 (*Medium 199*, *Sigma-Aldrich*, EUA); collagenase tipo II (*Worthington Biochemical*, EUA).

Para padronizar a dose necessária de tunicamicina para induzir o estresse do RE, incubamos os cardiomiócitos isolados, por um período de 15 horas, com 3 concentrações diferentes dessa droga: 1, 10 e 20 µg/ml. A escolha da tunicamicina, dentre as outras duas, taspargina e DTT, comumente utilizadas em outros estudos para induzir o estresse do RE, deve-se ao fato de que ambas podem interferir na contratilidade dos cardiomiócitos de maneira independente ao estresse do RE.

Uma vez estabelecida a concentração ideal de tunicamicina para induzir o estresse do RE, avaliamos a participação da proteína JNK na disfunção contrátil induzida pelo estresse do RE. Para isso, os cardiomiócitos foram incubados com 20 µM de SP600125 (*Sigma-Aldrich*, Brasil), um inibidor específico da JNK, 30 minutos antes da adição de tunicamicina (Figura 4). Escolhemos essa concentração de SP600125, pois estudos prévios da literatura demonstraram uma redução dos níveis de JNK fosforilada em cardiomiócitos tratados com 20 µM ou menos dessa droga (ENGELBRECHT et al., 2004; NADRUZ et al., 2005; HUA et al., 2009; KANG et al., 2011).

Figura 4. Sequência experimental referente a etapa 1 do estudo. Os valores entre as setas representam o tempo entre as diferentes fases do período experimental.

De acordo com a nossa hipótese, a incubação dos cardiomiócitos com o SP600125 atenuaria ou reverteria a disfunção contrátil induzida pelo estresse do RE, pois impediria que a via de sinalização PI3K/AKT fosse inativada. Testamos essa hipótese por meio do co-tratamento dos cardiomiócitos com SP600125 e PI3K α inibitor II (20 μ M; Cayman Chemical, EUA), um inibidor específico da proteína PI3K, 30 min antes a indução do estresse do RE (Figura 4). Utilizamos essa concentração de 20 μ M de PI3K α inibitor II, pois observamos em um ensaio prévio, no qual incubamos cardiomiócitos isolados com 3 concentrações diferentes desse inibidor (10, 20 e 30 μ M) por 15 horas, que 10 μ M dessa droga já foi suficiente para reduzir os níveis de pAKT (Figura 5).

Figura 5. Avaliação da fosforilação de AKT e da expressão da proteína normalizadora GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) em cardiomiócitos incubados com 0, 10, 20 ou 30 μ M de PI3K α inhibitor II por 15 horas.

4.1.2. Análise da expressão proteica (*Western blotting*)

Para avaliar a indução do estresse do RE e uma possível inibição da via de sinalização PI3K/AKT, analisamos a expressão proteica total e os níveis de proteína de fosforilada pela técnica de *Western blotting*. Para isso, os cardiomiócitos foram lisados com *Ripa Buffer* (*Sigma-Aldrich*, EUA) contendo um coquetel de inibidor de proteases e fosfatases (1:100; *Sigma-Aldrich*, EUA). O homogenato foi centrifugado a 12.000 ciclos por minutos por quinze minutos a 4°C, para a separação do sobrenadante. A concentração de proteína das amostras foi analisada por meio do método de Bradford (*Biorad*, EUA). As amostras foram solubilizadas a uma concentração final de 1% de SDS (sodium-dodecyl- sulfate) e em seguida as proteínas presentes nas amostras foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida utilizando um tampão de corrida (25 mM Tris-Base; 192 mM Glicina; 0,1% SDS). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência contendo 48 mM Tris-Base, 39 mM glicina, 20% metanol e 0,0375% SDS. As membranas foram lavadas duas vezes com solução TBS-T (50 mM Tris-Base; 0,9% NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS-T e BSA (5%) por 120 minutos a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). A membrana, então, foi incubada a 4°C, por 12 horas, com um dos seguintes anticorpos primários diluído na solução bloqueadora: GRP78 (*Abcam*, Reino Unido), CHOP (*Cell Signaling*, EUA) SAPK/JNK (*Cell Signaling*, EUA), pSAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) (*Cell Signaling*, EUA), AKT (*Cell signaling*, EUA), pAKT (Ser⁴⁷³) (*Cell signaling*, EUA), BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*) (*Cell signaling*, EUA), VCP (*Valosin-containing protein*) (*Thermo Scientific*, EUA),

DNAJC3 (*DnaJ homolog subfamily C member 3*) (*Thermo Scientific*, EUA) e DERLIN-1 (*Sigma-Aldrich*, EUA), Canal de Ca^{+2} tipo-L subunidade $\beta 1\text{A}$ (*Santa Cruz Biotechnology*, EUA), NCX1 (*Abcam*, Reino Unido), SERCA2 (*Cell signaling*, EUA), PLB (*Cell signaling*, EUA), pPLB ($\text{Ser}^{16}/\text{Th}^{17}$) (*Cell signaling*, EUA) e GAPDH (*Abcam*, Reino Unido). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por uma hora e meia em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo. A imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (*Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences*, EUA). Posteriormente, as bandas foram quantificadas (número de pixels) pelo sistema Image J, fornecido gratuitamente pelo NIH (EUA). Utilizamos a proteína GAPDH como normalizador e os resultados foram corrigidos pelo grupo sem droga ou controle e representados em unidade arbitrária (*fold*).

4.1.3. Análise da contratilidade de cardiomiócitos isolados

O efeito dos tratamentos descritos nos itens 4.1.1 e 4.1.5 na contratilidade de cardiomiócitos isolados de ratos adultos foi estudado por meio da técnica de alteração do comprimento celular, usando um sistema de detecção de bordas (*Ionoptix*, EUA) montado em um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, Japão), conforme descrito (BOZI et al., 2013) (Figura 4). Para isso, os cardiomiócitos foram estimulados eletricamente na frequência de 1 Hz, com intensidade de 20 Volts, duração do estímulo de 5 msec (*Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix*, EUA), em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Foram mensurados a amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), a velocidade máxima de contração ($+dL/dt$, $\mu\text{m}/\text{seg}$), a velocidade máxima de relaxamento ($-dL/dt$, $\mu\text{m}/\text{seg}$), o tempo para 50% do pico de contração (seg) e o tempo para 50% do relaxamento (seg) dos cardiomiócitos isolados.

4.1.4. Análise do transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados

Para verificar se uma possível disfunção contrátil dos cardiomiócitos estaria associada a uma alteração na dinâmica do Ca^{+2} , analisamos o transiente de Ca^{+2} por meio de um indicador fluorescente de Ca^{2+} permeável à membrana plasmática, Fura-2/AM (*Molecular Probes*, EUA). Para isso, os cardiomiócitos foram incubados com o Fura-2/AM na concentração de 2 $\mu\text{mol/ml}$, durante 20 min, à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Em seguida, o meio de cultura contendo o Fura-2/AM foi removido e substituído por meio de cultura sem o indicador de Ca^{2+} para permitir a clivagem do AM-éster. Vinte minutos após, os transientes de Ca^{2+} foram evocados por meio da estimulação elétrica dos cardiomiócitos com pulso de 1 Hz, intensidade de 20 Volts e duração do estímulo de 5 msec (*Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix*, EUA), a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). O transiente de Ca^{+2} foi avaliado no comprimento de onda de emissão de 510 nm por meio de um sistema fotométrico de aquisição de fluorescência, montando em um microscópio invertido (*Nikon TE-2000E*, Japão), após excitação alternada nos comprimentos de onda de 340 e 380 nm (F340/380) (*Optoscan, Cairn Research*, Reino Unido). O registro do transiente de Ca^{+2} foi realizado nos mesmos cardiomiócitos utilizados para avaliação da contratilidade, descrita no item 4.1.3.

4.1.5. Small interfering RNA (siRNA)

Analisamos a participação de outro possível alvo da JNK, a proteína BNIP3, por meio da atenuação de sua expressão pela técnica de siRNA, em virtude de resultados iniciais não confirmando nossa hipótese de que a via PI3K/AKT estaria envolvida. Para isso, o siRNA para BNIP3 (*Life Technologies*, EUA) ou o siRNA controle não específico (*Life Technologies*, EUA), na concentração de 12,5 pmol, foi incubado com 7,2 μl do agente de transfecção lipofectamina RNAiMax (*Life Technologies*, EUA), por 5 min, em Meio 199 puro, para formação do complexo siRNA-lipofectamina. Em seguida, as células foram incubadas com esse complexo em meio de cultura, 9 horas antes do tratamento com tunicamicina por mais 15 horas.

A concentração do siRNA para BNIP3 utilizada nesse experimento foi definida em ensaio prévio, no qual observamos que a incubação com 12,5 pmol de siRNA por 24 horas foi suficiente para atenuar a expressão proteica de BNIP3 em cardiomiócitos isolados (Figura 6).

Figura 6. Avaliação da expressão proteica de BNIP3 em cardiomiócitos isolados incubados com 0, 12,5 ou 25 pmol de siRNA (*small interfering RNA*) para BNIP3 por 24 horas.

4.2. Segunda etapa

Nos experimentos *in vitro*, o intuito foi o de verificar se o estresse do RE causaria a disfunção contrátil de cardiomiócitos por meio da ativação de JNK. Na segunda etapa, submetemos ratos infartados a um protocolo de corrida em esteira rolante, no intuito de verificar se a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 pelo estresse do RE ocorre no coração de ratos infartados e se o TFA seria capaz de atenuar essa resposta.

4.2.1. Animais de experimentação e tratamento

Utilizamos ratos (*Rattus Norvegicus*) da linhagem Wistar, com massa corporal média de 200 g, os quais foram alojados em gaiolas coletivas (quatro animais por gaiola), receberam água e ração comercial *ad libitum*, foram mantidos em ambiente com temperatura de 22°C e regime de luminosidade invertido de 12/12 horas escuro/claro.

Os animais foram divididos em 3 grupos: controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, n = 5). A cirurgia para indução do IM foi realizada nos animais dos grupos INF-

SED e INF-TF. Em contrapartida, os ratos do grupo SHAM-SED foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgico, porém sem a ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda. Quatro semanas após a realização ou simulação da cirurgia para indução do IM, os animais do grupo INF-TF foram submetidos a um protocolo de TFA em esteira rolante previamente padronizado em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2007) e descrito no item 4.2.3. Os ratos dos grupos SHAM-SED e INF-SED, permaneceram sedentários durante todo o período experimental (Figura 7).

Figura 7. Sequência experimental referente a etapa 2 do estudo. Os valores abaixo das setas representam as semanas do período experimental, enquanto as caixas de texto acima das setas indicam os procedimentos que foram realizados ao longo deste período.

4.2.2. Teste de corrida em esteira rolante

Para avaliar a tolerância a realização de esforço físico, submetemos todos os animais a um teste progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, onde a velocidade inicial da esteira foi de 6 m/min, sem haver inclinação da mesma. A cada três minutos, a velocidade da esteira foi acrescida de 3 m/min até a exaustão do animal de acordo com protocolo padronizado anteriormente no laboratório (FERREIRA et al., 2007). A variável medida foi a distância em metros percorrida por cada animal durante o teste

máximo. Este parâmetro foi utilizado para prescrição da intensidade e avaliação da eficácia do TFA (Figura 7).

4.2.3. Protocolo de treinamento físico em esteira rolante

Os animais do grupo INF-TF foram submetidos a um protocolo de corrida em esteira rolante, com objetivo de testar a hipótese de que o TFA seria capaz de atenuar o estresse do RE e a ativação via de sinalização JNK/BNIP3 no coração de ratos infartados (Figura 7).

O TFA em esteira rolante foi realizado durante 8 semanas, com sessões de exercício com duração de 60 minutos, 5 vezes por semana, à 60% da velocidade máxima atingida no teste de corrida em esteira rolante, realizado na quarta semana após a cirurgia para indução do IM (Figura 7). Vale destacar que essa intensidade foi obtida em estudo prévio do nosso laboratório (FERREIRA et al., 2007), a qual corresponde à máxima fase estável do lactato sanguíneo.

4.2.4. Análise ecocardiográfica

Para avaliar a estrutura e função cardíaca dos animais, realizamos análise ecocardiográfica em modo M, em dois períodos, 4 e 12 semanas após a realização da cirurgia para indução do IM (Figura 7). Para isso, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, i.p.) e quetamina (50 mg/kg, i.p.), colocados em posição supinada e submetidos à tricotomia do tórax. A profundidade da anestesia foi controlada pela frequência cardíaca dos animais, mantendo-a semelhante em todos os animais durante o exame ecocardiográfico. As dimensões cardíacas foram mensuradas por ecocardiógrafo (*Acuson Sequoia 512, Siemens*, EUA) equipado com transdutor linear de 14 Mhz .

As medidas realizadas foram: dimensão diastólica final do ventrículo esquerdo (DDFVE), dimensão sistólica final do ventrículo esquerdo (DSFVE), espessura do septo interventricular na diástole (SIVD), espessura do septo interventricular na sístole (SIVS), espessura da parede posterior do ventrículo

esquerdo na diástole (PPVED); espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPVES); frequência cardíaca (FC) e a função contrátil do ventrículo esquerdo foi determinada por meio da fração de encurtamento (FE), calculada pela fórmula: $FE (\%) = [(DDFVE - DSFVE) / DDFVE] \times 100$.

4.2.5. Avaliação do tamanho do IM

Para determinar a eficiência da cirurgia para indução do IM e verificar o efeito do TFA no tamanho da área infartada, avaliamos a extensão do IM conforme descrito anteriormente (BOZI et al., 2013) (Figura 8). Para isso, os corações foram cortados em 3 secções transversas: ápice, anel mediano (aproximadamente 3 mm) e base. O anel mediano foi imediatamente fixado em formalina 4% por 24 horas e depois submetido ao processamento histológico de rotina (desidratação, diafanização e impregnação) para inclusão em parafina. Em seguida, as secções foram cortadas em 5 µm de espessura utilizando um micrótomo rotativo (*Reichert-Jung 2045 Multicut*, Alemanha). Para análise da extensão do infarto os cortes foram corados com Picrosirius. Foi utilizado um scanner (HP deskjet F380, EUA) para captura das imagens destinadas à análise da extensão do infarto. O cálculo da porcentagem de infarto foi realizado utilizando a seguinte fórmula (Mulder et al., 2002):

$$(CEN + CEP / PEN + PEP) \times 100$$

Onde, CEN = perímetro da cicatriz endocárdica; PEN = perímetro endocárdico total; CEP = perímetro da cicatriz epicárdica; PEP = perímetro epicárdico total.

O tamanho do infarto dos grupos (porcentagem do ventrículo esquerdo infartado) foi expresso como porcentagem da extensão.

4.2.6. Análise da expressão proteica (*Western blotting*)

Para verificar se a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 pelo estresse do RE ocorre no coração de ratos infartados e se o TFA seria capaz de atenuar essa resposta, analisamos a expressão proteica de GRP78, CHOP,

JNK, BNIP3, além dos níveis de JNK fosforilada, pela técnica de *Western blotting*, conforme descrito no item 4.1.2.

4.3. Terceira etapa

Nesta etapa, analisamos o perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR no coração de ratos saudáveis submetidos ao TFA, no intuito de identificar quais genes estariam envolvidos na atenuação do estresse do RE pelo TFA. Posteriormente, avaliamos a expressão proteica de alguns dos genes estudados, no coração de ratos saudáveis e infartados submetidos ao TFA.

4.3.1. Animais de experimentação e tratamento

A UPR é uma via de sinalização ativada em resposta a qualquer tipo de estímulo, seja ele patológico ou fisiológico, que perturbe a proteostase do RE (OKADA et al., 2004; BELMONT et al., 2010; WU et al., 2011). Diante disso, optamos por analisar o perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR apenas no coração de animais saudáveis, pois, tanto o IM, como o TFA, poderiam ativar a UPR.

Para isso, utilizamos ratos (*Rattus Norvegicus*) da linhagem Wistar, com massa corporal média de 200 g, os quais foram mantidos nas condições descritas no item 4.2.1.

Os animais foram divididos em 2 grupos: Sedentário (SED, n = 6) e Treinado (TF, n = 5). Os ratos do grupo TF foram submetidos a um protocolo de corrida em esteira rolante, conforme descrito no item 4.2.3. Em contrapartida, os animais do grupo SED permaneceram sedentários durante todo o período experimental.

4.3.2. Teste de corrida em esteira rolante

Para avaliar a tolerância à realização de esforço físico, antes e após o TFA, submetemos os animais a um teste de corrida em esteira rolante, conforme descrito no item 4.2.2.

4.3.3. Análise da expressão de genes envolvidos na UPR (*PCR array*)

No intuito de verificar o efeito do TFA no perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR, analisamos a expressão de 84 genes relacionados à UPR pela técnica de *PCR array* (*RT² Profiler PCR Array*, QIAGEN, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Para isso, o RNA total foi extraído de fragmentos do ventrículo esquerdo (~20 mg) por meio de colunas (*RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit*, QIAGEN, Brasil). A concentração de RNA presente em cada amostra foi analisada por espectrofotometria (*NanoDrop 2000*, Thermo Scientific, EUA) na medida de absorbância de 260 nm e a pureza do RNA foi determinada pelo cálculo da razão das absorbâncias de 260 nm e 280 nm. Além disso, verificamos a pureza e integridade do RNA por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (*Sigma-Aldrich*, EUA). A transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando *RT² First Strand Kit* (QIAGEN, Brasil), mediante tratamento prévio das amostras com DNase (*RNase-Free DNase Set*, QIAGEN, Brasil). Em seguida, as amostras foram preparadas com *RT² qPCR SYBR Green MasterMix* (QIAGEN, Brasil) e adicionadas a placa de PCR de 96 poços contendo conjuntos de *primers* pré-dispensados e selecionados para traçar o perfil da expressão de 84 genes relacionados à UPR, além de 5 genes normalizadores (Tabela 2). O PCR em tempo real foi realizado utilizando o aparelho ABI Prism 7500 (*Applied Biosystems*, EUA) e os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos (Ct) como descrito pelo produtor do sistema. Os valores de delta Ct (DCt) foram calculados para o gene de interesse de cada amostra, como sendo o Ct do gene de interesse menos o Ct da média dos genes normalizadores. O cálculo das mudanças relativas no nível de expressão do gene de interesse (DDCt) foi

realizado por subtração da média do DCt do grupo SED para o correspondente DCt de cada amostra do grupo TF, seguido de $2^{(-DDCt)}$.

Tabela 2. Lista de genes analisados no *PCR array*

Referência	Símbolo	Nome
XM_236614	<i>Manf</i>	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
NM_024403	<i>Atf4</i>	Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)
NM_001107196	<i>Atf6</i>	Activating transcription factor 6
NM_021702	<i>Atxn3</i>	Ataxin 3
NM_017059	<i>Bax</i>	Bcl2-associated X protein
NM_022399	<i>Calr</i>	Calreticulin
NM_172008	<i>Canx</i>	Calnexin
NM_182814	<i>Cct4</i>	Chaperonin containing Tcp1, subunit 4 (delta)
NM_001106603	<i>Cct7</i>	Chaperonin containing Tcp1, subunit 7 (eta)
NM_024125	<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
NM_001013092	<i>Creb3</i>	CAMP responsive element binding protein 3
NM_001005562	<i>Creb3l1</i>	CAMP responsive element binding protein 3-like 1
NM_001012188	<i>Creb3l2</i>	CAMP responsive element binding protein 3-like 2
NM_024134	<i>Ddit3</i>	DNA-damage inducible transcript 3
NM_001014202	<i>Derl1</i>	Der1-like domain family, member 1
NM_012699	<i>Dnajb9</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
NM_001106486	<i>Dnajc10</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10
NM_022232	<i>Dnajc3</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
NM_001013196	<i>Dnajc4</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4
NM_153303	<i>Dyt1</i>	Dystonia 1
XM_238366	<i>Edem1</i>	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1
NM_001004230	<i>Edem2</i>	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2
NM_001109339	<i>Eif2a</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2A
NM_019335	<i>Eif2ak2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
NM_031599	<i>Eif2ak3</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
NM_001105744	<i>Eif2ak4</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha

		kinase 4
NM_138528	<i>Ero1l</i>	ERO1-like (<i>S. cerevisiae</i>)
NM_138917	<i>Fbxo6</i>	F-box protein 6
NM_001106334	<i>Ganab</i>	Glucosidase, alpha; neutral AB
NM_053523	<i>Herpud1</i>	Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
NM_001024988	<i>Herpud2</i>	HERPUD family member 2
NM_212546	<i>Hspa1l</i>	Heat shock protein 1-like
NM_021863	<i>Hspa2</i>	Heat shock protein 2
NM_153629	<i>Hspa4</i>	Heat shock protein 4
NM_001106428	<i>Hspa4l</i>	Heat shock protein 4-like
NM_013083	<i>Hspa5</i>	Heat shock protein 5
NM_001011901	<i>Hsph1</i>	Heat shock 105/110 protein 1
XM_001054494	<i>Htra2</i>	HtrA serine peptidase 2
XM_224963	<i>Htra4</i>	HtrA serine peptidase 4
NM_022392	<i>Insig1</i>	Insulin induced gene 1
NM_178091	<i>Insig2</i>	Insulin induced gene 2
XM_341399	<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8
NM_017322	<i>Mapk9</i>	Mitogen-activated protein kinase 9
NM_053569	<i>Mbtps1</i>	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1
NM_001035007	<i>Mbtps2</i>	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 2
NM_080577	<i>Nploc4</i>	Nuclear protein localization 4 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
NM_053463	<i>Nucb1</i>	Nucleobindin 1
NM_001007265	<i>Os9</i>	Osteosarcoma amplified 9
NM_017319	<i>Pdia3</i>	Protein disulfide isomerase family A, member 3
NM_001106794	<i>Pfdn5</i>	Prefoldin subunit 5
NM_212506	<i>Pfdn6</i>	Prefoldin subunit 6
NM_017101	<i>Ppia</i>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
NM_022536	<i>Ppib</i>	Peptidylprolyl isomerase B
NM_001004215	<i>Ppic</i>	Peptidylprolyl isomerase C
NM_001107175	<i>Ppp1r15b</i>	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15b
NM_001106806	<i>PrkcsH</i>	Protein kinase C substrate 80K-H
NM_001127545	<i>Rnf139</i>	Ring finger protein 139
NM_013067	<i>Rpn1</i>	Ribophorin I

NM_001100966	<i>Scap</i>	SREBF chaperone
NM_001034129	<i>Sec62</i>	SEC62 homolog (S. cerevisiae)
NM_001107637	<i>Sec63</i>	SEC63 homolog (S. cerevisiae)
NM_177933	<i>Sel1l</i>	Sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)
NM_173120	<i>Sels</i>	Selenoprotein S
NM_030835	<i>Serp1</i>	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1
NM_199376	<i>Sil1</i>	SIL1 homolog, endoplasmic reticulum chaperone (S. cerevisiae)
NM_001100739	<i>Syvn1</i>	Synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin
NM_012670	<i>Tcp1</i>	T-complex 1
NM_001012197	<i>Hsp90b1</i>	Heat shock protein 90, beta, member 1
NM_001106380	<i>Ube2g2</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast)
NM_001007655	<i>Ube2j2</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)
NM_001012025	<i>Ubxn4</i>	UBX domain protein 4
NM_053418	<i>Ufd1l</i>	Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)
NM_133596	<i>Ugg1</i>	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1
NM_001008301	<i>Usp14</i>	Ubiquitin specific peptidase 14
NM_053864	<i>Vcp</i>	Valosin-containing protein
NM_001004210	<i>Xbp1</i>	X-box binding protein 1
NM_001007604	<i>Rplp1*</i>	Ribosomal protein, large, P1
NM_012583	<i>Hprt1*</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
NM_173340	<i>Rpl13a*[#]</i>	Ribosomal protein L13A
NM_017025	<i>Ldha*</i>	Lactate dehydrogenase A
NM_031144	<i>Actb*</i>	Actin, beta

* genes normalizadores. [#] Não foi utilizado para posterior normalização da expressão gênica.

4.3.4. Análise da expressão proteica (*Western blotting*)

Avaliamos a expressão proteica de GRP78, CHOP, VCP, DNAJC3 e DERLIN-1, conforme descrito no item 4.1.2., no intuito de verificar se os níveis proteicos dessas proteínas corroborariam ao perfil de expressão dos seus respectivos genes.

4.3.5. Avaliação dos níveis de oligômeros solúveis (*Slot blot*)

Para compreender as alterações observadas na expressão proteica de DERLIN-1, avaliamos os níveis de oligômeros solúveis pela técnica de Slot blot. Para isso, os corações foram lisados e as amostras dosadas conforme descrito no item 4.1.2. Cada amostra foi, então, diluída para a concentração final de 0,25 µg/µl. Posteriormente, 100 µl de cada amostra foram filtrados em uma membrana de nitrocelulose, utilizando um sistema de *slot blot manifold* (Hoefer PR 648, EUA) conectado a uma bomba de vácuo, na pressão de 25 cmHg. Após toda amostra ter sido filtrada, a pressão foi aumentada para 50 cmHg e a membrana foi, então, lavada com TBS-T. Logo após, o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS-T e BSA (5%) por 120 minutos a temperatura ambiente (~ 25°C). Posteriormente, a membrana foi incubada a 4°C, por 12 horas, com o anticorpo primário para oligômeros solúveis (*Invitrogen*, EUA). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo primário, e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por uma hora e meia, à temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo. A imuno-detecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência, conforme descrita no item 4.1.2. Utilizamos o *ponceau staining* como normalizador e os resultados foram corrigidos pelo grupo SHAM-SED e representados em unidade arbitrária (*fold*).

4.4. Análise estatística

Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Utilizamos o teste de Shapiro-Wilk para verificação da distribuição normal dos dados.

Na primeira etapa, utilizamos ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey para as amostras paramétricas e teste de Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* Dunn's para amostras não paramétricas, com o objetivo de analisar o efeito da tunicamicina e dos inibidores, SP600125 e PI3K α inhibitor II, na expressão proteica, nos níveis de proteína fosforilada, na contratilidade e

no transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados. Para analisar o efeito do siRNA para BNIP3 na expressão proteica, nos níveis de proteínas fosforiladas, na contratilidade e no transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos incubados com tunicamicina, utilizamos ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Tukey.

Na segunda etapa, a ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey foi utilizada para verificar o efeito do TFA na distância percorrida, nos parâmetros ecocardiográficos, no peso tecidual, no tamanho do IM, na expressão proteica e nos níveis de proteína fosforilada, de ratos infartados.

Na terceira etapa, o teste-*t* de Student para amostras independentes foi utilizado no intuito de analisar o efeito do TFA na distância percorrida, no peso tecidual, na expressão proteica e nos níveis de proteína fosforilada. A expressão proteica e os níveis de oligômeros solúveis dos animais infartados submetidos ao TFA foram analisados por meio de ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey.

Para todas as análises, foi adotado como nível de significância de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Primeira etapa

Nesse tópico, apresentaremos os resultados referentes aos experimentos realizados *in vitro*, nos quais caracterizamos se o estresse do RE causaria a disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados e o possível envolvimento da via de sinalização JNK/PI3K/AKT.

5.1.1. Efeito de diferentes doses de tunicamicina na expressão proteica dos marcadores de estresse do RE

Para determinar a concentração de tunicamicina necessária para induzir o estresse do RE, incubamos cardiomiócitos isolados com 1, 10 e 20 µg/ml de tunicamicina e avaliamos a expressão proteica dos marcadores de estresse do RE, GRP78 e CHOP, após 15 horas de tratamento.

A expressão proteica de GRP78 estava aumentada nos cardiomiócitos que receberam 10 e 20 µg/ml de tunicamicina (Figura 8A). Não obstante, a expressão da proteína CHOP foi ainda maior. Observamos que os cardiomiócitos incubados com 10 µg/ml de tunicamicina apresentaram um aumento na expressão proteica de CHOP de aproximadamente 30 vezes, quando comparada as células que não receberam esse fármaco (Figura 8B). Contudo, nenhuma diferença significativa foi observada na expressão da proteína CHOP nos cardiomiócitos que receberam 1 e 20 µg/ml de tunicamicina (Figura 8B).

Esse aumento na expressão proteica de GRP78 e CHOP, observado nos cardiomiócitos que receberam pelo menos 10 µg/ml de tunicamicina, é um indicativo de que a inibição da glicosilação de proteínas por meio do tratamento dos cardiomiócitos com tunicamicina promove o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE e consequente ativação da UPR. Resultados semelhantes foram observados por outros estudos presentes na literatura que mesmo utilizando diferentes tipos de cultura celular, demonstraram que a tunicamicina é capaz de induzir o estresse do RE, observado por meio do aumento na

expressão de diferentes marcadores, como, GRP78 e CHOP (ZHANG et al., 2011; DONG et al., 2015; DONG et al., 2015).

Figura 8. Expressão das proteínas A) GRP78 e B) CHOP em cardiomiócitos isolados e incubados com 1, 10 ou 20 µg/ml de tunicamicina por 15 horas. O número amostral em cada tratamento foi de 6 e 5 para GRP78 e CHOP, respectivamente. Os dados estão apresentados em média ± EPM. * $p \leq 0.05$ vs. Controle; # $p \leq 0.05$ vs. 1 µg/ml de tunicamicina.

5.1.2. Efeito do estresse do RE na contratilidade de cardiomiócitos isolados

Após confirmar a indução do estresse do RE pelo tratamento dos cardiomiócitos com a tunicamicina, avaliamos a contratilidade celular para verificar se o estresse do RE causaria a disfunção contrátil dos cardiomiócitos isolados.

Como resultado, observamos que os cardiomiócitos que receberam 10 e 20 µg/ml de tunicamicina, por 15 horas, apresentaram menor amplitude de contração e redução da $+dL/dt$ e da $-dL/dt$, quando comparados aos cardiomiócitos que receberam a solução veículo DMSO ou 1 µg/ml de tunicamicina (Figura 9A, B, C e D). Entretanto, nenhuma diferença significativa foi observada no tempo para 50% do pico de contração e no tempo para 50% de relaxamento (Figura 9E e F). Além disso, os cardiomiócitos que receberam 1 µg/ml de tunicamicina não apresentaram qualquer alteração significativa nos parâmetros contráteis, quando comparados ao grupo controle (Figura 9).

Figura 9. Contratilidade de cardiomiócitos isolados tratados com 1, 10 e 20 µg/ml de tunicamicina por 15 horas. A) Traçado representativo da contração celular, B) Amplitude de contração, C) Velocidade máxima de contração (+dL/dt), D) Velocidade de máxima de relaxamento (-dL/dt), E) Tempo para 50% do pico de contração e F) Tempo para 50% do relaxamento. Foram analisadas pelo menos 30 células em cada tratamento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. Controle; # $p \leq 0.05$ vs. tunicamicina 1 µg/ml.

Esse resultado sugere que a disfunção contrátil dos cardiomiócitos induzida pelo tratamento com tunicamicina cursa com a instalação do quadro de estresse do RE, uma vez que a redução da amplitude de contração, da

+dL/dt e da -dL/dt, em conjunto, corroboram o aumento da expressão proteica dos marcadores de estresse do RE, GRP78 e CHOP, observado apenas nos cardiomiócitos que receberam 10 e 20 µg/ml de tunicamicina (Figura 8). Resultados semelhantes foram observados por outros pesquisadores que reportaram que o aumento na expressão proteica dos marcadores de estresse do RE, GRP78 e CHOP, em cardiomiócitos isolados tratados com 3 µg/ml de tunicamicina por 6 horas, foi acompanhado por uma redução da amplitude de contração, da +dL/dt e da -dL/dt (ZHANG et al., 2011).

Portanto, nossos achados demonstram que 10 µg/ml de tunicamicina é suficiente para induzir o estresse do RE, o qual está associado a disfunção contrátil dos cardiomiócitos.

5.1.3. Efeito do estresse do RE no transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados

Cada ciclo de contração-relaxamento dos cardiomiócitos é coordenado por um processo conhecido como acoplamento excitação-contração e um elemento de extrema importância para esse fenômeno é o íon Ca^{+2} (BERS, 2002). Qualquer alteração na dinâmica desse íon pode resultar em diminuição da função contrátil dos cardiomiócitos (HOUSER e MARGULIES, 2003).

Diante disso, avaliamos o transiente de Ca^{+2} nos cardiomiócitos tratados com 1, 10 e 20 µg/ml de tunicamicina durante 15 horas, para verificar se a disfunção contrátil induzida pelo estresse do RE estaria associada a uma possível alteração na dinâmica do íon Ca^{+2} .

Uma menor amplitude do transiente de Ca^{+2} foi observada apenas nos cardiomiócitos que receberam 10 e 20 µg/ml de tunicamicina (Figura 10A). Apesar dessa redução, não houve diferença estatística entre os grupos no tempo para 50% do pico de Ca^{+2} e no tempo para 50% da remoção do Ca^{+2} (Figura 10B e C). Além disso, nenhuma diferença foi observada nos cardiomiócitos que receberam 1 µg/ml de tunicamicina, quando comparados as células que receberam apenas o veículo DMSO (Figura 10).

Figura 10. Transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados tratados com 1, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina por 15 horas. A) Amplitude do transiente de Ca^{+2} , B) Tempo para 50% do pico de Ca^{+2} e C) Tempo para 50% da remoção do Ca^{+2} . Foram analisadas pelo menos 30 células em cada tratamento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. Controle.

Apesar de nossos dados sugerirem que a instalação do quadro de estresse do RE é acompanhado apenas por uma alteração da amplitude do transiente de Ca^{+2} , sem alteração no tempo para 50% do pico de Ca^{+2} e no tempo para 50% da remoção do Ca^{+2} , outros pesquisadores demonstraram que a indução do estresse do RE, por meio do tratamento de cardiomiócitos com tunicamicina, reduz não só a amplitude, mas também a taxa de remoção do Ca^{+2} intracelular (ZHANG et al., 2011; ROE e REN, 2013). Essa diferença pode ser resultado do tipo de animal utilizado nos experimentos. Enquanto nós isolamos cardiomiócitos de ratos, ZHANG et al. (2011) e ROE e REN (2013) utilizaram camundongos em seus ensaios. Essa discrepância entre os resultados é possível, pois camundongos apresentam frequência cardíaca elevada, quando comparados a ratos, ou seja, mesmo em condições basais há uma exigência maior dos mecanismos envolvidos na regulação do Ca^{+2} . Diante

disso, é razoável sugerir que proteínas envolvidas na regulação do transiente de Ca^{+2} em cardiomiócitos de camundongo sejam mais sensíveis a diferentes condições de estresse. Não podemos desconsiderar também, que essa menor taxa de remoção do Ca^{+2} observada por ZHANG et al. (2011) e ROE e REN (2013) seja um efeito primário da instalação do estresse do RE, uma vez que os autores utilizaram um tempo de incubação dos cardiomiócitos de apenas 3 e 6 horas, respectivamente, e uma dose inferior de tunicamicina (3 $\mu\text{g/ml}$) .

Portanto, nossos achados demonstram que o tratamento de cardiomiócitos isolados com 10 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina por 15 horas é suficiente para induzir o estresse do RE, o qual está associado a disfunção contrátil e a alteração do transiente de Ca^{+2} nos cardiomiócitos. Apesar de outros estudos também terem demonstrado que o estresse do RE causa disfunção contrátil de cardiomiócitos e alteração da dinâmica do Ca^{+2} (ZHANG et al., 2011; ROE e REN, 2013), a via de sinalização envolvida nessa resposta ainda precisa ser esclarecida.

5.1.4. Papel do estresse do RE na inibição da via de sinalização PI3K/AKT

De acordo com a nossa hipótese, a disfunção contrátil de cardiomiócitos causada pelo estresse do RE resultaria da inativação da via de sinalização PI3K/AKT pela proteína JNK. Para testar essa hipótese, incubamos cardiomiócitos isolados, 30 min antes da indução do estresse do RE, com o SP600125 e o PI3K α inibitor II, inibidores específicos das proteínas JNK e PI3K, respectivamente. Quinze horas após a adição da tunicamicina no meio de cultura, avaliamos a expressão proteica de GRP78, CHOP, JNK e AKT, além dos níveis de fosforilação de AKT e JNK.

A indução do estresse do RE com 10 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina aumentou mais uma vez a expressão proteica dos marcadores de estresse do RE, GRP78 e CHOP, nos cardiomiócitos (Figura 11A e B). Nenhuma alteração significativa na expressão proteica dos marcadores de estresse do RE foi observada em resposta à inibição das proteínas JNK e PI3K (Figura 11). Contudo, observamos que o co-tratamento dos cardiomiócitos com o SP600125 e o PI3K α inibitor II, antes da adição de tunicamicina, atenuou o

aumento da expressão proteica de CHOP, observado nos cardiomiócitos que receberam apenas tunicamicina (Figura 11B). Uma vez que não observamos efeito da inibição de JNK no aumento da expressão proteica de CHOP induzido pelo estresse do RE, é razoável sugerir que a atenuação da expressão dessa proteína, observada nos cardiomiócitos que receberam o SP600125 e o PI3K α inibitor II antes da indução do estresse do RE, seja resultado da inibição da PI3K.

A via de sinalização PI3K/AKT está envolvida na hipertrofia fisiológica do coração e quando ativada, aumenta a síntese proteica nos cardiomiócitos (DEBOSCH et al., 2006; KEMI et al., 2008). Pelo fato da inibição da via de sinalização PI3K/AKT diminuir a síntese proteica e a tunicamicina inibir a reação de glicolização de proteínas, causando o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, é possível que a atenuação da expressão proteica de CHOP pela inibição da PI3K, seja resultado de uma menor quantidade de proteínas a serem sintetizadas no RE.

Figura 11. Expressão das proteínas A) GRP78 e B) CHOP em cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M), PI3K α inibitor II (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml). O SP600125 e o PI3K α inibitor II foram adicionados 30 min antes da incubação dos cardiomiócitos com tunicamicina por 15 horas. O número amostral em cada tratamento foi de 7 e 6 para GRP78 e CHOP, respectivamente. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. sem droga, # $p \leq 0.05$ vs. + SP600125, £ $p \leq 0.05$ vs. + PI3K α inibitor II, & $p \leq 0.05$ vs. + Tunicamicina + SP600125 + PI3K α inibitor II.

Corroborando a nossa hipótese, o estresse do RE aumentou a fosforilação de JNK (Figura 12B), apesar de não ter alterado a expressão dessa proteína (Figura 12A). O SP600125 também não interferiu na expressão proteica de JNK (Figura 12A). Entretanto, observamos que essa droga foi efetiva no sentido de inibir a JNK, uma vez que o aumento na fosforilação dessa proteína causado pelo estresse do RE não foi observado nos cardiomiócitos tratados com o SP600125 (Figura 12B). Além disso, nenhuma alteração foi observada na expressão ou na fosforilação da proteína JNK em resposta ao tratamento dos cardiomiócitos com o PI3K α inibitor II (Figura 12A e B).

O aumento da fosforilação da JNK em resposta ao estresse do RE já foi demonstrado por outros grupos de pesquisa e está bem caracterizado na literatura (URANO et al., 2000; GROENENDYK et al., 2010). A fosforilação dessa quinase é resultado da ativação de um dos efetores da UPR, o IRE-1, que quando ativado pelo desligamento da GRP78 inicia uma cascata de sinalização que culmina com a fosforilação e ativação da JNK (URANO et al., 2000; GROENENDYK et al., 2010). Porém, o que não está claro ainda é o papel da JNK na disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados induzida pelo estresse do RE.

Diferente da nossa hipótese, o estresse do RE não diminuiu a fosforilação de AKT (Figura 12D). Além de não inibir a via de sinalização PI3K/AKT, o estresse do RE também não alterou a expressão proteica de AKT (Figura 12C). Da mesma forma, o SP600125 não teve efeito na expressão e na fosforilação de AKT (Figura 12C e D). Contudo, o PI3K α inibitor II reduziu os níveis de AKT fosforilada, mas sem alteração na expressão de AKT (Figura 12C e D).

Apesar dos nossos resultados sugerirem que o estresse do RE não inative a via de sinalização PI3K/AKT em cardiomiócitos, outros pesquisadores observaram que a indução do estresse do RE reduziu os níveis de AKT fosforilada (OZCAN et al., 2004; PETROVSKI et al., 2011; ZHANG et al., 2011). Entretanto, essa resposta parece ser dependente da fase da UPR. De fato, PETROVSKI et al. (2011) demonstraram que a diminuição da fosforilação de AKT no coração de ratos tratados com diferentes doses de tunicamicina acontece somente na fase de apoptose da UPR.

Figura 12. Níveis proteicos de A) JNK, B) JNK fosforilada nos sítios Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵, C) AKT e D) AKT fosforilada no sítio Ser⁴⁷³ em cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M), PI3K α inhibitor II (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml). O SP600125 e o PI3K α inhibitor II foram adicionados 30 min antes da incubação dos cardiomiócitos com a tunicamicina por 15 horas. O número amostral em cada tratamento foi de 5, 6, 7 e 6 para JNK, pJNK, AKT e pAKT. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. sem droga, + $p \leq 0.05$ vs. +Tunicamicina, £ $p \leq 0.05$ vs. + PI3K α inhibitor II, & $p \leq 0.05$ vs. + Tunicamicina + SP600125 + PI3K α inhibitor II.

Nesse sentido, os cardiomiócitos analisados no presente estudo parecem estar em uma fase da transição entre a fase de adaptação e a fase de apoptose da UPR. Essa hipótese é reforçada, pelo fato de apesar dos cardiomiócitos tratados com tunicamicina apresentarem um aumento na expressão proteica de CHOP, essas células ainda têm níveis proteicos elevados de GRP78 (Figura 11A e B). Contudo, independente da fase da UPR, na

qual a via de sinalização PI3K/AKT é inativada, nossos dados sugerem que a disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados independe da inativação dessa via de sinalização. Além disso, nossos resultados demonstram que em cardiomiócitos isolados, o estresse do RE de fato ativa a JNK, porém, a ativação dessa proteína não é acompanhada por uma inibição da via de sinalização PI3K/AKT.

5.1.5. Participação da proteína JNK na disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados induzida pelo estresse do RE

Para verificar a participação da proteína JNK na disfunção contrátil dos cardiomiócitos induzida pelo estresse do RE e confirmar se de fato a inativação da via de sinalização PI3K/AKT não está envolvida nessa resposta, repetimos o ensaio anterior e incubamos cardiomiócitos, 30 min antes da indução do estresse do RE, com SP600125 e PI3K α inibitor II. Quinze horas após a adição da tunicamicina no meio de cultura, avaliamos a contratilidade dos cardiomiócitos.

Mais uma vez, a indução do estresse do RE reduziu a amplitude de contração, a $+dL/dt$ e a $-dL/dt$, mas não teve efeito no tempo para 50% do pico de contração e no tempo para 50 % de relaxamento (Figura 13). Entretanto, a inibição de JNK impediu esse prejuízo na função contrátil dos cardiomiócitos em resposta ao estresse do RE, uma vez que os cardiomiócitos que receberam o SP600125 de forma prévia a adição de tunicamicina, apresentaram amplitude de contração, $+dL/dt$ e $-dL/dt$ preservados (Figura 13B, C e D). Embora a ativação de JNK esteja envolvida na disfunção contrátil induzida pelo estresse do RE, não observamos nenhuma evidência de que uma possível inibição da via de sinalização PI3K/AKT pela JNK, estaria envolvida na disfunção contrátil dos cardiomiócitos. Essa conclusão é suportada pelo achado de que a inibição da PI3K não reverteu o efeito inotrópico positivo da inativação de JNK nos cardiomiócitos tratados com tunicamicina, o que demonstra que a via de sinalização PI3K/AKT não está envolvida na disfunção contrátil de cardiomiócitos induzida pelo estresse do RE (Figura 13).

Apesar de termos demonstrado, pela primeira vez, a participação da JNK na disfunção contrátil de cardiomiócitos induzida pelo estresse do RE, o envolvimento dessa proteína em diferentes tipos de cardiomiopatias já é conhecida (HUA et al., 2009; CHAANINE et al., 2012; WU et al., 2013). Recentemente, WU et al. (2013) demonstraram que a inibição de JNK em um modelo *ex vivo* de isquemia/reperfusão reduziu o tamanho do infarto e os prejuízos na função contrátil desses corações. Além disso, a inibição de JNK também teve um efeito importante na contratilidade de cardiomiócitos isolados. Foi reportado que o pré-tratamento com o SP600125 atenuou a redução da amplitude de contração, da $+dL/dt$ e da $-dL/dt$, de cardiomiócitos submetidos a hipóxia/reperfusão ou incubados com o hormônio neuronostatina (HUA et al., 2009; WU et al., 2013).

Embora o envolvimento de JNK na fisiopatologia das doenças cardiovasculares já esteja bem estabelecido na literatura, o mecanismo pelo qual a ativação dessa quinase prejudica a função contrátil de cardiomiócitos ainda não está esclarecido. No presente estudo, testamos a hipótese de que a disfunção contrátil de cardiomiócitos causada pela ativação de JNK em resposta ao estresse do RE, seria resultado da inibição da via de sinalização PI3K/AKT. De fato, outros pesquisadores demonstraram que essa via de sinalização exerce um efeito inotrópico positivo importante em corações de animais com IC (KINUGAWA et al., 1999; VON LEWINSKI et al., 2003). Parte dessa resposta pode ser explicada pela alteração na dinâmica do Ca^{+2} durante o processo de acoplamento excitação/contração. Quando ativada, a via de sinalização PI3K/AKT aumenta a corrente de Ca^{+2} pelos canais de Ca^{+2} do tipo L e pelo trocador de Na^{+}/Ca^{+2} (VON LEWINSKI et al., 2003), a liberação de Ca^{+2} pelo RE (IBARRA et al., 2004) e a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} (CITTADINI et al., 1998). Além disso, ZHANG et al. (2011) reportaram que a redução na amplitude de contração, na $+dL/dt$ e na $-dL/dt$ causada pelo estresse do RE, não foi observada nos cardiomiócitos de animais que superexpressavam uma forma ativa de AKT.

Figura 13. Contratilidade de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M), PI3K α inhibitor II (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml). O SP600125 e o PI3K α inhibitor II foram adicionados 30 min antes da incubação dos cardiomiócitos com tunicamicina por 15 horas. A) Traçado representativo da contração celular, B) Amplitude de contração, C) Velocidade máxima de contração (+dL/dt), D) Velocidade de máxima de relaxamento (-dL/dt), E) Tempo para 50% do pico de contração e F) Tempo para 50% do relaxamento. Foram analisadas pelo menos 41 células em cada tratamento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. sem droga, + $p \leq 0.05$ vs. +Tunicamicina.

Apesar desses achados sugerirem a inibição da via de sinalização PI3K/AKT como uma das causas da disfunção contrátil de cardiomiócitos em resposta ao estresse do RE e o estudo de OZCAN et al. (2004) demonstrar que a JNK, por meio da fosforilação do IRS-1, inibe a via de sinalização PI3K/AKT, nossos dados demonstram que a JNK está envolvida na diminuição da capacidade contrátil de cardiomiócitos isolados induzida pelo estresse do RE, porém, de uma maneira independente a via de sinalização PI3K/AKT.

5.1.6. Efeito da inibição da proteína JNK na alteração do transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos em resposta ao estresse do RE

Para entender o mecanismo envolvido no prejuízo da função contrátil dos cardiomiócitos causado pela ativação de JNK em resposta ao estresse do RE, analisamos o transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos tratados com SP600125 e PI3K α inibitor II, 30 min antes da indução do estresse do RE, por meio da incubação com tunicamicina por 15 horas.

Corroborando a redução da função contrátil, o estresse do RE também reduziu a amplitude do transiente de Ca^{+2} nos cardiomiócitos (Figura 14A), apesar de nenhuma alteração ter sido observada no tempo para 50% do pico de contração e no tempo para 50% de relaxamento (Figura 14B e C). Por sua vez, a inibição de JNK impediu essa redução no transiente de Ca^{+2} causada pelo estresse do RE (Figura 14A). Além disso, essa preservação da dinâmica do Ca^{+2} , causada pela inativação de JNK nos cardiomiócitos que receberam tunicamicina, não foi revertida pela inibição da PI3K (Figura 14A). Esse dado reforça nosso achado de que a inativação da via de sinalização PI3K/AKT não participa da disfunção contrátil dos cardiomiócitos induzida pelo estresse do RE.

Figura 14. Transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μM), PI3K α inhibitor II (20 μM) e tunicamicina (10 $\mu\text{g/ml}$). O SP600125 e o PI3K α inhibitor II foram adicionados 30 min antes da incubação dos cardiomiócitos com a tunicamicina por 15 horas. A) Amplitude do transiente de Ca^{+2} , B) Tempo para 50% do pico de Ca^{+2} e C) Tempo para 50% da remoção do Ca^{+2} . Foram analisadas pelo menos 41 células em cada tratamento. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. sem droga, + $p \leq 0.05$ vs. + Tunicamicina.

Nossos dados demonstram que a disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados causada pela ativação da JNK em resposta ao estresse do RE, pode ser explicada, pelo menos em parte, pela redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} . A diminuição da disponibilidade de Ca^{+2} influencia diretamente a contratilidade dos cardiomiócitos, pois quanto menor a quantidade desse íon, menor a interação entre a actina e a miosina a cada ciclo de contração-relaxamento (BERS, 2002). Contudo, ainda não se sabe quais são as alterações intracelulares causadas pela JNK que possam estar relacionadas a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} causada pelo estresse do RE.

5.1.7. Efeito da ativação de JNK em resposta ao estresse do RE, na expressão da proteína BNIP3

Para entender como a ativação de JNK em resposta ao estresse do RE, causa a redução do transiente de Ca^{+2} e a, consequente, disfunção contrátil dos cardiomiócitos, analisamos a expressão de outro possível alvo de JNK, a proteína BNIP3, nos cardiomiócitos tratados com SP600125, 30 min antes da indução do estresse do RE, por meio da incubação com tunicamicina por 15 horas.

A JNK é uma quinase sensível a diferentes situações de estresse, nas quais promove a ativação de outras proteínas, como a FoxO3a. Uma vez ativada, a FoxO3a transloca para o núcleo, onde irá promover a transcrição de vários genes, incluindo o de BNIP3 (MAMMUCARI et al., 2007; CHAANINE et al., 2012), proteína pró-apoptótica e envolvida no controle de qualidade mitocondrial promovendo mitofagia quando ativada em resposta ao estresse celular. De fato, em cardiomiócitos isolados, foi demonstrado que a expressão proteica de BNIP3 aumenta em condições de estresse celular (CHAANINE et al., 2012). Entretanto, ainda não é conhecido se a ativação de JNK pelo estresse do RE causaria a elevação dos níveis proteicos de BNIP3 em cardiomiócitos.

Nesse sentido, avaliamos a expressão de BNIP3 em cardiomiócitos isolados e observamos que o estresse do RE aumentou a expressão proteica de BNIP3 (Figura 15). Nenhuma alteração nos níveis dessa proteína foi observada nos cardiomiócitos que receberam apenas o SP600125 (Figura 15). Contudo, a inibição de JNK impediu o aumento da expressão proteica de BNIP3 em resposta ao estresse do RE (Figura 15).

Esse achado sugere que o aumento da expressão proteica de BNIP3 causado pelo estresse do RE, é de fato, resultado da ativação de JNK, o que corrobora os resultados obtidos por outros estudos, que reportaram uma associação entre a elevação da expressão da proteína BNIP3 e a ativação de JNK (CHAANINE et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que a expressão

de uma forma inativa de JNK diminuiu os níveis proteicos de BNIP3 no coração de animais com IC (CHAANINE et al., 2012).

Figura 15. Expressão proteica de BNIP3 em cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com SP600125 (20 μ M) e tunicamicina (10 μ g/ml). O SP600125 foi adicionado 30 min antes da incubação dos cardiomiócitos com tunicamicina por 15 horas. O número amostral em cada tratamento foi 9. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. sem droga, + $p \leq 0.05$ vs. +Tunicamicina.

A BNIP3 é uma proteína que participa de diversos processos intracelulares, como, mitofagia e apoptose, importantes para a manutenção homeostase celular (DIWAN et al., 2007; MAMMUCARI et al., 2007). No entanto, a participação de BNIP3 na disfunção contrátil de cardiomiócitos causada pelo estresse do RE ainda não foi investigada.

5.1.8. Efeito da proteína BNIP3 na expressão dos marcadores de estresse do RE

Para testar o envolvimento da BNIP3 na disfunção contrátil de cardiomiócitos induzida pelo estresse do RE, utilizamos um siRNA para BNIP3 com o objetivo de atenuar a expressão dessa proteína. Contudo, a BNIP3

participa de alguns processos intracelulares que podem ser deletérios para os cardiomiócitos e contribuir para o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE (ZHANG et al., 2009; GUSTAFSSON, 2011; CHAANINE et al., 2013). Diante disso, avaliamos a expressão proteica dos marcadores de estresse do RE, GRP78 e CHOP, no intuito de verificar se a redução da expressão proteica de BNIP3 atenuaria o estresse do RE. Isso é importante, pois uma possível atenuação da disfunção contrátil dos cardiomiócitos pelo siRNA poderia ser resultado de uma atenuação do estresse do RE e não por um efeito direto da BNIP3.

Nesse ensaio, incubamos os cardiomiócitos, 9 horas antes da adição da tunicamicina, com o siRNA para BNIP3 e analisamos a expressão proteica da BNIP3 e dos marcadores de estresse do RE 15 horas após a adição de tunicamicina.

Conforme apresentado na figura 16A, o siRNA reduziu a expressão proteica da BNIP3 nos cardiomiócitos incubados com ou sem tunicamicina, demonstrando a efetividade dessa técnica. Além disso, observamos que o siRNA para BNIP3 não alterou a expressão proteica de GRP78 e CHOP (Figura 16B e C). O siRNA também não interferiu no aumento da expressão proteica desses marcadores de estresse do RE em resposta ao tratamento dos cardiomiócitos com a tunicamicina (Figura 16B e C). Esses resultados demonstram que a atenuação da expressão proteica de BNIP3 não altera a expressão dos marcadores de estresse do RE em cardiomiócitos isolados tratados com tunicamicina.

CHAANINE et al. (2013) mostraram em um modelo de IC, induzido por sobrecarga pressórica, que a atenuação da expressão da proteína BNIP3 reduziu a expressão proteica de CHOP e a fosforilação do eIF2 α , sugerindo que a BNIP3 pode contribuir para o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE. Essa exacerbação do quadro de estresse do RE pode ser resultado das várias alterações intracelulares causadas pela BNIP3 que podem comprometer o funcionamento do RE. Por exemplo, foi demonstrado que a BNIP3 reduz a quantidade de Ca⁺² do RE, além de alterar o potencial de membrana das mitocôndrias e aumentar sua remoção por meio do processo de mitofagia (ZHANG et al., 2009; GUSTAFSSON, 2011; CHAANINE et al., 2013).

Figura 16. Expressão proteica de A) BNIP3, B) GRP78 e C) CHOP em cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com siRNA para BNIP3 (12,5 pmol) e tunicamicina (10 µg/ml). O siRNA para BNIP3 foi adicionado 9 horas antes da incubação dos cardiomiócitos com a tunicamicina por 15 horas. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. O número amostral em cada tratamento foi de 9, 5 e 6 para BNIP3, GRP78 e CHOP, respectivamente. * $p \leq 0,05$ vs. sem droga, + $p \leq 0,05$ vs. + Tunicamicina, # $p \leq 0,05$ vs. + BNIP3 siRNA.

Diante desses achados, não é surpreendente que a diminuição na expressão proteica de BNIP3 tenha atenuado o quadro de estresse do RE em corações com IC (CHAANINE et al., 2013). Entretanto, em nossos experimentos *in vitro*, não observamos qualquer alteração na expressão

proteica dos marcadores de estresse do RE em resposta a redução da expressão da proteína BNIP3. Essa discrepância entre os resultados obtidos no presente estudo e os reportados por CHAANINE et al. (2013) pode estar relacionada ao fato de estarmos inibindo com a tunicamicina, as reações de glicosilação, importantes para o enovelamento de proteínas no RE. Portanto, qualquer proteína que chegue para ser enovelada no RE acumulará nessa organela, independente dos efeitos deletérios causados pela BNIP3, pois não alcançará sua conformação final para seguir a via de secreção.

Todavia, esse achado é importante para os objetivos desse estudo, pois nos permite avaliar o efeito direto da BNIP3 na contratilidade dos cardiomiócitos, uma vez que uma possível diminuição da disfunção contrátil dessas células poderia ser resultado da atenuação do estresse do RE.

5.1.9. Papel da proteína BNIP3 na disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados induzida pelo estresse do RE

Após observar que a redução da expressão proteica de BNIP3 não atenuou o estresse do RE, analisamos a contratilidade de cardiomiócitos isolados com o objetivo de verificar se a BNIP3 está envolvida na disfunção contrátil induzida pelo estresse do RE.

O siRNA para BNIP3 não teve efeito na contratilidade de cardiomiócitos isolados (Figura 17). Entretanto, a atenuação da expressão proteica de BNIP3 impediu a redução da amplitude de contração, da $+dL/dt$ e da $-dL/dt$ causada pelo estresse do RE (Figura 17B, C e D). Esse achado sugere que a BNIP3 faz parte da via de sinalização que participa da disfunção contrátil de cardiomiócitos induzida pelo estresse do RE.

Figura 17. Contratilidade de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com siRNA para BNIP3 (12,5 pmol) e tunicamicina (10 $\mu\text{g/ml}$). O siRNA foi adicionado 9 horas antes da incubação dos cardiomiócitos com tunicamicina por 15 horas. A) Traçado representativo da contração celular, B) Amplitude de contração, C) Velocidade máxima de contração (+dL/dt), D) Velocidade de máxima de relaxamento (-dL/dt), E) Tempo para 50% do pico de contração e F) Tempo para 50% do relaxamento. Em cada tratamento foram analisadas pelo menos 49 células. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. sem droga, + $p \leq 0.05$ vs. + Tunicamicina.

Corroborando esses resultados, existem relatos na literatura de que o aumento da expressão proteica de BNIP3 está associado ao desenvolvimento da IC (CHAANINE et al., 2012; CHAANINE et al., 2013). Em corações de ratos, foi demonstrado que a expressão proteica de BNIP3 aumenta após as primeiras semanas de sobrecarga pressórica, atingindo seu pico com o estabelecimento da IC (CHAANINE et al., 2012). Além disso, essa elevação dos níveis proteicos de BNIP3 parece ser mediada pela JNK, uma vez que a expressão de uma forma inativa de JNK atenuou a expressão BNIP3 no coração de ratos com IC (CHAANINE et al., 2012).

Em outro estudo, utilizando o mesmo modelo de sobrecarga pressórica, a atenuação da expressão proteica de BNIP3 melhorou a função sistólica e diastólica do VE de corações insuficientes (CHAANINE et al., 2013). Porém, os autores reportaram que essa melhora da função contrátil foi acompanhada por uma redução do estresse do RE, o que não permite concluir se o ganho de função observado nos corações insuficientes é devido a um efeito direto da BNIP3 ou a atenuação do estresse do RE.

Nossos dados sugerem que a BNIP3 tem um efeito direto na contratilidade de cardiomiócitos, entretanto, a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 pelo estresse do RE parece funcionar como um *loop* de *feedback positivo*, no qual o acúmulo de proteína mal enovelada no RE inicia uma sinalização retrógrada para o núcleo, por meio da ativação da JNK, com o objetivo de aumentar a expressão de várias proteínas, dentre elas a BNIP3. Por sua vez, essa proteína promoveria várias alterações intracelulares que exacerbariam o quadro de estresse do RE, comprometendo ainda mais a função cardíaca. Todavia, ainda não sabemos quais são as alterações intracelulares causadas pela BNIP3 que comprometem a capacidade contrátil de cardiomiócitos após a indução do estresse do RE.

5.1.10. Efeito da atenuação da expressão proteica de BNIP3 na alteração do transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados em resposta ao estresse do RE

Para entender o mecanismo pelo qual a BNIP3 causa a disfunção contrátil dos cardiomiócitos em resposta ao estresse do RE, avaliamos o transiente de Ca^{+2} nos cardiomiócitos incubados com o siRNA para BNIP3, 9 horas antes do tratamento com a tunicamicina por mais 15 horas.

Corroborando a função contrátil dos cardiomiócitos, observamos que o siRNA para BNIP3 não teve efeito algum no transiente de Ca^{+2} (Figura 18). Entretanto, a atenuação da expressão proteica de BNIP3 foi capaz de impedir a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} causada pelo estresse do RE (Figura 18A). Além disso, nenhuma alteração em resposta aos tratamentos foi observada no tempo para 50% do pico do Ca^{+2} e no tempo para 50% da remoção do Ca^{+2} (Figura 18B e C).

Portanto, a disfunção contrátil de cardiomiócitos causada pelo aumento da expressão proteica de BNIP3, em resposta ao estresse do RE, pode ser explicada, pelo menos em parte, por uma redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} , ou seja, a disponibilidade desse íon durante cada ciclo de contração-relaxamento é menor nos cardiomiócitos que receberam a tunicamicina. Entretanto, o fato de não termos observado alteração no tempo para 50% do pico de Ca^{+2} e no tempo para 50% da remoção do Ca^{+2} sugere que os processos de liberação e recaptção do Ca^{+2} estavam funcionando de maneira adequada nos cardiomiócitos com estresse do RE.

Figura 18. Transiente de Ca^{+2} de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com siRNA para BNIP3 (12,5 pmol) e tunicamicina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). O siRNA foi adicionado aos cardiomiócitos 9 horas antes da incubação com tunicamicina por 15 horas. A) Amplitude do transiente de Ca^{+2} , B) Tempo para 50% do pico de Ca^{+2} e C) Tempo para 50% da remoção do Ca^{+2} . Em cada tratamento foram analisadas pelo menos 49 células. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM. * $p \leq 0.05$ vs. sem droga, ⁺ $p \leq 0.05$ vs. + Tunicamicina.

Nos cardiomiócitos, a dinâmica do Ca^{+2} intracelular é coordenada por proteínas, tais como o NCX e a SERCA2 (BERS, 2002). Essas proteínas funcionam como bombas, promovendo o transporte de Ca^{+2} entre os diferentes compartimentos celulares durante cada ciclo de contração-relaxamento (BERS, 2002). Em animais infartados foi reportado que a disfunção contrátil e as alterações no transiente de Ca^{+2} estão associadas à alteração na expressão dessas proteínas que regulam a dinâmica do Ca^{+2} nos cardiomiócitos (WISLOFF et al., 2002; AHLERS et al., 2005; SALLINEN et al., 2007; AIT MOU et al., 2009). Entretanto, ainda não foi investigado se uma possível alteração na expressão das proteínas que regulam a dinâmica do Ca^{+2} estaria envolvida na

diminuição da amplitude transiente de Ca^{+2} causado pelo aumento da expressão proteica de BNIP3 em resposta ao estresse do RE.

5.1.11. Expressão de proteínas envolvidas na regulação da dinâmica do Ca^{+2} em cardiomiócitos com estresse do RE

Conforme discutido no tópico anterior, a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} causada pelo aumento da expressão da proteína BNIP3 em resposta ao estresse do RE, pode ser resultado de uma alteração na expressão de proteínas envolvidas na regulação da dinâmica do Ca^{+2} . Diante disso, avaliamos a expressão de proteínas que controlam o fluxo de Ca^{+2} nos cardiomiócitos incubados com siRNA para BNIP3, 9 horas antes do tratamento com tunicamicina por 15 horas.

Entretanto, nenhuma alteração na expressão proteica da subunidade $\beta 1A$ dos canais de Ca^{+2} Tipo-L, do NCX1, da SERCA2 e da PLB foi observada em resposta a indução do estresse do RE ou a atenuação da expressão proteica de BNIP3 (Figura 19A, B, C e D). Além disso, avaliamos a fosforilação da PLB nos sítios Ser¹⁶/Thr¹⁷, porém, não houve diferença entre os grupos experimentais (Figura 19E).

Esse achado sugere que a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} e a consequente disfunção contrátil dos cardiomiócitos após a indução estresse do RE não estão associados a uma alteração na expressão das proteínas que regulam o fluxo Ca^{+2} . Esse resultado reforça a ideia de que a liberação e a captação de Ca^{+2} pelo RE não estão alterados nos cardiomiócitos com estresse do RE, uma vez que, além de não termos observado alteração na expressão das proteínas reguladoras do Ca^{+2} , o tempo para 50% do pico de Ca^{+2} e o tempo para 50% da remoção do Ca^{+2} também não foram alterados pela tratamento das células com a tunicamicina.

Figura 19. Níveis proteicos de A) Canal de Ca⁺² tipo-L, subunidade β 1A, B) Trocador Na⁺/Ca⁺² (NCX1), C) SERCA2, D) Fosfolambam (PLB) e E) PLB fosforilada nos sítios Ser¹⁶/Thr¹⁷, de cardiomiócitos isolados, incubados (+) ou não (-) com siRNA para BNIP3 (12,5 pmol) e tunicamicina (10 μ g/ml). O siRNA para BNIP3 foi adicionado 9 horas antes da incubação dos cardiomiócitos com tunicamicina por 15 horas. O número amostral em cada tratamento foi 6. Os dados estão apresentados em média $\pm$ EPM.

Contudo, a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} pode ser resultado de uma menor quantidade desse íon dentro do RE. Apesar de nenhuma alteração ter sido observada na fosforilação da PLB e na expressão proteica da SERCA2 e da PLB, o que sugere que a captação de Ca^{+2} pelo RE não estava alterada nos cardiomiócitos com estresse do RE, é possível que a redução dos estoques de Ca^{+2} do RE ocorra por meio do vazamento desse íon para o citosol (GREGORY e KRANIAS, 2006).

De fato, o aumento da expressão proteica de BNIP3 em cardiomiócitos causa a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} e do conteúdo desse íon no RE (CHAANINE et al., 2013). No entanto, esse efeito parece ser dependente da localização de BNIP3. ZHANG et al. (2009) reportaram que a redução do nível de Ca^{+2} no RE ocorreu apenas quando a BNIP3 estava no RE. Quando presente na membrana mitocondrial, a BNIP3 ainda era capaz de iniciar o processo apoptótico, porém, por uma via independente de Ca^{+2} (ZHANG et al., 2009).

Por esse motivo, e para o manuscrito a ser redigido, realizaremos nos próximos meses a técnica de imunocitoquímica para determinar a localização da BNIP3 nos cardiomiócitos após a indução do estresse do RE. Em paralelo, avaliaremos o conteúdo de Ca^{+2} do RE em cardiomiócitos incubados ou não com o siRNA para BNIP3 e a tunicamicina, no intuito de determinar se a redução da amplitude do transiente de Ca^{+2} e a consequente disfunção contrátil de cardiomiócitos com estresse do RE, é resultado de uma diminuição do conteúdo de Ca^{+2} presente no RE.

5.2. Segunda etapa

Nos experimentos *in vitro*, demonstramos que o estresse do RE causa a disfunção contrátil de cardiomiócitos por meio da ativação da via de sinalização JNK/BNIP3. Entretanto, ainda não se sabe se a disfunção cardíaca causada pelo IM estaria associada ao estresse do RE e à ativação da via de sinalização JNK/BNIP3. Outro ponto importante, é se o TFA seria capaz de atenuar essa resposta.

Para tanto, apresentaremos nesse tópico o efeito do TFA sobre os parâmetros morfofuncionais, o estresse do RE e a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 no coração de ratos infartados

5.2.1. Parâmetros ecocardiográficos

No intuito de avaliar as alterações morfológicas e o grau de disfunção cardíaca causados pelo IM, assim como os efeitos do TFA, realizamos a análise ecocardiográfica na quarta e na décima segunda semana após a cirurgia para indução do IM.

Depois da primeira avaliação ecocardiográfica, quatro semanas após a indução do IM, excluimos do experimento os animais infartados que apresentaram FE superior a 35%. Além disso, alocamos os animais infartados nos grupos INF-SED e INF-TF, de uma forma que não houvesse diferença nos parâmetros ecocardiográficos pré- período experimental. Assim, podemos garantir que as diferenças encontradas entre grupos INF-SED e INF-TF, após a décima quarta semana de experimento, são de fato decorrentes do TFA.

Doze semanas após a indução do IM, observamos que os animais do grupo INF-SED apresentaram um aumento do DSFVE, o qual foi acompanhado por uma redução da FE (Tabela 3). Entretanto, essa redução da capacidade contrátil observada nos animais infartados foi atenuada pelo TFA, uma vez que não houve diferença estatística na FE e no DSFVE entre os grupos INF-TF e SHAM-SED (Tabela 3). Além disso, o SIVS e o SIVD foi menor no grupo INF-TF quando comparado aos grupos SHAM-SED e INF-SED, respectivamente (Tabela 3).

Já está bem descrito na literatura que o TFA é capaz de atenuar a disfunção cardíaca de animais infartados. Esse fenótipo é resultado de uma melhora da contratilidade dos cardiomiócitos e de alterações estruturais, como, redução da dilatação das câmaras cardíacas e menor deposição de colágeno (WISLOFF et al., 2002; XU et al., 2008; BITO et al., 2010; KRALJEVIC et al., 2013).

Tabela 3. Parâmetros ecocardiográficos

	SHAM-SED (n = 6)	INF-SED (n = 5)	INF-TF (n= 5)
DSFVE, mm	4,43 ± 0,24	5,87 ± 0,33 *	5,26 ± 0,54
DDFVE, mm	7,33 ± 0,37	8,19 ± 0,44	7,96 ± 0,51
SIVS, mm	1,47 ± 0,04	1,70 ± 0,13	1,19 ± 0,10 #
SIVD, mm	1,08 ± 0,04	1,02 ± 0,04	0,81 ± 0,09 *
PPVES, mm	2,12 ± 0,09	2,13 ± 0,08	2,19 ± 0,25
PPVED, mm	1,36 ± 0,12	1,42 ± 0,12	1,14 ± 0,07
FC, bpm	262 ± 7,66	250 ± 13,64	270 ± 19,50
FE, %	39,6 ± 1,20	28,0 ± 2,84 *	34,3 ± 3,4

Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE); Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE); Septo interventricular ao final da sístole (SIVS); Septo interventricular ao final da diástole (SIVD); Parede posterior do ventrículo esquerdo ao final da sístole (PPVES); Parede posterior do ventrículo esquerdo ao final da diástole (PPVED); Frequência cardíaca (FC); Fração encurtamento do ventrículo esquerdo (FE), dos grupos controle sedentário (SHAM-SED), infartado sedentário (INF-SED) e infartado treinado (INF-TF). O número de ratos em cada grupo está entre parênteses. Dados apresentados como média ± erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SHAM-SED; # $P \leq 0,05$ vs. INF-SED.

De fato, a melhora da função cardíaca observada nos animais do grupo INF-TF, foi acompanhada por uma redução do DSFVE. Interessante notar também que o TFA reduziu a espessura do SIVD. Esse parâmetro é um indicativo de dilatação do ventrículo esquerdo, comumente observada em animais com IM. No entanto, esse resultado foi observado apenas no grupo INF-TF e apesar de sugerir um efeito deletério do TFA no processo de remodelamento cardíaco, não podemos desconsiderar que essa alteração estrutural foi acompanhada por redução do DSFVE e melhora da função cardíaca desses animais .

Corroborando outros trabalhos (XU et al., 2008; KRALJEVIC et al., 2013), nossos dados demonstram que o TFA é capaz de atenuar as alterações estruturais e a disfunção cardíaca causadas pelo IM.

5.2.2. Avaliação da tolerância a realização de esforço físico

Para avaliar a eficácia do protocolo de TFA utilizado nesse estudo, submetemos os animais a um teste de corrida em esteira rolante na quarta e na décima segunda semana após a realização da cirurgia para indução do IM.

Nenhuma diferença entre os grupos experimentais foi observada na distância percorrida pelos ratos no teste máximo em esteira rolante, realizado na quarta semana depois da indução do IM (Figura 20). Esse resultado demonstra que antes da realização do TFA os animais apresentavam aptidão física semelhante.

Figura 20. Distância máxima percorrida pelos animais dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, $n = 6$), infartado sedentário (INF-SED, $n = 5$) e infartado treinado (INF-TF, $n = 5$) no teste de tolerância ao esforço realizado pré e pós o treinamento físico aeróbico (TFA). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SHAM-SED pós – TFA, # $P \leq 0,05$ vs. INF-SED pós – TFA.

Também não observamos alteração na distancia percorrida pelos animais do grupo INF-SED no teste de corrida em esteira rolante realizado 12 semanas após a indução do IM (Figura 20). Independente da etiologia, as doenças cardiovasculares têm como via final comum a IC e um dos sinais clássicos da instalação dessa síndrome é a intolerância à realização de esforço físico (SULLIVAN, GREEN e COBB, 1991; CLARK, POOLE-WILSON e

COATS, 1996; WITTE e CLARK, 2007). Entretanto, nossos resultados demonstram que, apesar dos ratos infartados apresentarem disfunção cardíaca, esses animais ainda não apresentaram intolerância aos esforços.

Após a realização do TFA, observamos um aumento na distância percorrida pelos ratos do grupo INF-TF no teste de corrida em esteira rolante (Figura 20). Esse aumento da tolerância a realização de esforço físico é resultado de uma série de adaptações promovidas pelo TFA, tanto no sistema cardiovascular, como, na musculatura esquelética (WISLOFF et al., 2002; XU et al., 2008; BITO et al., 2010; BUENO et al., 2010; FERREIRA et al., 2010; KRALJEVIC et al., 2013; ALVES et al., 2015). Portanto, esse achado demonstra a eficácia do TFA utilizado no presente estudo.

5.2.3. Massa tecidual e tamanho do IM

Quarenta e oito horas após a realização do último teste máximo de corrida em esteira rolante, sacrificamos os animais dos grupos experimentais e avaliamos a massa corporal, cardíaca e do pulmão. Além disso, realizamos a análise histológica do tamanho do IM.

A massa corporal e a massa cardíaca foram semelhantes entre os grupos experimentais (Tabela 4). Entretanto, a relação massa cardíaca/massa corporal foi maior nos animais infartados de ambos os grupos, INF-SED e INF-TF (Tabela 4). A massa relativa do coração é um índice de hipertrofia cardíaca e o aumento desse parâmetro sugere que os animais infartados apresentam esse fenótipo e que o TFA não foi capaz de atenuar essa resposta hipertrófica.

Entretanto, existe uma distinção do ponto de vista funcional e molecular entre a hipertrofia cardíaca induzida pelo TFA (fisiológica) e pelo IM (patológica). Enquanto, a ativação da via de sinalização calcineurina/NFAT pelo IM, normalmente, resulta em disfunção cardíaca (WILKINS et al., 2004; HEINEKE e MOKKENTIN, 2006), a ativação da via de sinalização PI3K/AKT pelo TFA também promove hipertrofia cardíaca, porém, com ganhos funcionais (DEBOSCH et al., 2006; KEMI et al., 2008). Além disso, demonstramos em outro trabalho do nosso grupo que o TFA desativa a via de sinalização calcineurina/NFAT no coração de camundongos com IC induzida por

hiperatividade simpática (OLIVEIRA et al., 2009). Esse achado, associado a melhora a da função cardíaca observada nos animais infartados submetidos ao TFA, sugere que, apesar de não termos encontrado diferença no peso relativo do coração entre os grupos INF-SED e INF-TF, o TFA provavelmente promoveu o remodelamento cardíaco reverso no coração de animais infartados como anteriormente demonstrado pelo nosso grupo.

Tabela 4. Características gerais dos animais

	SHAM (n = 6)	INF-SED (n = 5)	INF-TF (n = 5)
Massa corporal, g	405 ± 13,4	415 ± 16,5	406 ± 6,32
Massa cardíaca, g	1,13 ± 0,04	1,29 ± 0,08	1,28 ± 0,04
Massa cardíaca/massa corporal, mg/g	2,78 ± 0,05	3,08 ± 0,08 *	3,16 ± 0,05 *
Massa do pulmão, g	1,74 ± 0,09	1,89 ± 0,16	1,90 ± 0,07
Massa úmida/seca do pulmão, g/g	4,26 ± 0,11	4,53 ± 0,09	4,57 ± 0,07
Tamanho do IM, %	-	26 ± 3,46	25 ± 5,59

Grupos controle sedentário (SHAM-SED), infartado sedentário (INF-SED) e infartado treinado (INF-TF). O número de ratos em cada grupo está entre parênteses. Os dados estão apresentados em média ± erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SHAM-SED.

A massa do pulmão e a relação massa úmida/massa seca do pulmão não foi diferente entre os grupos experimentais (Tabela 4). O edema pulmonar é utilizado como um indicativo de IC congestiva, entretanto, os animais dos grupos INF-SED e INF-TF não apresentam IC em fase congestiva.

Três meses após a realização da cirurgia para oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda, o tamanho do IM nos animais do grupo INF-SED foi de 26 % (Tabela 4). Além disso, nenhuma diferença no tamanho do IM foi observada entre os grupos INF-SED e INF-TF (Tabela 4). Esses achados corroboram outros trabalhos do nosso e de outros grupos de pesquisa, que também não observaram redução do tamanho do IM pelo TFA (XU et al., 2008; CAMPOS et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; JANNIG et al.,

2014). Portanto, apesar dos efeitos benéficos na estrutura e função de corações infartados, o TFA realizado após a oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda não foi capaz de reduzir o tamanho do IM.

5.2.4. Efeito do TFA no estresse do RE e na ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 no coração de ratos infartados

Após a caracterização das alterações morfofuncionais no coração dos animais infartados, avaliamos a expressão proteica dos marcadores de estresse do RE, com o objetivo de verificar se a disfunção cardíaca observada nos ratos com IM estaria associada ao estresse do RE, e se o TFA seria capaz de atenuar a expressão desses marcadores.

Nos animais infartados, não encontramos alteração significativa na expressão proteica de GRP78 (Figura 21A). Entretanto, a expressão de outro marcador de estresse do RE, a proteína CHOP, estava aumentada no miocárdio dos ratos do grupo INF-SED (Figura 21B). Esse resultado sugere que o IM causa o estresse do RE. No entanto, o TFA foi capaz de atenuar essa resposta. Observamos que a expressão proteica de GRP78 foi menor nos animais do grupo INF-TF, quando comparado ao grupo INF-SED (Figura 21A). Além disso, o TFA normalizou a expressão da proteína CHOP, a qual estava aumentada no coração dos animais infartados sedentários (Figura 21B).

Corroborando o estresse do RE observado no coração dos animais infartados, outros pesquisadores também reportaram aumento da expressão proteica de marcadores do estresse do RE após a indução do IM (LIU et al., 2014; LI et al., 2015; LUO et al., 2015). A relevância desse quadro de estresse para fisiopatologia das doenças cardiovasculares foi demonstrada por OKADA et al. (2004). Utilizando um modelo de IC induzida por sobrecarga pressórica em camundongos, os autores reportaram que uma semana após a realização da cirurgia para constrição da artéria aorta, os animais ainda não apresentavam sinais de IC, porém, foi constatado hipertrofia cardíaca e aumento da expressão proteica de GRP78 e calreticulina. O aumento apenas dos níveis proteicos dessas duas chaperonas do RE sugere que a UPR ainda se encontra na sua fase de adaptação. No entanto, 4 semanas após a realização da

cirurgia, os camundongos apresentavam IC, a qual foi acompanhada por uma normalização da expressão proteica de GRP78 e de calreticulina, entretanto os níveis da proteína CHOP estavam aumentados, o que caracteriza a fase de apoptose da UPR. Esse achado de OKADA et al. (2004) sugere que a instalação da síndrome da IC cursa com o estresse do RE que progride da fase de adaptação da UPR para a fase apoptótica.

Figura 21. Expressão proteica de A) GRP78 e B) CHOP no miocárdio dos ratos dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, n = 5). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SHAM-SED, [#] $P \leq 0,05$ vs. INF-SED.

No presente estudo, apesar dos animais infartados terem apresentado um aumento de 44% na expressão proteica da GRP78, não observamos diferença estatística entre os grupos SHAM-SED e INF-SED. Esse achado, associado ao aumento dos níveis proteicos de CHOP nos corações dos ratos infartados, sugerem que os animais do grupo INF-SED, encontram-se no início da fase apoptótica da UPR.

A presença de dados cada vez mais consistentes na literatura comprovando que o estresse do RE está envolvido na fisiopatologia das

doenças cardiovasculares, tem incentivado a comunidade científica na busca de novas terapias para o tratamento das doenças cardiovasculares que tenham como alvo o estresse do RE. Neste sentido, demonstramos, pela primeira vez, que o TFA, uma das terapias mais baratas e comumente utilizada no tratamento das doenças cardiovasculares, foi capaz de atenuar o estresse do RE no miocárdio de ratos infartados, o qual estava associado a melhora da função cardíaca desses animais. Nos experimentos realizados na etapa 3 do presente estudo, avaliamos se a atenuação do estresse do RE pelo TFA estaria associada ao restabelecimento da ERAD no coração de ratos com IM. Esses resultados serão apresentados e discutidos no item 5.3.

Nos experimentos *in vitro*, demonstramos que o estresse do RE causa a disfunção contrátil dos cardiomiócitos isolados por meio da ativação da via de sinalização JNK/BNIP3. Neste sentido, analisamos a expressão proteica de JNK e de BNIP3, além dos níveis de JNK fosforilada, no intuito de verificar se o estresse do RE, observado no coração dos animais infartados, estaria associado a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 e se a atenuação do estresse do RE pelo TFA seria acompanhada pela redução da fosforilação de JNK e da expressão proteica de BNIP3.

O IM não alterou a expressão proteica de JNK (Figura 22A). No entanto, a fosforilação de JNK e a expressão proteica de BNIP3 estavam aumentadas no grupo INF-SED, quando comparadas ao grupo SHAM-SED (Figura 22B e C). Corroborando a atenuação do estresse do RE pelo TFA, não observamos diferença na fosforilação de JNK e na expressão proteica de JNK e BNIP3 entre os grupos INF-TF e SHAM-SED (Figura 22). Esses resultados reforçam os achados *in vitro*, de que o acúmulo de proteínas mal enovelada no RE promove a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3, a qual compromete a função cardíaca de cardiomiócitos. Além disso, destacam o efeito terapêutico TFA, que por meio da atenuação do estresse do RE, desativa a via de sinalização JNK/BNIP3, melhorando a função cardíaca de ratos infartados.

Figura 22. Níveis proteicos de A) JNK, B) JNK fosforilada e C) BNIP3 no miocárdio dos ratos dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, n = 5). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SHAM-SED.

Têm sido reportado que a expressão proteica de BNIP3 aumenta em resposta a diferentes condições de estresse (CHAANINE et al., 2012; DHINGRA et al., 2014; JANNIG et al., 2014). Corroborando esse achado, fomos os primeiros a observar que o acúmulo de proteína mal enovelada no RE de cardiomiócitos também aumenta a expressão da proteína BNIP3. Entretanto, independente da sua gênese, existe um consenso na literatura de que o

aumento da expressão proteica de BNIP3 está associado ao remodelamento cardíaco patológico e ao comprometimento da função cardíaca (DIWAN et al., 2007; CHAANINE et al., 2012; CHAANINE et al., 2013). Neste sentido, foi demonstrado que a superexpressão de BNIP3 desde a fase neonatal causa apoptose dos cardiomiócitos, além de aumento do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e redução da fração de encurtamento (DIWAN et al., 2007).

Em paralelo ao nosso achado de que a diminuição da expressão proteica de BNIP3 pelo TFA está associada a atenuação do remodelamento cardíaco patológico e da disfunção cardíaca em ratos infartados, DIWAN et al. (2007) reportaram que a deleção de BNIP3 reduziu a dilatação do ventrículo esquerdo, o número de células apoptóticas e a disfunção cardíaca, apesar de não ter tido efeito no tamanho do IM em camundongos. Resultado semelhante foi observado em animais com IC, nos quais a atenuação da expressão da proteína BNIP3, por meio da técnica de adenovírus associado, diminuiu a apoptose celular, o diâmetro do ventrículo esquerdo em sístole e diástole e aumentou a fração de ejeção (CHAANINE et al., 2013).

Parte desses efeitos deletérios de BNIP3 na fisiopatologia das doenças cardiovasculares é resultado de alterações intracelulares que comprometem a função e a viabilidade dos cardiomiócitos. Por exemplo, a disfunção contrátil observada em cardiomiócitos com níveis elevados da proteína BNIP3 está associada a uma redução do conteúdo de Ca^{+2} no RE (CHAANINE et al., 2013). Em células nervosas, foi observado que o Ca^{+2} que extravasa do RE é captado pela mitocôndria, causando perda do potencial de membrana mitocondrial e, consequente, início do processo apoptótico (ZHANG et al., 2009). Além disso, evidências sugerem que a BNIP3 também pode atuar diretamente na mitocôndria, promovendo a apoptose celular por uma via independente de Ca^{+2} (ZHANG et al., 2009).

Diante disso, é razoável sugerir que a melhora da função cardíaca observada nos animais infartados após a atenuação da expressão proteica de BNIP3 pelo TFA, seja resultado da preservação dos estoques de Ca^{+2} do RE. A manutenção do conteúdo de Ca^{+2} do RE também reduziria a captação desse íon pela mitocôndria, diminuindo a apoptose dos cardiomiócitos presentes no

miocárdio remanescente, que, por sua vez, atenuaria o remodelamento cardíaco patológico no coração dos ratos infartados.

Portanto, nossos achados demonstram que o estresse do RE, por meio da ativação da via de sinalização JNK/BNIP3, causa a disfunção contrátil de cardiomiócitos, e que o TFA é capaz de atenuar essa resposta no coração de ratos infartados, o que está associado a atenuação do remodelamento cardíaco patológico e da disfunção cardíaca.

5.3. Terceira etapa

Na segunda etapa, observamos que, de fato, o estresse do RE ativa a via de sinalização JNK/BNIP3 no miocárdio de ratos infartados e que o TFA é capaz de atenuar essa resposta. Na terceira e última etapa do presente estudo, analisamos o perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR no coração de ratos saudáveis submetidos ao TFA, com o objetivo de identificar quais genes teriam sua expressão modulada pelo TFA. Posteriormente, avaliamos a expressão proteica de alguns dos genes estudados, no coração de ratos saudáveis e infartados submetidos ao TFA.

5.3.1. Massa tecidual e tolerância a realização de esforço físico

Conforme apresentado na tabela 5, não houve diferença entre os grupos experimentais na massa corporal, massa cardíaca e massa relativa do coração. Além disso, a distância percorrida no teste de corrida em esteira rolante, realizado antes do TFA, foi semelhante entre os grupos experimentais. No entanto, o TFA aumentou a tolerância a realização de esforço físico dos animais, uma vez que a distância percorrida pelos ratos do grupo TF foi significativamente maior, quando comparada a do grupo SED (Tabela 3). Esse dado demonstra que o protocolo de TFA utilizado no presente estudo foi efetivo.

Tabela 5. Massa tecidual e distância percorrida

	SED (n = 6)	TF (n = 5)
Massa corporal, g	405 ± 13,4	417 ± 7,0
Massa cardíaca, g	1,13 ± 0,04	1,23 ± 0,05
Massa corporal/massa cardíaca, mg/g	2,78 ± 0,05	2,92 ± 0,09
Distância percorrida, m	365 ± 22,9	545 ± 40,7 *

Grupos sedentário (SED) e treinado (TF). O número de animais em cada grupo está entre parênteses. Os dados estão apresentados em média ± erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SED.

5.3.2. Perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR

O perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR está apresentado na tabela 6. Dos 84 genes analisados, Creb3l3, Creb3l4, Ern2, Hspb9, Mapk10, Ppp1r15a, Srebf1 e Srebf2 apresentaram expressão muito baixa e foram excluídos do experimento, conforme as especificações da empresa fabricante do *PCR array*.

Tabela 6. Perfil de expressão dos genes envolvidos na UPR

Símbolo do gene	Nome do gene	$2^{(-DDCt)}$		Fold vs. Sed
		Sed	TF	
<i>Manf</i>	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	1,04 ± 0,20	1,00 ± 0,06	0,96
<i>Atf4</i>	Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	1,12 ± 0,36	0,65 ± 0,10	0,58
<i>Atf6</i>	Activating transcription factor 6	1,03 ± 0,19	0,83 ± 0,18	0,80
<i>Atxn3</i>	Ataxin 3	1,13 ± 0,37	0,80 ± 0,05	0,71
<i>Bax</i>	Bcl2-associated X protein	1,03 ± 0,20	1,26 ± 0,08	1,22
<i>Calr</i>	Calreticulin	1,03 ± 0,19	0,64 ± 0,04	0,62
<i>Canx</i>	Calnexin	1,04 ± 0,20	1,00 ± 0,06	0,96
<i>Cct4</i>	Chaperonin containing Tcp1, subunit 4 (delta)	1,04 ± 0,19	0,81 ± 0,12	0,78
<i>Cct7</i>	Chaperonin containing Tcp1, subunit 7 (eta)	1,03 ± 0,19	0,82 ± 0,18	0,80
<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1,19 ± 0,53	0,50 ± 0,03	0,42
<i>Creb3</i>	CAMP responsive element binding protein 3	1,03 ± 0,19	0,87 ± 0,27	0,84
<i>Creb3l1</i>	CAMP responsive element binding protein 3-like 1	1,00 ± 0,05	1,33 ± 0,30	1,33

<i>Creb3l2</i>	CAMP responsive element binding protein 3-like 2	1,04 ± 0,20	1,01 ± 0,06	0,97
<i>Ddit3</i>	DNA-damage inducible transcript 3	1,03 ± 0,19	0,63 ± 0,04	0,61
<i>Derl1</i>	Der1-like domain family, member 1	1,00 ± 0,05	0,65 ± 0,10	0,65
<i>Dnajb9</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	1,03 ± 0,19	0,64 ± 0,04	0,62
<i>Dnajc10</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10	1,03 ± 0,19	0,83 ± 0,19	0,80
<i>Dnajc3</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	1,00 ± 0,05	0,80 ± 0,05	0,80
<i>Dnajc4</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4	1,04 ± 0,20	0,85 ± 0,19	0,81
<i>Dyt1</i>	Dystonia 1	1,04 ± 0,20	1,00 ± 0,06	0,96
<i>Edem1</i>	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1	1,04 ± 0,20	1,01 ± 0,06	0,97
<i>Edem2</i>	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2	1,03 ± 0,19	0,83 ± 0,18	0,80
<i>Eif2a</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2A	1,03 ± 0,19	1,26 ± 0,08	1,22
<i>Eif2ak2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	1,03 ± 0,19	0,83 ± 0,18	0,80
<i>Eif2ak3</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3	1,03 ± 0,19	1,07 ± 0,25	1,04
<i>Eif2ak4</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	1,00 ± 0,00	1,27 ± 0,29	1,27

<i>Ero1l</i>	ERO1-like (<i>S. cerevisiae</i>)	$1,13 \pm 0,36$	$0,80 \pm 0,05$	0,71
<i>Fbxo6</i>	F-box protein 6	$1,00 \pm 0,06$	$0,79 \pm 0,05$	0,79
<i>Ganab</i>	Glucosidase, alpha; neutral AB	$1,04 \pm 0,20$	$1,00 \pm 0,06$	0,96
<i>Herpud1</i>	Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	$1,03 \pm 0,19$	$0,51 \pm 0,08$	0,50
<i>Herpud2</i>	HERPUD family member 2	$1,04 \pm 0,20$	$1,00 \pm 0,06$	0,96
<i>Hspa1l</i>	Heat shock protein 1-like	$1,17 \pm 0,38$	$1,02 \pm 0,16$	0,88
<i>Hspa2</i>	Heat shock protein 2	$1,04 \pm 0,19$	$0,85 \pm 0,19$	0,81
<i>Hspa4</i>	Heat shock protein 4	$1,04 \pm 0,20$	$1,00 \pm 0,06$	0,96
<i>Hspa4l</i>	Heat shock protein 4-like	$1,04 \pm 0,20$	$0,81 \pm 0,12$	0,78
<i>Hspa5</i>	Heat shock protein 5	$1,08 \pm 0,30$	$1,06 \pm 0,24$	0,99
<i>Hsph1</i>	Heat shock 105/110 protein 1	$1,08 \pm 0,30$	$1,03 \pm 0,16$	0,96
<i>Htra2</i>	HtrA serine peptidase 2	$1,03 \pm 0,19$	$1,02 \pm 0,16$	0,99
<i>Htra4</i>	HtrA serine peptidase 4	$1,08 \pm 0,30$	$1,66 \pm 0,37$	1,54
<i>Insig1</i>	Insulin induced gene 1	$1,00 \pm 0,05$	$0,80 \pm 0,05$	0,80
<i>Insig2</i>	Insulin induced gene 2	$1,00 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,05$	0,79
<i>Mapk8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8	$1,04 \pm 0,20$	$0,66 \pm 0,14$	0,64

<i>Mapk9</i>	Mitogen-activated protein kinase 9	1,04 ± 0,20	0,84 ± 0,19	0,81
<i>Mbtps1</i>	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	1,08 ± 0,30	1,25 ± 0,08	1,17
<i>Mbtps2</i>	Membrane-bound transcription factor peptidase, site 2	1,00 ± 0,06	1,34 ± 0,31	1,33
<i>Nploc4</i>	Nuclear protein localization 4 homolog (S. cerevisiae)	1,00 ± 0,05	1,05 ± 0,23	1,05
<i>Nucb1</i>	Nucleobindin 1	1,04 ± 0,19	1,01 ± 0,06	0,97
<i>Os9</i>	Osteosarcoma amplified 9	1,07 ± 0,30	1,26 ± 0,08	1,17
<i>Pdia3</i>	Protein disulfide isomerase family A, member 3	1,08 ± 0,30	1,27 ± 0,08	1,18
<i>Pfdn5</i>	Prefoldin subunit 5	1,03 ± 0,19	1,02 ± 0,16	0,99
<i>Pfdn6</i>	Prefoldin subunit 6	1,00 ± 0,05	0,80 ± 0,05	0,80
<i>Ppia</i>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	1,03 ± 0,19	0,63 ± 0,04	0,61
<i>Ppib</i>	Peptidylprolyl isomerase B	1,03 ± 0,19	1,25 ± 0,07	1,21
<i>Ppic</i>	Peptidylprolyl isomerase C	1,00 ± 0,06	1,09 ± 0,34	1,09
<i>Ppp1r15b</i>	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15b	1,04 ± 0,20	1,01 ± 0,06	0,97
<i>Prkcsh</i>	Protein kinase C substrate 80K-H	1,08 ± 0,30	1,26 ± 0,07	1,17
<i>Rnf139</i>	Ring finger protein 139	1,00 ± 0,05	0,79 ± 0,05	0,79
<i>Rpn1</i>	Ribophorin I	1,00 ± 0,06	0,79 ± 0,05	0,79

<i>Scap</i>	SREBF chaperone	$1,07 \pm 0,30$	$1,26 \pm 0,07$	1,17
<i>Sec62</i>	SEC62 homolog (S. cerevisiae)	$1,03 \pm 0,19$	$0,82 \pm 0,19$	0,80
<i>Sec63</i>	SEC63 homolog (S. cerevisiae)	$1,03 \pm 0,19$	$1,26 \pm 0,08$	1,22
<i>Sel1l</i>	Sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)	$1,08 \pm 0,26$	$1,68 \pm 0,38$	1,56
<i>Sels</i>	Selenoprotein S	$1,08 \pm 0,26$	$1,00 \pm 0,06$	0,93
<i>Serp1</i>	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	$1,00 \pm 0,06$	$1,33 \pm 0,31$	1,33
<i>Sil1</i>	SIL1 homolog, endoplasmic reticulum chaperone (S. cerevisiae)	$1,04 \pm 0,20$	$1,00 \pm 0,06$	0,96
<i>Syvn1</i>	Synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin	$1,04 \pm 0,20$	$1,01 \pm 0,06$	0,97
<i>Tcp1</i>	T-complex 1	$1,00 \pm 0,06$	$1,04 \pm 0,23$	1,03
<i>Hsp90b1</i>	Heat shock protein 90, beta, member 1	$1,04 \pm 0,20$	$1,01 \pm 0,06$	0,97
<i>Ube2g2</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast)	$1,04 \pm 0,20$	$1,00 \pm 0,06$	0,96
<i>Ube2j2</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	$1,03 \pm 0,19$	$0,83 \pm 0,18$	0,81
<i>Ubxn4</i>	UBX domain protein 4	$1,08 \pm 0,26$	$1,01 \pm 0,06$	0,94
<i>Ufd1l</i>	Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	$1,00 \pm 0,06$	$0,80 \pm 0,05$	0,79
<i>Uggt1</i>	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1	$1,07 \pm 0,25$	$1,00 \pm 0,06$	0,93

<i>Usp14</i>	Ubiquitin specific peptidase 14	1,04 ± 0,20	1,00 ± 0,06	0,96
<i>Vcp</i>	Valosin-containing protein	1,00 ± 0,05	0,79 ± 0,05	0,79
<i>Xbp1</i>	X-box binding protein 1	1,21 ± 0,48	1,59 ± 0,09	1,32

Grupos sedentário (SED, n = 3) e treinado (TF, n = 3). Os dados estão apresentados em média ± erro padrão da média.

A UPR é uma via de sinalização de resposta ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE. Quando ativada, essa cascata de sinalização promove a expressão de genes envolvidos em diferentes processos intracelulares (GLEMBOTSKI, 2007; TOTH et al., 2007; GROENENDYK et al., 2010). Apesar de estudos na literatura terem demonstrado que o TFA é capaz de ativar outras vias de resposta a perda da proteostase celular no coração, como, por exemplo, a *Heat Shock Response* (REGER et al., 2006), nenhum dos genes analisados no presente trabalho, apresentou diferença na sua expressão de, pelo menos, 1 fold, entre os grupos SED e TF (Tabela 6).

Apesar de não termos realizado a análise estatística dos dados, devido ao número reduzido de animais, esse resultado é um indício de que o TFA não ativa a UPR no coração de ratos saudáveis. Outros trabalhos, também, não observaram efeito de 1 ou 5 sessões de exercício físico na ativação da UPR no miocárdio de animais saudáveis (MURLASITS, LEE e POWERS, 2007; WU et al., 2011). Em outros tecidos, essa resposta parece ser diferente. WU et al. (2011) demonstraram que UPR não só é ativada no músculo esquelético de camundongos exercitados, mas também, que ela é importante para a adaptação dos animais ao TFA.

No coração, é possível que a ativação de outras vias de sinalização envolvidas na manutenção da proteostase, seja suficiente para evitar ou restaurar um possível acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE causado pelo TFA, e por isso, a UPR não seria ativada. Além disso, não podemos desconsiderar o TFA é um estímulo crônico e que a expressão gênica representa, apenas, o primeiro nível no controle de uma determinada resposta celular, ou seja, pode ser que uma alteração na expressão dos genes envolvidos na UPR tenha ocorrido nas primeiras semanas de TFA. Por esse motivo, verificamos os níveis proteicos de alguns dos genes analisados, para comprovar se esse achado é resultado de uma regulação em nível transcricional.

5.3.3. Expressão proteica de genes envolvidos na UPR no coração de ratos treinados

Para verificar se, de fato, o TFA não ativa a UPR no miocárdio de ratos, analisamos a expressão de proteínas envolvidas nos diferentes processos intracelulares coordenados pela UPR. A GRP78 e a DNAJC3, são chaperonas que atuam no enovelamento de proteínas (RUTKOWSKI et al., 2007; GROENENDYK et al., 2010). A CHOP, por sua vez, promove a apoptose celular (GLEMBOTSKI, 2007), enquanto, a DERLIN-1 e a VCP participam da ERAD (DAI e LI, 2001; MEUSSER et al., 2005).

A expressão proteica de GRP78, CHOP, DNAJC3 e VCP foi semelhante entre os grupos SED e TF (Figura 23A, B, C e E). No entanto, observamos que os níveis proteicos de DERLIN-1 estavam aumentados no coração dos animais treinados (Figura 23D).

A DERLIN-1 junto com outras duas isoformas, DERLIN-2 e DERLIN-3, compõem uma família de proteínas conhecidas como Derlins (MEUSSER et al., 2005; BELMONT et al., 2010). Apesar da função dessas proteínas ainda não estar totalmente esclarecida, sabe-se que a DERLIN-1 participa da ERAD, facilitando a retro-translocação de proteínas do lúmen do RE para o citosol (MEUSSER et al., 2005; BELMONT et al., 2010).

O RE não possui um sistema proteolítico próprio, por este motivo, as proteínas mal enoveladas antes de serem degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma, devem ser reconhecidas, ubiquitinadas e retro-translocadas para o citosol (MEUSSER et al., 2005). Esses quatro processos compreendem a ERAD, que tem como objetivo remover o excesso de proteínas mal enoveladas presente no RE, durante a fase de adaptação da UPR (MEUSSER et al., 2005; GROENENDYK et al., 2010).

Figura 23. Expressão proteica de A) GRP78, B) DNAJC3, C) CHOP, D) VCP e E) DERLIN-1 no coração de ratos sedentários (SED, n = 6) e treinados (TF, n = 5). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SED.

Existe uma grande discussão na literatura sobre qual proteína estaria envolvida na reto-translocação das proteínas mal enoveladas para o citosol. Inicialmente, acreditava-se que a proteína Sec61, responsável pela

translocação das novas cadeias polipeptídicas para o lúmen do RE, também estaria envolvida no processo de retro-translocação (MEUSSER et al., 2005; GUERRIERO e BRODSKY, 2012). Porém, foi demonstrado que a DERLIN-1 por meio da interação com outras proteínas, dentre elas a VCP, promove a retro-translocação de proteínas mal enoveladas presentes no RE (YE et al., 2004). Em *C. Elegans*, a depleção de DERLIN-1 é capaz de ativar a UPR, demonstrando que a deleção da DERLIN-1 causa o acúmulo de proteínas no RE (CALFON et al., 2002).

Nesse sentido, o aumento da expressão proteica de DERLIN-1, observado nos animais do grupo TF, sugere que o TFA ative a UPR, promovendo um aumento da capacidade do RE retro-translocar proteínas mal enoveladas para o citosol. Esse achado corrobora a atenuação do estresse do RE no coração de animais infartado pelo TFA e aponta o aumento da ERAD como o mecanismo responsável por essa resposta.

Essa hipótese é reforçada pelo estudo de BELMONT et al. (2010) que demonstraram em cultura de cardiomiócitos que a superexpressão da isoforma DERLIN-3 atenua o estresse do RE e a morte celular causados pela simulação da isquemia/reperfusão *in vitro*.

5.3.4. Expressão proteica de DERLIN-1 e níveis de oligômeros solúveis no coração de ratos infartados submetidos ao TFA

Para verificar o papel da DERLIN-1 na atenuação do estresse do RE pelo TFA, avaliamos os níveis dessa proteína no miocárdio de ratos submetidos a um protocolo de TFA, quatro semanas após a indução do IM.

A expressão proteica de DERLIN-1 estava aumentada nos animais do grupo INF-SED, quando comparados aos do grupo SHAM-SED (Figura 24). No entanto, o TFA reduziu os níveis proteicos de DERLIN-1 no miocárdio de ratos infartados (Figura 24).

O aumento da expressão proteica de DERLIN-1 após a indução do IM corrobora dados de outro trabalho presente na literatura e sugere o aumento da capacidade do RE retro-translocar proteínas como um mecanismo de resposta

ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE de corações infartados (BELMONT et al., 2010). Entretanto, ainda não está claro porque, apesar do aumento dos níveis proteicos de DERLIN-1, ratos com IM apresentam o quadro de estresse do RE. Muito provavelmente o aumento de DERLIN-1 é um mecanismo contrarregulador do estresse do RE e seu aumento ocorre em resposta ao estresse, sendo não o único, mas um dos mecanismos de defesa ao estresse do RE. Já a atenuação da expressão proteica de DERLIN-1 observada nos animais do grupo INF-TF poderia estar associada a redução do estresse do RE que já não demandaria uma resposta compensatória da DERLIN-1 após o TFA, normalizando a expressão dessa proteína. Portanto, a resposta de DERLIN-1 ao TFA em ratos com IM é mecanismo indireto e não direto pelo qual o TFA reduz o estresse do RE.

Figura 24. Expressão proteica de DERLIN-1 no coração dos ratos dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, n = 6), infartado sedentário (INF-SED, n = 5) e infartado treinado (INF-TF, n = 5). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SHAM-SED.

Em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa, verificamos que o acúmulo de oligômeros solúveis no miocárdio de ratos infartados foi acompanhado por níveis elevados de proteínas poliubiquinadas e por uma redução na atividade do proteassoma (CAMPOS et al., 2012). Além disso,

CAMPOS et al. (2012) constataram que o TFA restaurou a atividade do proteassoma, o que estava associado a uma redução dos níveis de oligômeros solúveis e de proteínas poliubiquitinadas.

Figura 25. Níveis de oligômeros solúveis no coração dos ratos dos grupos controle sedentário (SHAM-SED, $n = 6$), infartado sedentário (INF-SED, $n = 5$) e infartado treinado (INF-TF, $n = 5$). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * $P \leq 0,05$ vs. SHAM-SED, # $P \leq 0,05$ vs. INF-SED.

Portanto, esse achado sugere que a redução da atividade do proteassoma pelo IM, compromete a ERAD e contribui para o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE de corações infartados. Em contrapartida, o TFA por meio da restauração da atividade do proteassoma e, consequente, reestabelecimento da ERAD, é capaz de atenuar esse quadro de estresse do RE no miocárdio de animais com IM.

Todavia, não podemos descartar outras adaptações promovidas pelo TFA, como, a melhora da função mitocondrial e do balanço redox (CAMPOS et al., 2012; ROOF et al., 2015) que também podem contribuir para atenuação do acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE.

6. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os experimentos *in vitro* realizados no presente estudo demonstraram, pela primeira vez, que a disfunção contrátil de cardiomiócitos causada pelo estresse do RE é resultado da ativação da via de sinalização JNK/BNIP3. Entretanto, algumas questões ainda permanecem em aberto. Não sabemos como a JNK aumenta a expressão de BNIP3. Evidências na literatura sugerem que isso seja resultado da ativação do fator de transcrição, FoxO3a, que quando ativado se transloca para o núcleo, onde promove a transcrição de vários genes, dentre eles o de BNIP3. Tentamos analisar a translocação de FoxO3a para o núcleo nos cardiomiócitos incubados com a tunicamicina, mas não tivemos sucesso, devido a qualidade do *blotting*. Diante disso, pretendemos refazer esse experimento para verificar se de fato a JNK aumenta a translocação de FoxO3a para o núcleo.

Outra limitação é que não demonstramos ainda a forma pela qual o aumento dos níveis proteicos de BNIP3 em resposta ao estresse do RE causa a disfunção contrátil dos cardiomiócitos isolados. Nossos dados sugerem que essa resposta é consequência de uma redução do conteúdo de Ca^{+2} presente no RE e, de fato, Chaanine et al. (2013) reportaram que a superexpressão de BNIP3 diminui os níveis de Ca^{+2} no RE de cardiomiócitos. Para confirmar essa hipótese, avaliaremos o conteúdo de Ca^{+2} nos cardiomiócitos incubados com tunicamicina e siRNA para BNIP3, no intuito de verificar se o aumento da expressão de BNIP3 em resposta ao estresse do RE diminui os níveis de Ca^{+2} presentes no RE.

Outro dado inédito desse trabalho é a atenuação do estresse do RE pelo TFA no coração de ratos infartos. Apesar de termos apresentado evidências de que essa resposta é devido ao restabelecimento da ERAD no miocárdio de animais com IM, ainda não analisamos nessas amostras os níveis de proteínas ubiquitinadas e a atividade do proteassoma. No entanto, realizaremos tais análises nos próximos meses.

No que se refere a via de sinalização JNK/BNIP3, também pretendemos verificar se a translocação de FoxO3a para o núcleo está aumentada no coração dos animais do grupo INF-SED e se o TFA é capaz de atenuar essa resposta.

Outra limitação importante do presente estudo é o não estabelecimento de uma relação de causa e efeito na atenuação do estresse do RE e da via de sinalização JNK/BNIP3 pelo TFA, ou seja, não podemos precisar se a desativação da via de sinalização JNK/BNIP3 é resultado da atenuação do estresse do RE ou se a redução da expressão proteica de BNIP3 é a causa da diminuição do acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE.

Independente dessas limitações, nosso estudo fornece evidências importantes de que o estresse do RE, por meio da ativação da via de sinalização JNK/BNIP3, causa a disfunção contrátil de cardiomiócitos, e o TFA é capaz de atenuar ambos, o estresse do RE e a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 no miocárdio de ratos infartados, o que é acompanhado por uma melhora da função cardíaca.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que o estresse do RE, por meio da ativação da via de sinalização JNK/BNIP3, causa disfunção contrátil de cardiomiócitos. Esses dados são corroborados em modelo experimental de IM. Além disso, o TFA é capaz de atenuar ambos, o estresse do RE e a ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 no miocárdio de ratos infartados, o que é acompanhado por uma melhora da função cardíaca (Figura 26). Por fim, a atenuação do estresse do RE pelo TFA parece estar relacionada ao restabelecimento da ERAD no coração de ratos com IM.

Figura 26. Efeito do infarto do miocárdio (setas vermelhas) e do treinamento físico aeróbico (setas azuis) no estresse do RE, na via de sinalização JNK/BNIP3 e contratilidade cardíaca. A ativação da via de sinalização JNK/BNIP3 pelo estresse do RE causa a disfunção contrátil de cardiomiócitos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLERS, B. A. et al. **Effects of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase overexpression in postinfarction rat myocytes.** J Appl Physiol (1985) 98(6): 2169-2176. 2005
- AIT MOU, Y. et al. **Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure.** Cardiovasc Res 81(3): 555-564. 2009
- ALVES, C. R. et al. **Aerobic exercise training as therapy for cardiac and cancer cachexia.** Life Sci 125C: 9-14. 2015
- AZFER, A. et al. **Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease.** Am J Physiol Heart Circ Physiol 291(3): H1411-1420. 2006
- BELMONT, P. J. et al. **Roles for endoplasmic reticulum-associated degradation and the novel endoplasmic reticulum stress response gene Derlin-3 in the ischemic heart.** Circ Res 106(2): 307-316. 2010
- BERS, D. M. **Cardiac excitation-contraction coupling.** Nature 415(6868): 198-205. 2002
- BERS, D. M.;GRANDI, E. **Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels.** J Cardiovasc Pharmacol 54(3): 180-187. 2009
- BITO, V. et al. **Early exercise training after myocardial infarction prevents contractile but not electrical remodelling or hypertrophy.** Cardiovasc Res 86(1): 72-81. 2010
- BOVERIS, A.;NAVARRO, A. **Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents.** Free Radic Biol Med 44(2): 224-229. 2008
- BOZI, L. H. et al. **Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats.** Clinics (Sao Paulo) 68(4): 549-556. 2013
- BOZICEVIC, I.; RIEDNER, G.;HAGHDOOST, A. **HIV case reporting in the countries of North Africa and the Middle East.** J Int AIDS Soc 17: 18962. 2014
- BRAUN, T.;GAUTEL, M. **Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis.** Nat Rev Mol Cell Biol 12(6): 349-361.
- BRAUNWALD, E.;BRISTOW, M. R. **Congestive heart failure: fifty years of progress.** Circulation 102(20 Suppl 4): IV14-23. 2000
- BRUM, P. C. et al. **Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function.** Braz J Med Biol Res 44(9): 827-835. 2011
- BRUNET, A. et al. **Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.** Cell 96(6): 857-868. 1999

- BUENO, C. R., JR. et al. **Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure.** J Appl Physiol (1985) 109(3): 702-709. 2010
- CALFON, M. et al. **IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA.** Nature 415(6867): 92-96. 2002
- CAMPOS, J. C. et al. **Exercise training restores cardiac protein quality control in heart failure.** PLoS One 7(12): e52764. 2012
- CARNEIRO-JUNIOR, M. A. et al. **Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes.** J Appl Physiol (1985) 115(1): 107-115. 2013
- CECI, M.; ROSS, J., JR.; CONDORELLI, G. **Molecular determinants of the physiological adaptation to stress in the cardiomyocyte: a focus on AKT.** J Mol Cell Cardiol 37(5): 905-912. 2004
- CHAANINE, A. H. et al. **Potential role of BNIP3 in cardiac remodeling, myocardial stiffness, and endoplasmic reticulum: mitochondrial calcium homeostasis in diastolic and systolic heart failure.** Circ Heart Fail 6(3): 572-583. 2013
- CHAANINE, A. H. et al. **JNK modulates FOXO3a for the expression of the mitochondrial death and mitophagy marker BNIP3 in pathological hypertrophy and in heart failure.** Cell Death Dis 3: 265. 2012
- CITTADINI, A. et al. **Insulin-like growth factor-1 but not growth hormone augments mammalian myocardial contractility by sensitizing the myofilament to Ca²⁺ through a wortmannin-sensitive pathway: studies in rat and ferret isolated muscles.** Circ Res 83(1): 50-59. 1998
- CITTADINI, A. et al. **Adenoviral gene transfer of Akt enhances myocardial contractility and intracellular calcium handling.** Gene Ther 13(1): 8-19. 2006
- CLARK, A. L.; POOLE-WILSON, P. A.; COATS, A. J. **Exercise limitation in chronic heart failure: central role of the periphery.** J Am Coll Cardiol 28(5): 1092-1102. 1996
- COATS, A. J. **Clinical utility of exercise training in chronic systolic heart failure.** Nat Rev Cardiol 8(7): 380-392. 2011
- CONN, E. H.; WILLIAMS, R. S.; WALLACE, A. G. **Exercise responses before and after physical conditioning in patients with severely depressed left ventricular function.** Am J Cardiol 49(2): 296-300. 1982
- DAI, R. M.; LI, C. C. **Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation.** Nat Cell Biol 3(8): 740-744. 2001
- DAYAN, A. et al. **Swimming exercise training prior to acute myocardial infarction attenuates left ventricular remodeling and improves left ventricular function in rats.** Ann Clin Lab Sci 35(1): 73-78. 2005
- DEBOSCH, B. et al. **Akt1 is required for physiological cardiac growth.** Circulation 113(17): 2097-2104. 2006

- DHINGRA, R. et al. **Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(51): E5537-5544. 2014
- DIWAN, A. et al. **Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice.** *J Clin Invest* 117(10): 2825-2833. 2007
- DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.;FRANGOGIANNIS, N. G. **The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction.** *J Mol Cell Cardiol.* 2009
- DONG, G. et al. **mTOR contributes to ER stress and associated apoptosis in renal tubular cells.** *Am J Physiol Renal Physiol* 308(3): F267-274. 2015
- DONG, K. et al. **Endoplasmic reticulum stress induces up-regulation of hepatic beta-Klotho expression through ATF4 signaling pathway.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2015
- DUAN, C.; REN, H.;GAO, S. **Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation.** *Gen Comp Endocrinol* 167(3): 344-351. 2010
- ENGELBRECHT, A. M. et al. **p38 and JNK have distinct regulatory functions on the development of apoptosis during simulated ischaemia and reperfusion in neonatal cardiomyocytes.** *Basic Res Cardiol* 99(5): 338-350. 2004
- ERICKSON, J. R. et al. **CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states.** *Physiol Rev* 91(3): 889-915. 2011
- FERREIRA, J. C. et al. **Aerobic exercise training improves Ca²⁺ handling and redox status of skeletal muscle in mice.** *Exp Biol Med* (Maywood) 235(4): 497-505. 2010
- FERREIRA, J. C. et al. **Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(8): 760-765. 2007
- FRANCIS, G. S. **Pathophysiology of chronic heart failure.** *Am J Med* 110 Suppl 7A: 37S-46S. 2001
- FU, H. Y. et al. **Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition.** *Cardiovasc Res* 79(4): 600-610. 2008
- FUJIO, Y. et al. **Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart.** *Circulation* 101(6): 660-667. 2000
- GLEMBOTSKI, C. C. **Endoplasmic reticulum stress in the heart.** *Circ Res* 101(10): 975-984. 2007
- GLEMBOTSKI, C. C. **The role of the unfolded protein response in the heart.** *J Mol Cell Cardiol* 44(3): 453-459. 2008
- GO, A. S. et al. **Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association.** *Circulation* 129(3): e28-e292. 2014

- GOMES, K. M. et al. **Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling.** *Cardiovasc Res* 103(4): 498-508. 2014
- GOTOH, T. et al. **hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria.** *Cell Death Differ* 11(4): 390-402. 2004
- GREGORY, K. N.;KRANIAS, E. G. **Targeting sarcoplasmic reticulum calcium handling proteins as therapy for cardiac disease.** *Hellenic J Cardiol* 47(3): 132-143. 2006
- GROENENDYK, J. et al. **Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart.** *Circ Res* 107(10): 1185-1197. 2010
- GUERRIERO, C. J.;BRODSKY, J. L. **The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology.** *Physiol Rev* 92(2): 537-576. 2012
- GUSTAFSSON, A. B. **Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium.** *Pediatr Cardiol* 32(3): 267-274. 2011
- HAMID, T. et al. **Aortic balloon valvuloplasty: is there still a role in high-risk patients in the era of percutaneous aortic valve replacement?** *J Interv Cardiol* 23(4): 358-361. 2010
- HAMID, T. et al. **Cardiomyocyte NF-kappaB p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure.** *Cardiovasc Res* 89(1): 129-138. 2011
- HE, X. et al. **ASK1 associates with troponin T and induces troponin T phosphorylation and contractile dysfunction in cardiomyocytes.** *Am J Pathol* 163(1): 243-251. 2003
- HEINEKE, J.;MOLKENTIN, J. D. **Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(8): 589-600. 2006
- HOUSER, S. R.;MARGULIES, K. B. **Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure?** *Circ Res* 92(4): 350-358. 2003
- HUA, Y. et al. **Neuronostatin inhibits cardiac contractile function via a protein kinase A- and JNK-dependent mechanism in murine hearts.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(3): R682-689. 2009
- HUNT, S. A. et al. **ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society.** *Circulation* 112(12): e154-235. 2005
- IBARRA, C. et al. **Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes.** *J Biol Chem* 279(9): 7554-7565. 2004

- JANNIG, P. R. et al. **Autophagy signaling in skeletal muscle of infarcted rats.** PLoS One 9(1): e85820. 2014
- JUDGE, S. et al. **Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289(6): R1564-1572. 2005
- KAISTO, T.;METSIKKO, K. **Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers.** Exp Cell Res 289(1): 47-57. 2003
- KANG, S. et al. **Resistin promotes cardiac hypertrophy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) and c-Jun N-terminal kinase/insulin receptor substrate 1 (JNK/IRS1) pathways.** J Biol Chem 286(21): 18465-18473. 2011
- KATO, H. et al. **mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective activation of the IRE1-JNK pathway.** Cell Death Differ 19(2): 310-320. 2012
- KEMI, O. J. et al. **Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy.** J Cell Physiol 214(2): 316-321. 2008
- KIM, Y. K. et al. **Mechanism of enhanced cardiac function in mice with hypertrophy induced by overexpressed Akt.** J Biol Chem 278(48): 47622-47628. 2003
- KINUGAWA, S. et al. **Positive inotropic effect of insulin-like growth factor-1 on normal and failing cardiac myocytes.** Cardiovasc Res 43(1): 157-164. 1999
- KITAKAZE, M.;TSUKAMOTO, O. **What is the role of ER stress in the heart? Introduction and series overview.** Circ Res 107(1): 15-18. 2010
- KOZUTSUMI, Y. et al. **The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins.** Nature 332(6163): 462-464. 1988
- KRALJEVIC, J. et al. **Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart.** Cardiovasc Res 99(1): 55-64. 2013
- LI, B. et al. **Activation of NADPH oxidase mediates increased endoplasmic reticulum stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rabbits.** Biochim Biophys Acta 1852(5): 805-815. 2015
- LI, G. et al. **Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis.** J Cell Biol 186(6): 783-792. 2009
- LI, Q. et al. **Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy.** J Clin Invest 100(8): 1991-1999. 1997

- LIU, H. et al. **Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells.** J Biol Chem 272(35): 21751-21759. 1997
- LIU, X. H. et al. **Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress.** Shock 30(4): 422-427. 2008
- LIU, Y. et al. **Reduced endoplasmic reticulum stress might alter the course of heart failure via caspase-12 and JNK pathways.** Can J Cardiol 30(3): 368-375. 2014
- LLOYD-JONES, D. et al. **Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association.** Circulation 121(7): 948-954. 2010
- LUO, T. et al. **Attenuation of ER stress prevents post-infarction-induced cardiac rupture and remodeling by modulating both cardiac apoptosis and fibrosis.** Chem Biol Interact 225: 90-98. 2015
- MAMMUCARI, C. et al. **FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo.** Cell Metab 6(6): 458-471. 2007
- MARCINIAK, S. J. et al. **CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum.** Genes Dev 18(24): 3066-3077. 2004
- MARTINDALE, J. J. et al. **Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6.** Circ Res 98(9): 1186-1193. 2006
- MATSUI, T. et al. **Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro.** Circulation 100(23): 2373-2379. 1999
- MATSUI, T.;ROSENZWEIG, A. **Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt.** J Mol Cell Cardiol 38(1): 63-71. 2005
- MCMULLEN, J. R. et al. **The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway.** J Biol Chem 279(6): 4782-4793. 2004
- MEDEIROS, A. et al. **Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice.** J Appl Physiol (1985) 104(1): 103-109. 2008
- MEUSSER, B. et al. **ERAD: the long road to destruction.** Nat Cell Biol 7(8): 766-772. 2005
- MILL, J. G. et al. **Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats.** Cardiovasc Res 24(9): 748-753. 1990
- MOREIRA, J. B. et al. **High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats.** J Appl Physiol (1985) 114(8): 1029-1041. 2013

- MURLASITS, Z.; LEE, Y.; POWERS, S. K. **Short-term exercise does not increase ER stress protein expression in cardiac muscle.** *Med Sci Sports Exerc* 39(9): 1522-1528. 2007
- NADRUZ, W., JR. et al. **Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program.** *Cardiovasc Res* 68(1): 87-97. 2005
- NAKAGAWA, T. et al. **Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta.** *Nature* 403(6765): 98-103. 2000
- NEGRAO, C. E. et al. **Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness.** *Am J Physiol* 265(2 Pt 2): R365-370. 1993
- OKADA, K. et al. **Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis.** *Circulation* 110(6): 705-712. 2004
- OLIVEIRA, R. S. et al. **Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice.** *J Physiol* 587(Pt 15): 3899-3910. 2009
- OZCAN, U. et al. **Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes.** *Science* 306(5695): 457-461. 2004
- PARRIZAS, M.; SALTIEL, A. R.; LEROITH, D. **Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways.** *J Biol Chem* 272(1): 154-161. 1997
- PETROVSKI, G. et al. **Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy.** *Antioxid Redox Signal* 14(11): 2191-2200. 2011
- PIEPOLI, M. F. et al. **Exercise training in heart failure: from theory to practice. A consensus document of the Heart Failure Association and the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation.** *Eur J Heart Fail* 13(4): 347-357. 2011
- REGER, P. O. et al. **Myocardial hypoperfusion/reperfusion tolerance with exercise training in hypertension.** *J Appl Physiol* (1985) 100(2): 541-547. 2006
- ROE, N. D.; REN, J. **Oxidative Activation of Ca²⁺/Calmodulin-Activated Kinase II Mediates ER Stress-Induced Cardiac Dysfunction and Apoptosis.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013
- ROE, N. D.; REN, J. **Oxidative activation of Ca(2+)/calmodulin-activated kinase II mediates ER stress-induced cardiac dysfunction and apoptosis.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304(6): H828-839. 2013
- ROLIM, N. P. et al. **Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure.** *Physiol Genomics* 29(3): 246-252. 2007
- ROOF, S. R. et al. **Obligatory role of neuronal nitric oxide synthase in the heart's antioxidant adaptation with exercise.** *J Mol Cell Cardiol* 81C: 54-61. 2015

- ROTA, M. et al. **Nuclear targeting of Akt enhances ventricular function and myocyte contractility.** *Circ Res* 97(12): 1332-1341. 2005
- ROVEDA, F. et al. **The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: a randomized controlled trial.** *J Am Coll Cardiol* 42(5): 854-860. 2003
- RUTKOWSKI, D. T. et al. **The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum.** *Mol Biol Cell* 18(9): 3681-3691. 2007
- SALLINEN, P. et al. **Time course of changes in the expression of DHPR, RyR(2), and SERCA2 after myocardial infarction in the rat left ventricle.** *Mol Cell Biochem* 303(1-2): 97-103. 2007
- SANTOS, C. X. et al. **Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase.** *Antioxid Redox Signal* 11(10): 2409-2427. 2009
- SULLIVAN, M. J.; GREEN, H. J.; COBB, F. R. **Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity.** *Circulation* 84(4): 1597-1607. 1991
- TABAS, I.; RON, D. **Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress.** *Nat Cell Biol* 13(3): 184-190. 2011
- THUERAUF, D. J. et al. **Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability.** *J Biol Chem* 282(31): 22865-22878. 2007
- TIMMINS, J. M. et al. **Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways.** *J Clin Invest* 119(10): 2925-2941. 2009
- TOTH, A. et al. **Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases.** *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 7(3): 205-218. 2007
- URANO, F. et al. **Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1.** *Science* 287(5453): 664-666. 2000
- VITADELLO, M. et al. **Overexpression of the stress protein Grp94 reduces cardiomyocyte necrosis due to calcium overload and simulated ischemia.** *FASEB J* 17(8): 923-925. 2003
- VOLPE, P. et al. **The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection: distribution of endoplasmic reticulum markers in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle fibers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 6142-6146. 1992
- VON LEWINSKI, D. et al. **Insulin-like growth factor-1 exerts Ca²⁺-dependent positive inotropic effects in failing human myocardium.** *Circ Res* 92(2): 169-176. 2003
- WAGNER, C. et al. **Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis.** *Mol Cell Biochem.*

- WAGNER, C. et al. **Ischemic post-conditioning reduces infarct size of the in vivo rat heart: role of PI3-K, mTOR, GSK-3beta, and apoptosis.** Mol Cell Biochem 339(1-2): 135-147. 2010
- WANG, L. et al. **Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I.** Circ Res 83(5): 516-522. 1998
- WHO. **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control.** Mendes S, Puska P, Norrving B, editores. Geneva: World Health Organization. 2011
- WILKINS, B. J. et al. **Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy.** Circ Res 94(1): 110-118. 2004
- WISLOFF, U. et al. **Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction.** Cardiovasc Res 54(1): 162-174. 2002
- WITTE, K. K.; CLARK, A. L. **Why does chronic heart failure cause breathlessness and fatigue?** Prog Cardiovasc Dis 49(5): 366-384. 2007
- WU, J. et al. **The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1alpha/ATF6alpha complex.** Cell Metab 13(2): 160-169. 2011
- WU, X. et al. **ERK/PP1a/PLB/SERCA2a and JNK pathways are involved in luteolin-mediated protection of rat hearts and cardiomyocytes following ischemia/reperfusion.** PLoS One 8(12): e82957. 2013
- XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. C. **Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions.** J Clin Invest 115(10): 2656-2664. 2005
- XU, X. et al. **Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats.** J Mol Cell Cardiol 44(1): 114-122. 2008
- YE, Y. et al. **A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol.** Nature 429(6994): 841-847. 2004
- ZHANG, K. R. et al. **Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism.** Apoptosis 12(9): 1579-1588. 2007
- ZHANG, L. et al. **BNIP3 mediates cell death by different pathways following localization to endoplasmic reticulum and mitochondrion.** FASEB J 23(10): 3405-3414. 2009
- ZHANG, P. L. et al. **Preinduced molecular chaperones in the endoplasmic reticulum protect cardiomyocytes from lethal injury.** Ann Clin Lab Sci 34(4): 449-457. 2004
- ZHANG, Y. et al. **Activation of Akt rescues endoplasmic reticulum stress-impaired murine cardiac contractile function via glycogen synthase kinase-3beta-mediated suppression of mitochondrial permeation pore opening.** Antioxid Redox Signal 15(9): 2407-2424. 2011

ZHU, X. M. et al. [**Hypoxic preconditioning induces endoplasmic reticulum stress-related cardioprotection mediated by p38 mitogen-activated protein kinase**]. Sheng Li Xue Bao 58(5): 463-470. 2006

APÊNDICES

Publicações durante o período de doutorado

Artigos publicados:

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: Patricia 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 lipolysis (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

High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats

José B. N. Moreira,¹ Luiz R. G. Bechara,¹ Luiz H. M. Bozi,¹ Paulo R. Jannig,¹ Alex W. A. Monteiro,¹ Paulo M. Dourado,² Ulrik Wisløff,³ and Patricia C. Brum¹

¹School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ²Heart Institute, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; and ³K.G. Jebsen Center of Exercise in Medicine, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Trondheim, Norway

Submitted 19 June 2012; accepted in final form 15 February 2013

Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW, Dourado PM, Wisløff U, Brum PC. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol* 114: 1029–1041, 2013. First published February 21, 2013; doi:10.1152/jappphysiol.00760.2012.—Poor skeletal muscle performance was shown to strongly predict mortality and long-term prognosis in a variety of diseases, including heart failure (HF). Despite the known benefits of aerobic exercise training (AET) in improving the skeletal muscle phenotype in HF, the optimal exercise intensity to elicit maximal outcomes is still under debate. Therefore, the aim of the present study was to compare the effects of high-intensity AET with those of a moderate-intensity protocol on skeletal muscle of infarcted rats. Wistar rats underwent myocardial infarction (MI) or sham surgery. MI groups were submitted either to an untrained (MI-UNT); moderate-intensity (MI-CMT, 60% $\dot{V}O_{2\max}$); or matched volume, high-intensity AET (MI-HIT, intervals at 85% $\dot{V}O_{2\max}$) protocol. High-intensity AET (HIT) was superior to moderate-intensity AET (CMT) in improving aerobic capacity, assessed by treadmill running tests. Cardiac contractile function, measured by echocardiography, was equally improved by both AET protocols. CMT and HIT prevented the MI-induced decay of skeletal muscle citrate synthase and hexokinase maximal activities, and increased glycogen content, without significant differences between protocols. Similar improvements in skeletal muscle redox balance and deactivation of the ubiquitin-proteasome system were also observed after CMT and HIT. Such intracellular findings were accompanied by prevented skeletal muscle atrophy in both MI-CMT and MI-HIT groups, whereas no major differences were observed between protocols. Taken together, our data suggest that despite superior effects of HIT in improving functional capacity, skeletal muscle adaptations were remarkably similar among protocols, leading to the conclusion that skeletal myopathy in infarcted rats was equally prevented by either moderate-intensity or high-intensity AET.

atrophy; heart failure; proteasome; oxidative stress

SKELETAL MUSCLE ABNORMALITIES in systemic diseases have been described for decades (9, 14, 29, 52), including in heart failure (HF). Capillary rarefaction, switch from type I (oxidative) to type II (glycolytic) fibers, impaired metabolism, and skeletal muscle atrophy have been shown in human and experimental models of HF (14, 21, 29, 43, 49, 52). This maladaptation seems to impair skeletal muscle performance, which was proposed as the main determinant of exercise capacity in patients with HF (21, 32, 40). Additionally, skeletal muscle loss was shown to be an independent predictor of mortality in HF (3).

Recent efforts by researchers have identified possible intracellular mechanisms underlying the skeletal muscle abnormalities in cardiovascular diseases, and promising targets such as metabolic enzymes, calcium handling-related proteins, antioxidant scavengers, and inflammatory cytokines (9, 12, 39, 46). However, despite the identification of possible important players and advances in pharmacological treatment for HF over the last century, no available pharmacological therapy is able to prevent the onset of HF skeletal myopathy or to prevent or revert its consequences. Therefore, adjuvant therapies for treating skeletal muscle abnormalities in cardiovascular diseases must be emphasized and more deeply studied.

Following this rationale, it has been shown that aerobic exercise training (AET) not only improves cardiac function in patients with HF, but also promotes a broad range of beneficial skeletal muscle outcomes such as prevention of skeletal muscle atrophy, increase in type I muscle fiber percentage, and improvements in metabolic parameters (1, 4, 8, 18, 27), which altogether, improved functional capacity and led to better quality of life and longer survival. Such beneficial effects of AET on impaired skeletal muscle due to cardiovascular diseases have been reported for many years (1, 17, 27, 34), including important contributions from our group (4, 8, 9, 11); however, the optimal exercise intensity to elicit maximal outcomes is still a matter of debate among clinicians and researchers. Although moderate-intensity AET is undoubtedly a safe approach and known to improve ventricular function, skeletal muscle, and exercise capacity in patients with HF, recent studies suggest that high-intensity AET, achieved by interval training, promotes superior outcomes for cardiac patients (35, 60), including additional gains in cardiac function and aerobic capacity, which is the single best predictor of cardiovascular mortality (37). Nevertheless, a systematic comparison between the effects of moderate-intensity and high-intensity AET on skeletal muscle adaptations in cardiovascular diseases has never been reported in humans or animal models.

Therefore, in the present study, we compared the effects of high-intensity AET with those of a matched-volume, moderate-intensity protocol on skeletal muscle of rats submitted to myocardial infarction (MI), using morphological, metabolic, and intracellular parameters in skeletal muscles of distinct fiber type composition.

MATERIALS AND METHODS

Animal model and experimental design. Eight-week-old male Wistar rats (100 rats were initially purchased from Anilab LTDA, Paulínia, Brazil) were randomly assigned into MI or fictitious surgery (SHAM). Rats were deeply anesthetized with ketamine (50 mg/kg ip)

Address for reprint requests and other correspondence: P. C. Brum, Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, Av. Professor Mello Moraes, 65 - Butantã - São Paulo, 05508-900-Brazil (e-mail: pcbrum@usp.br).

Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats

Luiz Henrique Marchesi Bozi,^{I,II} Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado,^I Marcelo Perim Baldo,^{III} Márcia Ferreira da Silva,^V José Bianco Nascimento Moreira,^{II} Rômulo Dias Novaes,^I Regiane Maria Soares Ramos,^V José Geraldo Mill,^{III} Patricia Chakur Brum,^{II} Leonardo Bonato Felix,^{IV} Thales Nicolau Prímola Gomes,^V Antônio José Natali^V

^IFederal University of Viçosa, Department of General Biology, Viçosa/MG, Brazil. ^{II}Universidade de São Paulo, School of Physical Education and Sport, São Paulo/SP, Brazil. ^{III}Federal University of Espírito Santo, Department of Physiological Sciences, Vitória/ES, Brazil. ^{IV}Federal University of Viçosa, Department of Electrical Engineering, Viçosa/MG, Brazil. ^VFederal University of Viçosa, Department of Physical Education, Viçosa/MG, Brazil.

OBJECTIVES: The present study was performed to investigate 1) whether aerobic exercise training prior to myocardial infarction would prevent cardiac dysfunction and structural deterioration and 2) whether the potential cardiac benefits of aerobic exercise training would be associated with preserved morphological and contractile properties of cardiomyocytes in post-infarct remodeled myocardium.

METHODS: Male Wistar rats underwent an aerobic exercise training protocol for eight weeks. The rats were then assigned to sham surgery (SHAM), sedentary lifestyle and myocardial infarction or exercise training and myocardial infarction groups and were evaluated 15 days after the surgery. Left ventricular tissue was analyzed histologically, and the contractile function of isolated myocytes was measured. Student's t-test was used to analyze infarct size and ventricular wall thickness, and the other parameters were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test or a one-way analysis of variance followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

RESULTS: Myocardial infarctions in exercise-trained animals resulted in a smaller myocardial infarction extension, a thicker infarcted wall and less collagen accumulation as compared to myocardial infarctions in sedentary animals. Myocardial infarction-induced left ventricular dilation and cardiac dysfunction, as evaluated by $+dP/dt$ and $-dP/dt$, were both prevented by previous aerobic exercise training. Moreover, aerobic exercise training preserved cardiac myocyte shortening, improved the maximum shortening and relengthening velocities in infarcted hearts and enhanced responsiveness to calcium.

CONCLUSION: Previous aerobic exercise training attenuated the cardiac dysfunction and structural deterioration promoted by myocardial infarction, and such benefits were associated with preserved cardiomyocyte morphological and contractile properties.

KEYWORDS: Cardiac Function; Cardiac Myocyte; Cardiac Remodeling; Physical Activity; Myocardial Infarction; Cardioprotection.

Bozi LH, Maldonado IR, Baldo MP, Silva MF, Moreira JB, Novaes RD, et al. Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats. *Clinics*. 2013;68(4):549-556.

Received for publication on August 29, 2012; First review completed on October 15, 2012; Accepted for publication on December 5, 2012

E-mail: luizbozi@usp.br

Tel.: 55 11 7950-5509

INTRODUCTION

A sedentary lifestyle is known to be a major cardiovascular risk factor predisposing individuals to cardiac events

such as myocardial infarction (MI) (1), which is the most common etiology of heart failure (HF). In recent years, studies have provided strong evidence for the benefits of aerobic exercise training (AET) in cardiac rehabilitation, which highlights its use as an adjuvant therapy for a variety of cardiovascular diseases (2-4). Despite the well-known benefits of AET in terms of the clinical outcomes of cardiac patients, the potential protective effect of AET performed prior to cardiac insult remains incompletely understood and is poorly addressed in the literature.

A small number of studies have evaluated how increasing physical activity prior to MI affects hemodynamic parameters and cardiac function and structure. However,

Copyright © 2013 CLINICS – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

DOI: 10.6061/clinics/2013(04)18

Autophagy Signaling in Skeletal Muscle of Infarcted Rats

Paulo R. Jannig^{1,2}, Jose B. N. Moreira^{2,4}, Luiz R. G. Bechara², Luiz H. M. Bozi², Aline V. Bacurau², Alex W. A. Monteiro², Paulo M. Dourado³, Ulrik Wisløff⁴, Patricia C. Brum^{1,2*}

1 Experimental Physiopathology - Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, **2** School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, **3** Heart Institute - Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, **4** K. G. Jensen Center of Exercise in Medicine, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway

Abstract

Background: Heart failure (HF)-induced skeletal muscle atrophy is often associated to exercise intolerance and poor prognosis. Better understanding of the molecular mechanisms underlying HF-induced muscle atrophy may contribute to the development of pharmacological strategies to prevent or treat such condition. It has been shown that autophagy-lysosome system is an important mechanism for maintenance of muscle mass. However, its role in HF-induced myopathy has not been addressed yet. Therefore, the aim of the present study was to evaluate autophagy signaling in myocardial infarction (MI)-induced muscle atrophy in rats.

Methods/Principal Findings: Wistar rats underwent MI or Sham surgeries, and after 12 weeks were submitted to echocardiography, exercise tolerance and histology evaluations. Cathepsin L activity and expression of autophagy-related genes and proteins were assessed in soleus and plantaris muscles by fluorimetric assay, qRT-PCR and immunoblotting, respectively. MI rats displayed exercise intolerance, left ventricular dysfunction and dilation, thereby suggesting the presence of HF. The key findings of the present study were: a) upregulation of autophagy-related genes (*GABARAPL1*, *ATG7*, *BNIP3*, *CTSL* and *LAMP2*) was observed only in plantaris while muscle atrophy was observed in both soleus and plantaris muscles, and b) Cathepsin L activity, Bnip3 and Fis1 protein levels, and levels of lipid hydroperoxides were increased specifically in plantaris muscle of MI rats.

Conclusions: Altogether our results provide evidence for autophagy signaling regulation in HF-induced plantaris atrophy but not soleus atrophy. Therefore, autophagy-lysosome system is differentially regulated in atrophic muscles comprising different fiber-types and metabolic characteristics.

Citation: Jannig PR, Moreira JBN, Bechara LRG, Bozi LHM, Bacurau AV, et al. (2014) Autophagy Signaling in Skeletal Muscle of Infarcted Rats. PLoS ONE 9(1): e85820. doi:10.1371/journal.pone.0085820

Editor: Nicole Beard, University of Canberra, Australia

Received: May 28, 2013; **Accepted:** December 2, 2013; **Published:** January 10, 2014

Copyright: © 2014 Jannig 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: PRJ held a master degree scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (FAPESP #2010/14567-4). PCB holds grants from FAPESP (#2010/50048-1) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq #302201/2011-4). 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: pcbrum@usp.br

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are leading causes of death worldwide and pose significant burden to financial and public health systems [1]. Among CVD, coronary artery disease is the most prevalent and has myocardial infarction (MI) as main cause [2,3]. CVD commonly progress to heart failure (HF), which is a complex syndrome with poor prognosis characterized by severe cardiac dysfunction, dyspnea, exercise intolerance and fluid retention, severely affecting quality of life and lifespan [3].

Previous studies identified that exercise capacity correlates poorly with cardiac hemodynamic variables in HF patients, while a much stronger association is found with skeletal muscle parameters, such as peripheral blood flow, muscle metabolism and mass [4–8]. Moreover, Anker et al. [9] showed that muscle wasting is an independent predictor of mortality in HF patients, emphasizing the need for better understanding the mechanisms underlying skeletal myopathy in this syndrome.

Accordingly, it has been shown that skeletal muscle catabolism is favored over anabolism in patients with chronic diseases, which

occurs due to changes in inflammatory cytokines levels, redox homeostasis, nutrient availability, calcium handling, physical activity levels and growth factors [10–15]. These alterations contribute to boosted protein breakdown, mainly by two highly conserved proteolytic mechanisms, the ubiquitin-proteasome and the autophagy-lysosome systems [16]. The ubiquitin-proteasome system is responsible for selective removal of short-living cytosolic and nuclear proteins, including myofibrillar proteins [17,18], while the autophagy-lysosome system accounts for the engulfment of cytoplasmic cargos containing long-living proteins, glycogen, protein aggregates, as well as organelles (e.g. mitochondria). Such engulfment is carried by a double-membrane structure called autophagosome, which later has its outer membrane fused with a lysosome, delivering the cargo for degradation by lysosomal hydrolases [19,20].

The contribution of the ubiquitin-proteasome system for muscle atrophy in chronic diseases has already been demonstrated [21–23]. Our group has recently shown that skeletal muscle atrophy in HF patients and experimental models is associated with over-activation of the ubiquitin-proteasome system [22,24]. In contrast,

Article

Resistance Training Regulates Cardiac Function through Modulation of miRNA-214

Stéphano Freitas Soares Melo¹, **Valério Garrone Barauna**², **Miguel Araújo Carneiro Júnior**³,
Luiz Henrique Marchesi Bozi¹, **Lucas Rios Drummond**³, **Antônio José Natali**³
and **Edilamar Menezes de Oliveira**^{1,*}

- ¹ Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of the Exercise, School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05508-030, Brazil; E-Mails: stephanomelo@usp.br (S.F.S.M.); luizbozi@hotmail.com (L.H.M.B.)
- ² Laboratory of Molecular Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória 29043-900, Brazil; E-Mail: barauna2@gmail.com
- ³ Department of Physical Education, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil; E-Mails: miguelefiufv@yahoo.com.br (M.A.C.J.); lucasriosufv@yahoo.com.br (L.R.D.); anatali@ufv.br (A.J.N.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: edilamar@usp.br;
Tel.: +55-11-3091-2118; Fax: +55-11-3813-5921.

Academic Editor: Martin Pichler

Received: 6 October 2014 / Accepted: 13 November 2014 / Published: 26 March 2015

Abstract: Aims: To determine the effects of resistance training (RT) on the expression of microRNA (miRNA)-214 and its target in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a), and on the morphological and mechanical properties of isolated left ventricular myocytes. Main methods: Male Wistar rats were divided into two groups ($n = 7/\text{group}$): Control (CO) or trained (TR). The exercise-training protocol consisted of: 4×12 bouts, $5 \times/\text{week}$ during 8 weeks, with 80% of one repetition maximum. Key findings: RT increased the left ventricular myocyte width by 15% and volume by 12%, compared with control animals ($p < 0.05$). The time to half relaxation and time to peak were 8.4% and 4.4% lower, respectively, in cells from TR group as compared to CO group ($p < 0.05$). RT decreased miRNA-214 level by 18.5% while its target SERCA2a expression were 18.5% higher ($p < 0.05$). Significance: Our findings showed that RT increases single left ventricular myocyte dimensions and also leads to faster cell contraction and relaxation. These mechanical

Artigos em revisão:

nutrients

ISSN 2072-6643

Impact of leucine supplementation on exercise training induced anti-cardiac remodeling effect in heart failure mice

Wilson Max Almeida Monteiro de Moraes^{1,2}, Thaís Plasti Melara², Pamella Ramona Moraes de Souza³, Fabiana de Salvi Guimarães², Luiz Henrique Marchesi Bozi², Patricia Chakur Brum², Alessandra Medeiros¹

PLOS | ONE

PONE-D-14-46386R1

Lactate Up-regulates the Expression of Lactate Oxidation Complex -Related Genes in Left Ventricular Cardiac Tissue of Rats

Daniele Gabriel Costa; Telma Fatima Cunha; Luiz Roberto Grassmann Bechara; Rodrigo Soares Fortunato; Luiz Henrique Marchesi Bozi; Marcele de Almeida Coelho; Maria Luiza Barreto-Chaves; Patricia C Brum

Capítulos de livros:

- Co-autor do capítulo “**Adaptações Fisiológicas ao Treinamento Físico Aeróbio**”, publicado no livro Exercício Físico Nas Doenças Reumáticas: Efeitos Terapêuticos, 1^a ed., Sarvier, 2011, coordenado por Ana Lucia de Sá Pinto, Bruno Gualano, Fernanda Rodrigues Lima e Hamilton Roschel.
- Co-autor do capítulo “**The Cardiovascular Adrenergic System and Physical Exercise**” publicado no livro The Cardiovascular Adrenergic System 1^a ed., Springer 2015, coordenado por Anastasios Lymperopoulos.