

Paulo Roberto Jannig

**Atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico no músculo
esquelético de animais com insuficiência cardíaca**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Patricia Chakur Brum

SÃO PAULO

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Jannig, Paulo Roberto

Atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico no músculo esquelético de animais com insuficiência cardíaca / Paulo Roberto Jannig. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Patricia Chakur Brum.

Descritores: 1.Autofagia 2.Lisossomos 3.Atrofia 4.Músculos 5.Insuficiência cardíaca 6.Infarto do miocárdio 7.Tolerância ao exercício 8.Mitocôndrias musculares 8.Dinâmica mitocondrial 9.Degradação mitocondrial 10.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-338/13

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Tarciso e Ana, pelo exemplo de dedicação, perseverança, bondade e ética e pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. O que sou hoje é reflexo da educação e do amor que vocês me deram. Obrigado por terem me ensinado que grandes conquistas só são possíveis à custa de muito suor e renúncia.

AGRADECIMENTOS

À professora Patricia Brum, por ter aberto as portas do laboratório desde o primeiro contato, proporcionando a honra de fazer parte deste incrível grupo que é uma verdadeira família. Além de grande cientista, é uma fantástica educadora, sempre preocupada com nossa formação, seja pessoal ou profissional. Obrigado por acreditar em mim, por ensinar que sempre podemos mais e por fazer crescer ainda mais a minha paixão pela Ciência.

À minha irmã Juliana, meu cunhado David e todos outros familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha namorada Ivy, por ter sido fundamental na finalização desta etapa da minha vida e por me manter motivado e crente de que todo esse esforço vale a pena. Obrigado pelo amor, carinho, companheirismo, admiração e compreensão!

Aos meus amigos-irmãos Leo, Gustavo, Endrigo, Romero, Arian, William, Felipe, Marcelo, Ricardo e DDD, pela torcida e pelos momentos de descontração.

Aos companheiros de laboratório Alê, Bianco, Chris, Dani, Déa, Fabi, Julio, Kátia, Max, Nathalie, Telma, Tiago e Úrsula, por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável, divertido e produtivo.

À Aline, a melhor “irmã científica” do mundo, por todo o enorme auxílio e amizade desde que entrei no laboratório.

Aos habitantes da República “Filhos de Patricia”, Bechara (papai), Vanessinha (mamãe), Bozi, Carmo e Ju, que além de meus companheiros de laboratório, se tornaram meus companheiros para a vida.

Aos técnicos Alex, Ney, Marcele, Katt, Glória e Luciano, pelo valioso apoio em todas as etapas de realização deste trabalho.

Aos professores Paulo Ramires e Edilamar e todos seus alunos.

À Carla, pela amizade e pelo incentivo desde os tempos de graduação.

Ao Dr. Paulo Magno, pela realização dos exames ecocardiográficos.

Às muitas pessoas que tive o prazer de conviver desde que iniciei minha jornada em terras paulistas, e também àqueles que ficaram em Joinville e torceram por mim, mesmo de longe. Muitos passaram e alguns permaneceram na minha vida, mas todos de alguma forma moldaram o que sou e o que um dia serei.

Às secretárias do Programa de Fisiopatologia Experimental – FMUSP, Tânia, Liduvina e Vanda, por toda assistência e pela prontidão no esclarecimento de dúvidas.

À FAPESP (processo #2010/14567-4), pelo apoio financeiro.

É um fato importante, e conhecido por todos, que as coisas nem sempre são o que parecem ser. Por exemplo, no planeta Terra os homens sempre se consideraram mais inteligentes que os golfinhos, porque haviam criado tanta coisa - a roda, Nova York, as guerras, etc. -, enquanto os golfinhos só sabiam nadar e se divertir. Porém, os golfinhos, por sua vez, sempre se acharam muito mais inteligentes que os homens - exatamente pelos mesmos motivos.

(...)

Na verdade havia no planeta uma única espécie mais inteligente que os golfinhos, que passava boa parte do tempo nos laboratórios de pesquisa de comportamento, correndo atrás de rodas e realizando experiências incrivelmente elegantes e sutis com seres humanos. O fato de que mais uma vez os homens interpretaram seu relacionamento com essas criaturas de modo totalmente errado era exatamente o que estava nos planos elaborados por elas.

O Guia do Mochileiro das Galáxias
Douglas Adams, 1979

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Geral.....	4
2.2 Específicos.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Fisiopatologia da insuficiência cardíaca.....	5
3.2 Musculatura esquelética.....	7
3.3 Miopatia esquelética na insuficiência cardíaca.....	8
3.5 Sistema proteolítico lisossomal/autofágico.....	22
3.6 Papel do sistema lisossomal/autofágico na musculatura esquelética....	31
4 MÉTODOS.....	37
4.1 Modelo animal e desenho experimental.....	37
4.2 Avaliação ecocardiográfica.....	38
4.3 Tolerância ao exercício físico.....	39

4.4 Coleta dos tecidos	40
4.5 Morfometria cardíaca.....	40
4.6 Estrutura da musculatura esquelética	41
4.7 Avaliação da expressão gênica.....	42
4.8 Avaliação da expressão proteica.....	44
4.9 Atividade enzimática da Catepsina L	47
4.10 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo	47
4.10.1 Hidroperóxidos lipídicos totais.....	47
4.10.2 Quantificação de proteínas carboniladas	48
4.11 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Caracterização fenotípica.....	51
5.1.1 Função e morfologia do coração.....	51
5.1.2 Tolerância à realização de esforço físico	54
5.1.3 Morfologia do músculo esquelético	55
5.2 Atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico	60
5.2.1 Expressão de genes relacionados à autofagia nos músculos sóleo e plantar.....	60
5.2.2 Expressão de proteínas relacionadas à autofagia no músculo plantar.....	63
5.2.3 Atividade enzimática da Catepsina L no músculo plantar	71
5.2.4 Parâmetros de estresse oxidativo na musculatura esquelética	72
5.3 Correlações	73
5.4 Sumário dos resultados.....	75

6 DISCUSSÃO.....	79
6.1 Caracterização fenotípica do modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio	79
6.2 Atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico na musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca.....	82
6.3 Limitações e perspectivas.....	91
7 CONCLUSÃO	92
8 ANEXOS	93
9 REFERÊNCIAS	96
Apêndices	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Principais vias envolvidas na regulação da síntese e degradação proteicas. ↓ indica ativação; ⊥ indica inativação. Adaptação de Zhao et al. (2008). 16
- Figura 2** – Processo de autofagia em células de mamíferos. (A) Início da formação da membrana de isolamento, ou fagoforo; (B) Alongamento do fagoforo e captura de componentes citoplasmáticos; (C) Fechamento da dupla camada de membranas, formando o autofagossomo; (D) Fusão da membrana externa do autofagossomo com a membrana do lisossomo, liberando as hidrolases para dentro do autofagossomo; (E) A fusão do lisossomo com o autofagossomo forma a estrutura chamada autolisossomo, cuja membrana interna do autofagossomo e os componentes capturados são degradados pelas hidrolases lisossomais. Adaptado de Xie e Klionsky (2007). 25
- Figura 3** – Representação esquemática do sistema de conjugação de proteínas Atg à membrana de isolamento. As proteínas semelhantes à ubiquitina, Atg12 e LC3, são ativadas pela enzima E1-ativadora Atg7, que então são transferidas para as E2-conjugadoras, Atg10 e Atg3. A Atg10 promove a conjugação de Atg12 a Atg5, que irá interagir com Atg16 formando um oligômero que se associa a membranas. Já Atg3 promove a lipidação de LC3, conjugando-o a PE (fosfatidiletanolamina), sendo que esta reação é catalisada pelo complexo Atg12-Atg5-Atg16, que atua como uma enzima E3-ligase. Adaptado de Sandri (2010). 28
- Figura 4** – Ilustração da histoquímica para miosina ATPase do músculo plantar, realizada em cortes transversais de 10 μm de espessura, para a análise dos diferentes tipos de fibras musculares. A lâmina A foi incubada em pH básico (10,3), portanto as fibras escuras são as do tipo II e as claras do tipo I. O reverso ocorreu na lâmina B, que foi incubada em banho com pH ácido (4,3). 42
- Figura 5** – Distância percorrida em teste incremental máximo em esteira rolante dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média ±

erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a análise de variância para dois caminhos, $p \leq 0,05$	55
Figura 6 – Massa do sóleo total (A), corrigida pela massa corporal (B) e corrigida pelo comprimento da tíbia (C); Massa do plantar total (D), corrigida pela massa corporal (E) e corrigida pelo comprimento da tíbia (F) dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste <i>t</i> de <i>Student</i> para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.	57
Figura 7 – Área de secção transversa (AST) das fibras musculares do tipo I, tipo II e total e distribuição dos tipos de fibras nos músculos sóleo (A, B, C e D) e plantar (E, F, G e H), respectivamente, dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste <i>t</i> de <i>Student</i> para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.	59
Figura 8 – Expressão dos genes <i>BECN1</i> , <i>ATG7</i> , <i>GABARAPL1</i> , <i>MAP1LC3B</i> , <i>ATG12</i> , <i>BNIP3</i> , <i>LAMP2</i> e <i>CTSL1</i> nos músculos sóleo (A) e plantar (B) dos animais controle (Sham) e infartados (IM). No músculo sóleo foram utilizados 11 animais no grupo Sham e 10 animais no grupo IM. No músculo plantar foram utilizados 11 animais por grupo, exceto nas expressões de <i>ATG12</i> (Sham = 9 animais) e <i>BNIP3</i> (Sham = 10 animais) no músculo plantar. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste <i>t</i> de <i>Student</i> para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.	62
Figura 9 – Expressão proteica de LC3-I (A), LC3-II (B), razão LC3-II/LC3-I (C), Bnip3 (D), Beclin-1 (E), Atg7 (F), Atg12-Atg5 (G) e p62 (H) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste <i>t</i> de <i>Student</i> para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.	64

- Figura 10** – Expressão proteica de FoxO3a (A), FoxO3a fosforilada na treonina 32 (pFoxO3a; B) e razão pFoxO3a/FoxO3a (C) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham..... 66
- Figura 11** – Expressão proteica de Akt (A), Akt fosforilada na serina 473 (pAkt; B) e razão pAkt/Akt (C) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham..... 67
- Figura 12** – Expressão proteica de mTOR (A), mTOR fosforilada na serina 2448 (pmTOR; B) e razão pmTOR/mTOR (C) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham..... 68
- Figura 14** – Atividade enzimática da protease lisossomal Catepsina L no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham..... 71
- Figura 15** – Avaliação de hidroperóxidos lipídicos totais (A) e proteínas carboniladas/oxidadas (B) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham..... 72
- Figura 16** – Correlações entre a expressão gênica de *CTSL1* e área de secção transversa (AST) das fibras musculares do plantar (A), expressão gênica de *BNIP3* no plantar e distância percorrida em teste incremental máximo (B), expressão proteica de LC3-II no plantar e distância

percorrida em teste incremental máximo (C), e hidroperóxidos lipídicos e expressão proteica de Bnip3 no plantar (D). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$ 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados para avaliação da expressão gênica em qRT-PCR.....	44
Tabela 2 – Parâmetros ecocardiográficos avaliados em animais controle (Sham) e infartados (IM)	52
Tabela 3 – Massa corporal (MC), massa cardíaca, massa cardíaca corrigida pela massa corporal, massa cardíaca corrigida pelo comprimento da tíbia, área infartada, diâmetro de cardiomiócitos, massa dos pulmões e fígado e razão massa úmida : massa seca dos tecidos dos animais controle (Sham) e infartados (IM).	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sumário dos resultados da caracterização fenotípica.....	75
Quadro 2 – Sumário dos resultados de expressão gênica nos músculo sóleo e plantar.	76
Quadro 3 – Sumário dos demais resultados no músculo plantar.....	77
Quadro 4 – Sumário das principais correlações encontradas.....	78

LISTA DE ANEXOS

- Anexo A** – Correlação entre a expressão gênica de *CTSL1* e área de secção transversa (AST) das fibras musculares do sóleo. Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$ 93
- Anexo B** – Expressão gênica de *PGC-1 α* nos músculos sóleo e plantar de animais Sham e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado dentro das barras. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada análise de variância para dois caminhos. * representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os músculos. 94
- Anexo C** – Correlações entre a concentração hidroperóxidos lipídicos e expressão proteica de *Bnip3* no plantar de animais Sham (A) e infartados (IM) (B). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$ 94
- Anexo D** – Correlações entre a expressão proteica de *LC3-II* no plantar e distância percorrida em teste incremental máximo de animais Sham (A) e infartados (IM) (B). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$ 95
- Anexo E** – Correlações entre a expressão gênica de *BNIP3* no plantar e distância percorrida em teste incremental máximo de animais Sham (A) e infartados (IM) (B). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$ 95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

4EBP1	<i>Eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1</i>
AST	Área de secção transversa
ATG	Gene relacionado à autofagia
Atg	Proteína relacionada à autofagia
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>Atrogin-1/MAFbx</i>	<i>Atrophy gene 1</i> ou <i>Muscle Atrophy F-Box 1</i>
Bnip3	<i>Bcl-2/E1B-19K interacting protein 3</i>
DDFVE	Dimensão diastólica final do ventrículo esquerdo
DRP1	<i>Dynamin-related protein 1</i>
DSFVE	Dimensão sistólica final do ventrículo esquerdo
eIF2B	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2B</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de encurtamento
FoxO3a	<i>Forkhead box O 3a</i>
<i>GABARAPL1</i>	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein like-1</i>
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 β</i>
IC	Insuficiência cardíaca
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>

IM	Infarto do miocárdio
LC3	<i>Microtubule-associated protein light chain 3 b</i>
<i>MAP1LC3B</i>	vide LC3
MC	Massa corporal
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<i>MuRF1</i>	<i>Muscle RING Finger 1</i>
OPA1	<i>Optic atrophy protein 1</i>
p70S6K	<i>p70 ribosomal S6 kinase</i>
PE	Fosfatidiletanolamina
PI3K Classe I	Fosfatidil-inositol 3 quinase classe I
PPVED	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole
PPVES	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole
SIVD	Espessura do septo interventricular na diástole
SIVS	Espessura do septo interventricular na sístole
VO ₂	Consumo de oxigênio

Unidades

bpm	Batimento por minuto
g	Gramas

kg	Kilograma
m	Metro
mg	Miligrama
Mhz	Mega-hertz
min	Minuto
mM	Milimolar
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
U	Unidade
µg	Micrograma
µm	Micrometro
µM	Micromolar
µM	Microlitro

RESUMO

Jannig, Paulo R. *Atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico na musculatura esquelética de animais com insuficiência cardíaca* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A atrofia muscular induzida pela insuficiência cardíaca (IC) está associada à intolerância ao exercício físico e ao mau prognóstico. Compreender os mecanismos moleculares envolvidos nessa atrofia pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para prevenir ou tratar tal condição. Tem sido demonstrado que o sistema proteolítico lisossomal/autofágico é um importante mecanismo de manutenção da massa muscular. Entretanto, o papel desse sistema no desenvolvimento da miopatia esquelética induzida pela IC ainda não havia sido abordado. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atuação de componentes do sistema lisossomal/autofágico na musculatura esquelética de ratos submetidos ao infarto do miocárdio (IM). **MÉTODOS:** Cirurgias de IM e fictícia (Sham) foram realizadas em ratos Wistar, e doze semanas após os procedimentos cirúrgicos foram avaliados parâmetros ecocardiográficos, tolerância ao exercício físico e histologia dos tecidos cardíaco e muscular esquelético. Componentes do sistema proteolítico lisossomal/autofágico na musculatura esquelética foram avaliados por meio de expressão gênica (qRT-PCR) e proteica (*Western Blotting*) e atividade enzimática. **RESULTADOS:** Ratos IM apresentaram intolerância ao esforço físico, disfunção e dilatação ventricular esquerda e edema pulmonar, o que evidencia a presença de IC. Foi observado aumento da expressão gênica de *GABARAPL1*, *ATG7*, *BNIP3*, *CTSL1* e *LAMP2* no músculo glicolítico plantar, enquanto nenhuma alteração foi observada no músculo oxidativo sóleo, embora ambos os músculos tenham apresentado atrofia. Ainda, o IM promoveu no músculo plantar aumento da expressão proteica de *Bnip3* e *Fis1*, maior atividade enzimática da Catepsina L e maior acúmulo de hidroperóxidos lipídicos. **CONCLUSÕES:** Nossos resultados evidenciam demonstram aumento da transcrição de genes relacionados à autofagia na atrofia do músculo plantar induzida por IM, mas não na atrofia do músculo sóleo. Assim, genes autofágicos são regulados de forma diferenciada em músculos atroficos compostos por diferentes tipos de fibras e características metabólicas. Ainda, alterações em componentes do sistema lisossomal/autofágico no músculo plantar indicam aumento da autofagia de mitocôndrias (mitofagia), o que parece ter contribuído para a atrofia deste músculo e para a intolerância ao exercício físico induzida pela IC.

Descritores: Autofagia; Lisossomos; Atrofia; Músculos; Insuficiência cardíaca; Infarto do miocárdio; Tolerância ao exercício; Mitocôndrias musculares; Dinâmica mitocondrial; Degradação mitocondrial; Ratos Wistar

ABSTRACT

Jannig, Paulo R. Role of the lysosomal/autophagic proteolytic system in skeletal muscle of heart failure animals. [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUCTION: Heart failure (HF)-induced skeletal muscle atrophy is often associated to exercise intolerance and poor prognosis. Better understanding 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 present study was to evaluate the relative role of the main autophagy-related genes in myocardial infarction (MI)-induced muscle atrophy in rats. **METHODS:** Wistar rats underwent MI or sham surgeries, and after 12 weeks were submitted to echocardiography, exercise tolerance and histology evaluations. Lysosomal/autophagic proteolytic system components were depicted in skeletal muscle by gene (qRT-PCR) and protein (Western Blotting) expression analysis, and enzymatic activity. **RESULTS:** MI rats displayed exercise intolerance, left ventricle dysfunction and dilation suggesting the presence of HF. The key finding of the present study is that upregulation of autophagy-related genes (*GABARAPL1*, *ATG7*, *BNIP3*, *CTSL1* and *LAMP2*) was observed only in plantaris while muscle atrophy was depicted in both soleus and plantaris muscles. Furthermore, MI induced higher Bnip3 and Fis1 protein expression, and increased cathepsin L activity and lipid hydroperoxides levels in plantaris muscle. **CONCLUSIONS:** Altogether our results provide evidence for transcriptional overexpression of autophagy-related genes in MI-induced plantaris atrophy but not soleus atrophy. Therefore, autophagy-related genes are differentially regulated in atrophic muscles comprising different fiber-types and metabolic characteristics. Moreover, changes in lysosomal/autophagic system components in the plantaris muscle indicate increased mitochondrial autophagy (mitophagy), which seems to have contributed to HF-induced plantaris atrophy and exercise intolerance.

Descriptors: Autophagy; Lysosomes; Atrophy; Muscles; Heart failure; myocardial infarction; Exercise tolerance; Muscle mitochondria; Mitochondrial Dynamics; Mitochondrial degradation; Wistar Rats

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo e tem grande impacto nos sistemas de saúde pública e financeiro (World Health Organization, 2011). Dentre as doenças cardiovasculares, a doença arterial coronariana é a mais prevalente, tendo o infarto do miocárdio como principal causa (Go et al., 2013; Hunt et al., 2005). A progressão das doenças cardiovasculares leva ao quadro de insuficiência cardíaca (IC), uma síndrome complexa e de mau prognóstico, caracterizada por dispneia, intolerância ao exercício físico e retenção de fluido, afetando severamente a qualidade e expectativa de vida (Hunt et al., 2005).

Estudos anteriores identificaram que a capacidade de exercício físico apresenta fraca correlação com variáveis de função cardíaca em pacientes com IC, enquanto uma associação muito mais evidente é encontrada com parâmetros da musculatura esquelética, como fluxo sanguíneo periférico, trofismo e metabolismo muscular (Franciosa et al., 1981; Harrington et al., 1997; Jondeau et al., 1992; Middlekauff, 2010; Minotti et al., 1993). Além disso, Anker et al. (Anker et al., 1997) demonstraram que a atrofia muscular é um preditor independente de mortalidade em pacientes com IC, enfatizando a necessidade de melhor compreender os mecanismos envolvidos na miopatia esquelética desta síndrome.

A perda de massa muscular ocorre pela sobreposição do catabolismo sobre o anabolismo proteico, que em doenças crônicas é induzida por

mudanças nos níveis de citocinas inflamatórias, na homeostase redox, na disponibilidade de nutrientes, no balanço de cálcio, nos níveis de atividade física e de fatores de crescimento (Sandri, 2008). Tais alterações contribuem para o aumento da degradação proteica, a qual ocorre principalmente pela ação de dois sistemas conservados evolutivamente, o ubiquitina/proteassoma e o lisossomal/autofágico (Zhao et al., 2007). O sistema ubiquitina/proteassoma é responsável por remover seletivamente proteínas citosólicas e nucleares, incluindo proteínas miofibrilares (Cohen et al., 2009; Solomon e Goldberg, 1996). Já no sistema lisossomal/autofágico, ocorre o englobamento de componentes citoplasmáticos como glicogênio, agregados proteicos, proteínas oxidadas e/ou mal enoveladas, bem como organelas (e.g. mitocôndrias). Tal englobamento acontece por uma estrutura de dupla membrana lipídica, formando uma vesícula chamada de autofagossomo, que posteriormente funde sua membrana externa com um lisossomo, liberando seus constituintes para degradação pelas hidrolases lisossomais (Bechet et al., 2005; Mizushima e Komatsu, 2011).

O envolvimento do sistema ubiquitina/proteassoma na atrofia muscular induzida por doenças crônicas já foi demonstrado (Acharyya et al., 2004; Cunha et al., 2012; Lecker et al., 2004; Moreira et al., 2013). Nosso grupo recentemente observou que a atrofia muscular tanto de modelos experimentais como de humanos com IC, também está associada à maior ativação do sistema ubiquitina/proteassoma (Bechara, 2012; Cunha et al., 2012; Moreira et al., 2013). Por outro lado, o envolvimento do sistema

lisossomal/autofágico na miopatia esquelética induzida pela IC ainda não foi investigado, apesar do seu importante papel em outras condições atroficas.

Entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento da miopatia esquelética da IC tem grande relevância uma vez que terapias, incluindo transplante cardíaco, melhoram prioritariamente a função cardíaca sem demonstrar efeitos imediatos na capacidade de esforço físico (Maskin et al., 1983; Savin et al., 1980; Sinoway et al., 1988). Dessa maneira, a maior compreensão de tais mecanismos pode levar à elaboração de novas estratégias terapêuticas para a intolerância aos esforços físicos presente na IC. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é avaliar a atuação de componentes do sistema lisossomal/autofágico na musculatura esquelética de ratos submetidos ao infarto do miocárdio (IM).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a atuação de componentes do sistema proteolítico lisossomal/autofágico nos músculos sóleo e plantar de ratos infartados.

2.2 Específicos

Avaliar em ratos submetidos à cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda ou à cirurgia fictícia:

- A função e estrutura cardíaca;
- A tolerância à realização de esforços físicos;
- A área de secção transversa e distribuição dos tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar;
- A expressão gênica de *BECN1*, *ATG7*, *GABARAPL1*, *MAP1LC3B*, *ATG12*, *BNIP3*, *LAMP2* e *CTSL1* nos músculos sóleo e plantar;
- A expressão de proteínas do sistema lisossomal/autofágico (LC3, Atg12, Atg7, Beclin-1, Bnip3 e p62) no músculo plantar;
- A expressão proteica de FoxO3a e FoxO3a fosforilado na treonina 32, Akt, Akt fosforilada na serina 473, mTOR e mTOR fosforilada na serina 2448 no músculo plantar;
- A atividade enzimática da Catepsina L no músculo plantar;
- A hidroperoxidação lipídica total no músculo plantar;
- A expressão de proteínas oxidadas no músculo plantar.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fisiopatologia da insuficiência cardíaca

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, sendo que apenas no ano de 2008 foi responsável por aproximadamente 17,3 milhões de óbitos, representando 30% das mortes ocorridas naquele ano (World Health Organization, 2011). Sua incidência é crescente, especialmente em países em desenvolvimento, onde estima-se que aconteçam mais de 60% das ocorrências de doenças cardiovasculares (Lopez-Jaramillo, 2008; World Health Organization, 2011). Tal fato pode ser atribuído, em parte, ao aumento da longevidade e da urbanização, e às mudanças no estilo de vida (World Health Organization, 2011).

Dentre os tipos mais comuns de doenças cardiovasculares estão a doença arterial periférica, o acidente vascular cerebral, as valvopatias, a hipertensão arterial e a doença arterial coronariana (Go et al., 2013; Hunt et al., 2005). Esta última é definida como uma diminuição ou bloqueio do fluxo sanguíneo às artérias coronárias. A interrupção do fluxo sanguíneo para as coronárias, chamada de infarto do miocárdio (IM), reflete em morte de cardiomiócitos causada pela isquemia, a qual resulta de um desbalanço entre a oferta e demanda de oxigênio tecidual (Thygesen et al., 2007). Tais alterações causam uma disfunção cardíaca severa e podem culminar numa síndrome clínica complexa, de alta prevalência e mau prognóstico denominada de IC, a qual é via final comum de diversas outras doenças

cardiovasculares (Heart Failure Society Of America, 2006; Hunt et al., 2005; Zannad et al., 2008).

A fisiopatologia da IC é caracterizada por elevada pressão de enchimento ventricular e redução do débito cardíaco, o que resulta em inadequada distribuição de oxigênio aos tecidos em repouso ou durante esforços físicos (Heart Failure Society Of America, 2006; Pina et al., 2003). A IC está associada à fadiga, dispneia, intolerância aos esforços físicos, retenção de fluido, além da redução da qualidade e expectativa de vida (Colucci, 1998; Crimi et al., 2009; Lunde et al., 2001).

Em estágios iniciais da disfunção cardíaca, a ativação dos sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina-aldosterona promove uma série de adaptações centrais e periféricas com o intuito de reestabelecer o débito cardíaco (Brilla et al., 1993; Cohn et al., 1984; Cooksey et al., 1978; Esler e Kaye, 2000; Weber e Brilla, 1991). Contudo, em uma fase mais compensada da IC, a ativação sustentada dos mesmos sistemas se torna desvantajosa e está associada a efeitos deletérios em diversos tecidos, como o próprio coração, vasos e musculatura esquelética (Bacurau et al., 2009; Brilla et al., 1993; Cohn et al., 1984; Colucci, 1998; Gordon e Voipio-Pulkki, 1997; Middlekauff, 2010; Weber e Brilla, 1991).

No presente trabalho, a musculatura esquelética foi definida como objeto de estudo, uma vez que a IC causa um quadro de miopatia esquelética, a qual contribui para a progressão e agravamento da síndrome (Anker et al., 1997; Witte e Clark, 2007).

3.2 Musculatura esquelética

O tecido muscular esquelético é o mais abundante do corpo humano, constituindo ~40% da massa corporal. Os músculos tem como funções principais manter a integridade do sistema esquelético e gerar força e potência necessárias para a locomoção (Karagounis e Hawley, 2010). Além disso, a importância metabólica da musculatura esquelética é notável, sendo responsável por ~30% da taxa metabólica de repouso e ~80% da captação de glicose estimulada por insulina, exercendo assim papel fundamental no controle glicêmico e no armazenamento de glicogênio (Egan e Zierath, 2013).

A célula muscular, ou fibra muscular, é composta principalmente por miofilamentos de função contrátil, estrutural ou regulatória, formando estruturas cilíndricas chamadas de miofibrilas, as quais são subdivididas em unidades menores, os sarcômeros. O sarcômero é a unidade funcional básica das fibras musculares, responsável pela contração muscular. O retículo sarcoplasmático envolve as miofibrilas e regula a liberação e recaptção de íons de cálcio necessários para a contração muscular. Os músculos são tecidos ricos em mitocôndrias, organelas cuja função básica é a produção de energia via beta oxidação, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. As mitocôndrias encontram-se distribuídas entre as miofibrilas ou agrupadas em regiões subsarcolemais e perinucleares (Hood et al., 2006; Karagounis e Hawley, 2010).

Ainda, existem diferentes tipos de fibras musculares, as quais são classificadas por suas propriedades contráteis e metabólicas. Fibras do tipo I (vermelhas), são predominantemente oxidativas, mais capilarizadas, ricas em mitocôndrias e com característica de contração lenta. Já as fibras do tipo II (brancas), são predominantemente glicolíticas, menos capilarizadas, com retículo sarcoplasmático mais desenvolvido e com característica de contração rápida. As fibras do tipo II, podem ainda ser divididas em subtipos (e.g. IIa, IIx, IIb), variando em suas características metabólicas e de velocidade de contração (Karagounis e Hawley, 2010).

Os músculos esqueléticos exibem ainda uma grande capacidade de adaptação frente à estímulos fisiológicos ou patológicos, ocorrendo alterações no trofismo da fibra, conteúdo mitocondrial, na atividade de enzimas, na composição de tipos de fibras e na capilarização. Tais alterações refletem no metabolismo de lipídeos e carboidratos, na formação de ácido láctico, glicogenólise e utilização de fosfocreatina, e por fim na resistência à fadiga dos músculos. Dessa maneira, alterações na estrutura, função e metabolismo deste tecido estão diretamente relacionadas à saúde e à qualidade de vida (Karagounis e Hawley, 2010; Nader, 2005).

3.3 Miopatia esquelética na insuficiência cardíaca

Os sintomas mais proeminentes gerados pela IC são dispneia e fadiga precoces, o que acarreta diminuição da capacidade do indivíduo realizar esforços físicos (Drexler et al., 1992; Harrington et al., 1997; Krum e Abraham, 2009; Sullivan et al., 1989; Witte e Clark, 2007). Quando

comparados em uma mesma carga absoluta de trabalho, indivíduos com IC passam a utilizar o metabolismo glicolítico mais rapidamente que indivíduos saudáveis (Sullivan et al., 1989).

Em primeira instância, tais sintomas parecem ser facilmente explicados, uma vez que a disfunção cardíaca presente impede que o coração consiga gerar um débito suficiente para suprir a demanda metabólica dos tecidos. Em razão da disfunção ventricular esquerda, ocorre aumento do volume diastólico final e conseqüentemente da pressão de enchimento da câmara, que por fim pode resultar em congestão ou até mesmo edema pulmonar. Este quadro prejudica a difusão de gases nos alvéolos e a mecânica pulmonar, levando assim à dispneia (Witte e Clark, 2007).

Ainda, o débito cardíaco reduzido pode causar fadiga devido a uma baixa perfusão da musculatura esquelética (Clark et al., 1996; Heart Failure Society Of America, 2006; Pina et al., 2003). Contudo, mesmo que as variáveis hemodinâmicas sejam reestabelecidas rapidamente por meio do uso de vasodilatadores (Drexler et al., 1989; Fink et al., 1986; Massie et al., 1981), agentes inotrópicos (Maskin et al., 1983) ou até mesmo transplante cardíaco (Savin et al., 1980; Sinoway et al., 1988), não há mudança imediata na capacidade de realizar esforços físicos. Tal fato sugere que a intolerância aos esforços físicos em pacientes com IC se deva, pelo menos em parte, à alterações de mecanismos intrínsecos da musculatura esquelética, independente do baixo fluxo sanguíneo (Clark et al., 1996; Coats et al., 1994; Middlekauff, 2010; Witte e Clark, 2007). De fato, após a melhora dos

parâmetros hemodinâmicos, a recuperação dos danos ocorridos em tecidos como a musculatura esquelética é tardia, podendo levar meses ou mesmo não ocorrer (Clark et al., 1996; Middlekauff, 2010).

Diversos estudos já demonstraram que a capacidade de realizar esforços físicos está mais fortemente correlacionada a fatores periféricos do que ao grau de disfunção cardíaca (Duscha et al., 2008; Franciosa et al., 1981; Sinoway e Li, 2005; Troosters et al., 2004; Ventura-Clapier et al., 2002; Witte e Clark, 2007). Em indivíduos saudáveis, a capacidade de exercício é limitada fundamentalmente pelo débito cardíaco, uma vez que mesmo com o aumento da massa muscular em esforço adicionando um exercício de membros superiores a um exercício de membros inferiores máximo, não há aumento do consumo de oxigênio (VO_2), o que sugere que débito cardíaco e a distribuição de oxigênio já são máximos. Todavia, se a mesma estratégia for utilizada em pacientes com IC, um aumento adicional do VO_2 é observado (Jondeau et al., 1992). Dessa maneira, tais resultados sugerem que a eficiência do músculo em captar o oxigênio, e não a do coração em distribuir o mesmo, é o maior determinante da capacidade de exercício nesses pacientes.

Os efeitos deletérios causados na musculatura esquelética pela IC são progressivos, agravam os sintomas da síndrome, pioram o prognóstico do paciente e reduzem a qualidade de vida (Anker e Sharma, 2002; Witte e Clark, 2007). O conjunto de alterações nesse tecido caracteriza um quadro de miopatia esquelética, que tanto na IC como em outras doenças crônicas (doença pulmonar obstrutiva crônica e insuficiência renal crônica) parece ter

origem multifatorial. No caso da IC, o débito cardíaco reduzido e a baixa perfusão tecidual acarretam desarranjo de uma intrincada rede de sistemas.

Assim, a miopatia esquelética induzida pela IC parece originar-se da soma de alterações impostas por diversas condições que vão desde a hiperatividade simpática (Bacurau et al., 2009; Cohn et al., 1984; Cooksey et al., 1978), exacerbação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Schaufelberger et al., 1998; Tsutamoto et al., 2000; Yoshida et al., 2010), estresse oxidativo (Tsutsui et al., 2001; Tsutsui et al., 2011) e aumento de fatores inflamatórios (Dalla Libera et al., 2001; Gielen et al., 2003) até mudanças no padrão alimentar e na absorção de nutrientes (King et al., 1996; Sandek et al., 2007), e no nível de atividade física (Simonini et al., 1996; Vescovo et al., 1996).

O primeiro trabalho relatando anormalidades estruturais na musculatura esquelética de pacientes com IC foi publicado no final da década de 80 por Lipkin et al. (1988). Foi relatado que os pacientes estudados possuíam força muscular reduzida e atrofia de fibras musculares do tipo I e tipo II, apesar de não terem observado redução da densidade capilar e da atividade de enzimas oxidativas. A partir de então uma série de estudos foram conduzidos para caracterizar a miopatia esquelética da IC, e com isso identificar outras anormalidades que poderiam contribuir para a capacidade reduzida de realização de exercício físico nessa população.

Dentre as alterações mais observadas na miopatia esquelética induzida pela IC estão: a) a massa muscular reduzida (Harrington et al., 1997; Lipkin et al., 1988; Mancini et al., 1992; Minotti et al., 1993; Volterrani et al., 1994),

b) mudança do padrão de distribuição de fibras musculares para um perfil mais glicolítico (Tipo I → Tipo II) (Bacurau et al., 2009; Hambrecht et al., 1997; Lipkin et al., 1988; Mancini et al., 1989; Sullivan et al., 1991), c) menor densidade capilar (Duscha et al., 1999; Schaufelberger et al., 1997; Sullivan et al., 1989), d) menor densidade mitocondrial (Drexler et al., 1992; Mancini et al., 1989; Massie et al., 1996), e) diminuição do conteúdo de enzimas oxidativas (Mettauer et al., 2001; Sullivan et al., 1990; Sullivan et al., 1991), f) maior concentração de lactato sanguíneo (Massie et al., 1996; Schaufelberger et al., 1997; Sullivan et al., 1990) e g) maior atividade da enzima lactato desidrogenase (Schaufelberger et al., 1997). Essas modificações estruturais e bioquímicas refletem no metabolismo muscular durante o exercício físico, como a acelerada depleção de fosfocreatina e dos estoques de glicogênio (Drexler et al., 1992; Duscha et al., 1999; Mancini et al., 1989; Massie et al., 1987; Schaufelberger et al., 1997; Sullivan et al., 1990), o que resulta em sobreposição antecipada do metabolismo anaeróbio sobre o aeróbio contribuindo para acidificação precoce e excessiva da musculatura em esforço (Massie et al., 1987).

Mancini et al. (1992), no início da década de 90, e mais recentemente Fulster et al. (2013), demonstraram que a atrofia muscular está correlacionada com a redução na capacidade aeróbica e na força muscular contribuindo para alterações no metabolismo muscular em pacientes com IC. Diversos trabalhos demonstraram ainda que casos mais severos de atrofia muscular podem culminar em um estado chamado de caquexia (do grego: *Kakos*, má, ruim e *hexis*, condição do corpo), caracterizada pela

perda excessiva de massa corporal associada à perda de massa óssea, gorda e muscular (Evans et al., 2008). A caquexia induzida pela IC, denominada caquexia cardíaca, está presente em cerca de 20% dos pacientes (Anker e Sharma, 2002; Kung et al., 2011). Anker et al. (Anker et al., 1997) demonstraram que pacientes com caquexia cardíaca apresentam uma sobrevida de apenas 20% num período de 18 meses, enquanto pacientes IC com o mesmo VO_2 pico mas não caquéticos, apresentam 60% de sobrevida no mesmo período. Dessa forma, os autores determinaram que a caquexia é um marcador independente de mortalidade em portadores de IC grave. Nesse sentido, a atrofia muscular tem sido considerada um potencial alvo terapêutico para combater a intolerância ao esforço físico presente na IC.

Atualmente, o tratamento farmacológico amplamente utilizado na IC (β -bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina e antagonistas do receptor de angiotensina AT1) é capaz de exercer alguns efeitos positivos na miopatia esquelética, como menor transição de fibras tipo I para tipo II, melhora do fluxo sanguíneo e aumento da atividade de enzimas oxidativas e conteúdo mitocondrial. Contudo, mesmo com um tratamento farmacológico otimizado, a atrofia muscular continua presente nesses pacientes, acompanhada da intolerância ao esforço físico (Middlekauff, 2010).

Terapias não farmacológicas como a ressincronização cardíaca e, mais amplamente, o treinamento físico aeróbico, além de terem se demonstrado eficazes em melhorar aspectos da miopatia esquelética, também são

capazes aumentar a capacidade de exercício físico de indivíduos com IC (Abraham et al., 2002; Crimi et al., 2009). De fato, um dos efeitos notórios do treinamento físico aeróbico em pacientes com IC é a prevenção da atrofia muscular. Apesar disso, os mecanismos envolvidos na melhora da miopatia esquelética induzida por essas intervenções não são pouco conhecidos.

Nesse sentido, torna-se evidente que estratégias terapêuticas que melhorem aspectos da miopatia esquelética induzida pela IC, especialmente a atrofia muscular, podem refletir positivamente na capacidade de esforço físico, qualidade e expectativa de vida desses indivíduos. Contudo, o desenvolvimento de tais estratégias depende da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na manutenção de uma musculatura esquelética saudável e funcional.

3.4 Mecanismos moleculares na proteostase muscular

Em todas as células, proteínas são constantemente degradadas e substituídas. A velocidade desse processo depende principalmente da meia-vida da proteína, que pode variar de poucos minutos até alguns dias. Esse processo contínuo de síntese e degradação de proteínas é denominado *turnover* proteico. No músculo esquelético, o *turnover* proteico é finamente regulado por diversas vias intracelulares de síntese e degradação de proteínas, que quando alteradas podem promover atrofia ou hipertrofia das fibras (Thompson e Palmer, 1998).

De fato, em diferentes doenças crônicas como IC, insuficiência renal, doença pulmonar obstrutiva crônica, síndrome da imunodeficiência adquirida

(AIDS) e câncer, há um desequilíbrio entre estes dois processos, onde ocorre principalmente uma sobreposição exacerbada da proteólise muscular em relação à síntese (Glass, 2010; Hollriegel et al., 2012; Nader, 2005; Toth et al., 2011). O resultado desse desequilíbrio promove a atrofia muscular, definida como a diminuição da área de secção transversa das fibras causada pela perda excessiva de organelas celulares (e.g. mitocôndrias) e conteúdo proteico (Sandri, 2008).

Os processos de síntese e degradação de proteínas são coordenados por diversas vias de sinalização celular, que têm como objetivo manter um *turnover* de proteínas adequado. Na Figura 1, destacam-se as principais vias envolvidas na síntese e na degradação proteica no músculo esquelético.

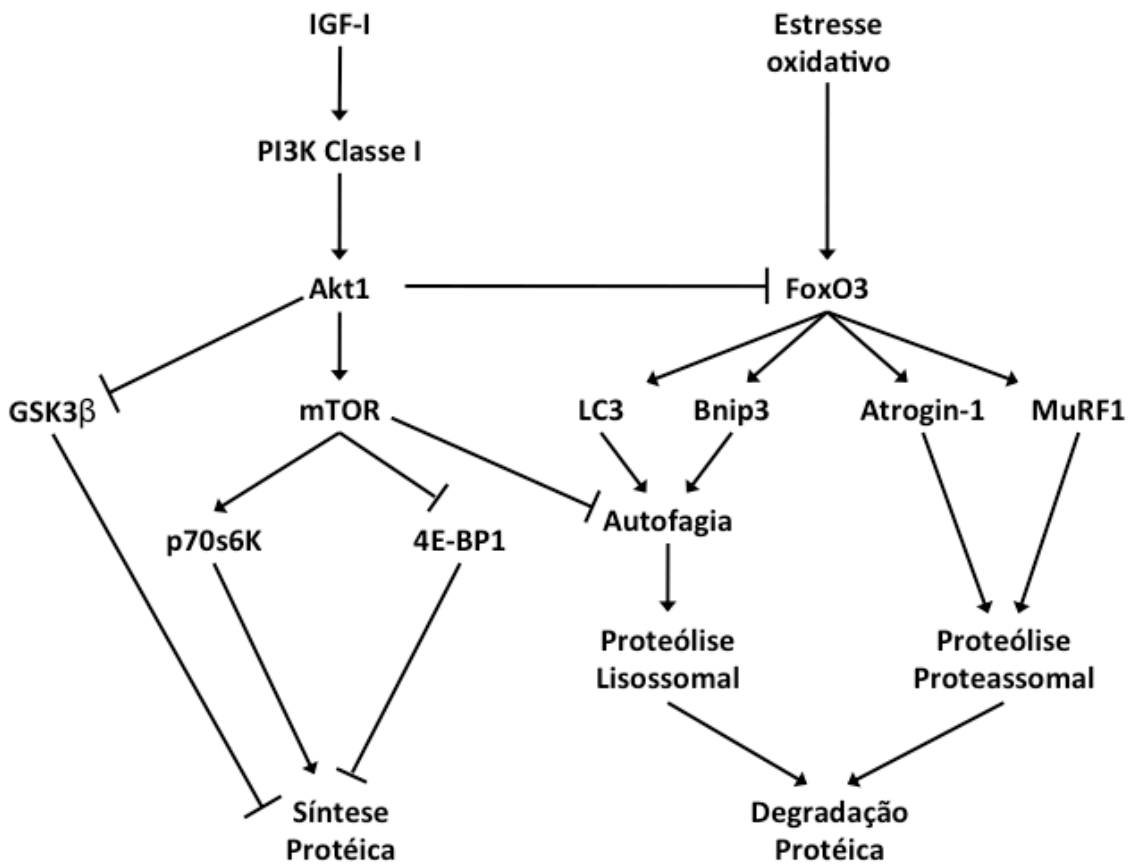


Figura 1 – Principais vias envolvidas na regulação da síntese e degradação proteicas. ↓ indica ativação; ⊥ indica inativação. Adaptação de Zhao et al. (2008).

A regulação coordenada da síntese e degradação de proteínas auxilia não só no controle do tamanho da célula, mas também na sua função, uma vez que mecanismos de controle de qualidade da célula degradam proteínas danificadas ou que não foram corretamente enoveladas, evitando a formação de agregados proteicos altamente citotóxicos (Balch et al., 2008). Além disso, em condições de estresse energético, sistemas proteolíticos podem degradar constituintes celulares para prover substratos energéticos alternativos para a célula (Sandri, 2008). Neste sentido, vias intracelulares

de síntese e degradação exercem um papel fundamental na homeostase de proteínas (proteostase) musculares (Arndt et al., 2010; Sandri, 2011). O termo proteostase refere-se à integração de sistemas biológicos com o objetivo de controlar a concentração, conformação, as interações (estrutura quaternária) e a localização de proteínas (Balch et al., 2008).

A ação das vias de síntese e de degradação, e conseqüentemente a regulação massa muscular, depende do estímulo mecânico (contração muscular), da disponibilidade de nutrientes, da homeostase redox, de fatores inflamatórios e fatores de crescimento (Sandri, 2008).

Um dos fatores de crescimento mais estudados é o IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), produzido tanto no fígado, sob controle do hormônio de crescimento (GH), como no músculo esquelético, onde atua de forma autócrina/parácrina. O IGF-1, principalmente o produzido na própria musculatura, é um potente regulador trófico da fibra muscular, acionando vias de síntese proteica e tendo um papel importante na regulação do balanço síntese/degradação, visto que regula também, de forma indireta, vias de degradação (Stitt et al., 2004).

O aumento da expressão de IGF-1 está relacionado à hipertrofia e já foi amplamente observado com o aumento da atividade muscular, como no exercício físico. O IGF-1 é o principal ativador da via PI3K/Akt, que medeia diversas outras vias de sinalização envolvidas no controle do metabolismo, da sobrevivência, da proliferação e do crescimento celular (Nader, 2005). Quando ativada (fosforilação na serina 473), a proteína Akt induz o aumento da massa muscular por diversos efetores que incluem a GSK3 β (*Glycogen*

synthase kinase 3 β), mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e FoxO3a (*forkhead box O 3a*).

Ao ser fosforilada na serina 9 pela Akt, a GSK3β é inativada, reduzindo assim a fosforilação do eIF2B (*eukaryotic translation initiation factor 2B*), um importante fator de iniciação da tradução do RNA mensageiro (RNAm), promovendo conseqüentemente a síntese proteica (Vyas et al., 2002).

A proteína quinase mTOR é outro alvo conhecido da Akt, que ao induzir sua fosforilação na serina 2448 estimula a síntese proteica por ativar fatores de iniciação da tradução do RNAm e de alongamento da cauda polipeptídica, via fosforilação das proteínas reguladoras 4EBP1 (*eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1*) e p70S6K (*p70 ribosomal S6 kinase*) (Wang e Proud, 2006). A ativação de mTOR também ocorre paralelamente à via da Akt por meio da presença intracelular de aminoácidos, sendo ainda que estudos recentes apontam que tais aminoácidos provém da degradação lisossomal (Jewell et al., 2013). Além disso, a mTOR também é reconhecidamente um inibidor do sistema lisossomal/autofágico, uma vez que esta inibe a proteína ULK1, envolvida na formação da membrana autofágica, processo que será melhor descrito no capítulo seguinte (Mizushima e Komatsu, 2011).

Ainda, a proteína Akt fosforila o fator de transcrição FoxO3a (treonina 32) (Brunet et al., 1999), impedindo sua translocação para o núcleo e a transcrição de diversos genes associados à degradação proteica no músculo esquelético, como *Atrogin-1/MAFbx* e *MuRF1*, E3-ligases do sistema ubiquitina/proteassoma, e *MAP1LC3B*, *GABARAPL1* e *BNIP3*, componentes

do sistema lisossomal/autofágico (Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004). Dessa maneira, a maior ativação de Akt impede o aumento da proteólise mediado por FoxO3a, favorecendo assim maior síntese em relação a degradação proteica. Nesse sentido, a relação entre Akt e FoxO3a e a ação da mTOR sobre a via lisossomal/autofágica são exemplos da interrelação das vias de síntese e degradação de proteínas.

O papel de diferentes vias de degradação proteica no desenvolvimento da atrofia muscular é um intenso campo de pesquisa. Atualmente, se sabe que os sistemas ubiquitina/proteassoma, dependente de calpaínas e lisossomal parecem regular processos distintos, cada qual degradando componentes específicos da célula e contribuindo de diferentes formas para o quadro de atrofia muscular (Bonaldo e Sandri, 2013)

O sistema ubiquitina/proteassoma dependente de ATP é o mais bem caracterizado em quadros de atrofia muscular, sendo responsável por mais de 80% da degradação de proteínas citosólicas e nucleares, incluindo proteínas miofibrilares (Cohen et al., 2009; Solomon e Goldberg, 1996). Ele consiste na marcação de proteínas a serem degradadas com uma ou mais moléculas de ubiquitina (ubiquitinação do substrato) e encaminhamento do substrato ubiquitinado para um complexo catalítico chamado proteassoma, onde será clivado em pequenos peptídeos. Para que a ubiquitinação da proteína a ser degradada aconteça, uma série de reações enzimáticas devem ocorrer, onde a ubiquitina será ativada, conjugada à outras moléculas de ubiquitina (formando uma cauda de poliubiquitinas), que então serão ligadas ao substrato alvo por meio de enzimas E3-ligases. Apenas no corpo

humano existem milhares de E3-ligases, sendo que cada uma é capaz de reconhecer diversos substratos específicos, demonstrando assim a elevada capacidade do sistema ubiquitina/proteassoma em controlar a concentração de proteínas dentro da uma célula (Ciechanover, 2005). No músculo esquelético, duas principais E3-ligases foram identificadas e relacionadas aos processos de atrofia e regeneração muscular, sendo chamadas de *MuRF1* (*Muscle RING Finger 1*) e *Atrogin-1/MAFbx* (*Atrophy gene 1* ou *Muscle Atrophy F-Box 1*). De fato, dois reconhecidos grupos de cientistas demonstraram que ambas tem sua expressão aumentada em situações catabólicas como insuficiência renal crônica, câncer e diabetes, imobilização e denervação (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001; Lecker et al., 2004). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a expressão de gênica de *Atrogin-1/MAFbx* também está aumentada na musculatura esquelética de animais com IC, refletindo em maior atividade do proteassoma, o que pode ter contribuído para atrofia muscular (Cunha et al., 2012; Moreira et al., 2013).

Quando os miofilamentos ainda estão arranjados em sua estrutura sarcomérica intacta, as E3-ligases ainda não são capazes de encaminhá-los para a degradação no proteassoma (Jackman e Kandarian, 2004). Assim, é necessária a ação de cisteína-proteases chamadas de calpaínas. Essas proteases, ativadas com o aumento exacerbado da concentração de cálcio citosólico, são responsáveis por liberar os miofilamentos da estrutura sarcomérica, e disponibilizá-los para degradação pelo o sistema ubiquitina/proteassoma (Huang e Forsberg, 1998).

Os lisossomos são organelas que constituem o maior compartimento de degradação em células eucarióticas. São caracterizados por serem vesículas de lúmen ácido (pH 4-5) contendo diferentes tipos de hidrolases, incluindo proteases, lipases, nucleases, glicosidades, fosfolipases, fosfatases e sulfatases, as quais dependem de um baixo pH para exercerem suas atividades. Bactérias, organelas, proteínas endógenas, exógenas e de membrana são encaminhadas para a degradação nos lisossomos por três principais vias: fagocitose, endocitose e autofagia (Bechet et al., 2005).

Até pouco tempo, apenas alguns estudos haviam se interessado na contribuição da proteólise lisossomal para desenvolvimento da miopatia esquelética, uma vez que este é responsável pela degradação de apenas uma pequena parte das proteínas musculares (Solomon e Goldberg, 1996). Contudo, evidências recentes demonstram que o funcionamento adequado desse sistema é essencial para a manutenção da proteostase e do metabolismo muscular (Sandri, 2011).

A importância da degradação lisossomal na musculatura esquelética tornou-se evidente pela descoberta de diversas desordens musculares caracterizadas por alterações em proteínas lisossomais, como nas doenças de Pompe e Danon, ou ainda pela inibição farmacológica da função lisossomal pela cloroquina (Sandri, 2008). Além disso, um importante estudo demonstrou que em diversos estados catabólicos ocorre um aumento da expressão gênica de *CTSL1*, o qual codifica uma importante protease lisossomal na musculatura esquelética, a Catepsina L (Deval et al., 2001; Lecker et al., 2004).

Um dos grandes desafios no estudo da função dos lisossomos foi elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na autofagia, processo pelo qual componentes citoplasmáticos como glicogênio, agregados proteicos, proteínas oxidadas e/ou mal enoveladas, bem como organelas (e.g. mitocôndrias), são encaminhados para dentro dos lisossomos (De Duve, 1963). Assim, os mecanismos envolvidos na autofagia serão abordados no capítulo seguinte.

3.5 Sistema proteolítico lisossomal/autofágico

O termo autofagia foi cunhado há 50 anos atrás pelo laureado com prêmio Nobel e descobridor dos lisossomos, Christian De Duve (De Duve, 1963). A autofagia (do grego: *autos*, próprio e *phagin*, comer) é um mecanismo catabólico conservado evolutivamente nas células eucarióticas, portanto, presente tanto em células de leveduras e plantas, como de animais. Como o nome sugere, a autofagia é uma forma de canibalismo celular, que envolve o transporte de componentes citoplasmáticos para o lisossomo, onde tais componentes serão degradados e transportados novamente ao citoplasma pelas permeases da membrana lisossomal. De volta ao citoplasma, os produtos da proteólise lisossomal poderão ser utilizados novamente na síntese de proteínas, na produção de energia por meio da gliconeogênese no fígado e em outros processos celulares (Choi et al., 2013; Mizushima e Komatsu, 2011).

Existem pelo menos três formas identificadas de autofagia: 1) a autofagia mediada por chaperonas, 2) a microautofagia, e 3) a

macroautofagia. Essas formas diferem quanto às funções fisiológicas e maneira de transportar o material a ser degradado para o lisossomo (Mizushima e Komatsu, 2011).

Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas são reconhecidas por chaperonas e encaminhadas diretamente para o interior dos lisossomos por meio de transportadores específicos presentes na membrana lisossomal. As proteínas degradadas por essa via possuem um peptídeo sinal (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln; KFERQ), o qual é exposto quando a proteína é danificada, permitindo assim o seu reconhecimento pelas chaperonas (Mizushima e Komatsu, 2011). Apesar de estudos já terem demonstrado o envolvimento da autofagia mediada por chaperonas em doenças neurodegenerativas, seu papel na degradação de proteínas musculares é pouco explorado (Sandri, 2011).

A microautofagia é o processo em que a membrana lisossomal engloba pequenas porções do citosol por meio de invaginação, formando assim vesículas que são rapidamente degradadas pelas hidrolases lisossomais (Mizushima e Komatsu, 2011). Este é o processo autofágico menos estudado, e até o momento não existem evidências de sua ocorrência nos músculos esqueléticos (Sandri, 2011).

O processo autofágico mais estudado é a macroautofagia (daqui em diante tratada apenas como autofagia). A autofagia é a principal via responsável pelo *turnover* de organelas e degradação de agregados proteicos. Consiste no englobamento de componentes citoplasmáticos por membranas lipídicas, formando uma vesícula, a qual é encaminhada para

degradação nos lisossomos, constituindo assim o sistema proteolítico intracelular lisossomal/autofágico. Esse processo é regulado por mais de 30 genes já identificados, os quais em sua maioria são preservados entre diferentes espécies, o que demonstra que este é um mecanismo conservado evolutivamente (Mizushima e Komatsu, 2011). Um estudo utilizando análises de proteômica e bioinformática encontrou 751 possíveis interações entre 409 proteínas ligadas à autofagia em células humanas (Behrends et al., 2010). Diversas das proteínas e interações identificadas possuem função ainda desconhecida, o que indica um campo de investigação promissor.

Os passos iniciais da autofagia incluem a iniciação, formação e a expansão de uma membrana de dupla camada de isolamento, chamada fagofóro (Figura 2-A). A origem dessa membrana ainda não é bem estabelecida, mas existem indícios de que ela possa advir da membrana do retículo sarcoplasmático, da membrana celular ou até mesmo da membrana mitocondrial (Cuervo, 2010). Após sinais de indução e expansão do fagofóro (Figura 2-B), ocorre o sequestro de componentes citoplasmáticos, que por fim são isolados em uma vesícula com duas membranas de camadas bilipídicas, denominada autofagossomo (Figura 2-C). A posterior fusão da membrana externa do autofagossomo com o lisossomo forma um autolisossomo (Figura 2-D), onde o material capturado, em conjunto com a membrana interna, são degradados pelas hidrolases presentes no lisossomo (Figura 2-E) (Mizushima e Komatsu, 2011).

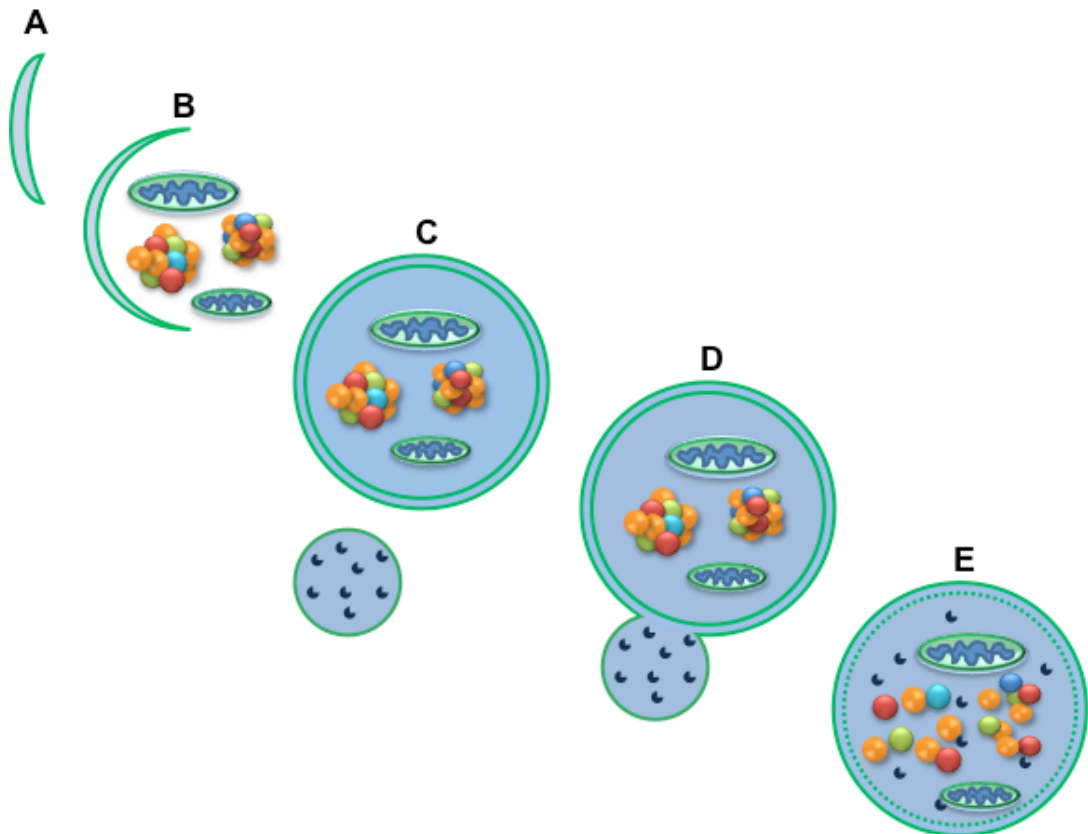


Figura 2 – Processo de autofagia em células de mamíferos. (A) Início da formação da membrana de isolamento, ou fagoforo; (B) Alongamento do fagoforo e captura de componentes citoplasmáticos; (C) Fechamento da dupla camada de membranas, formando o autofagossomo; (D) Fusão da membrana externa do autofagossomo com a membrana do lisossomo, liberando as hidrolases para dentro do autofagossomo; (E) A fusão do lisossomo com o autofagossomo forma a estrutura chamada autolisossomo, cuja membrana interna do autofagossomo e os componentes capturados são degradados pelas hidrolases lisossomais. Adaptado de Xie e Klionsky (2007).

Dessa maneira, o processo autofágico pode ser dividido em fases distintas, como: a) indução, b) alongamento, c) maturação, e d) fusão do autofagossomo com o lisossomo. Essas fases são reguladas por inúmeros genes e proteínas. Por convenção, os genes e as proteínas relacionados à autofagia são representados por *ATG* (letras maiúsculas) e *Atg* (letras minúsculas), respectivamente (Klionsky et al., 2003).

Na fase de indução é iniciada a formação do fagofóro em um processo mediado por proteínas como Atg1 (ULK1, em mamíferos) e Atg6 (Beclin-1, em mamíferos). A proteína quinase mTOR é reconhecida por inibir o processo autofágico por meio da fosforilação e inibição de ULK1, constituindo um processo que relaciona a síntese proteica com a degradação. As proteínas ULK1 e Beclin-1, promovem a ativação de proteínas necessárias para o alongamento do fagofóro. Para isso, um sistema de conjugação que transfere proteínas Atg para a membrana de isolamento, induzindo assim seu crescimento e maturação, formando por fim um autofagossomo (Figura 3) (Sandri, 2010; Suzuki e Ohsumi, 2010).

Neste sentido, a Atg7, ativa (E1-ativadora) as proteínas semelhantes à ubiquitina Atg12 e Atg8 num processo dependente de ATP (Tanida et al., 2001). As proteínas Map1LC3b (*microtubule-associated protein light chain 3 b*; ou simplesmente LC3, codificada pelo gene *MAP1LC3B*) e Gabarapl1 (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein like-1*; codificada pelo gene *GABARAPL1*), são os homólogos de Atg8 em mamíferos. Daqui por diante utilizaremos o termo LC3 como sinônimo de Atg8, por ser o homólogo mais estudado em mamíferos. Posteriormente à sua ativação por Atg7, a Atg12 se conjuga a Atg5 (ligação covalente) por meio da enzima E2-conjugadora Atg10. Por fim, o conjugado Atg12-Atg5 interage com Atg16, formando um oligômero que se liga à membrana que será utilizada na formação do autofagossomo (Hanada e Ohsumi, 2005).

Em paralelo, a LC3 após ser ativada por Atg7, se liga a um fosfolípide (fosfatidiletanolamina, PE), por meio de outra enzima E2-conjugadora, a

Atg3. Este processo também é catalisado pelo complexo Atg12-Atg5-Atg16, que age como uma enzima E3-ligase. Assim, LC3-PE (mais chamada de LC3-II) também se liga à membrana, promovendo em conjunto com a Atg12-Atg5, o alongamento e maturação do autofagossomo (Ichimura et al., 2000). Depois do autofagossomo ser formado, o complexo Atg12-Atg5-Atg16 é desfeito e separa-se da vesícula, enquanto LC3-II mantém a ligação, e acaba por fim sendo degradada pelas hidrolases lisossomais junto com o material capturado pelo autofagossomo (Mizushima e Komatsu, 2011; Sandri, 2010). Por fim, a fusão dos autofagossomos com lisossomos depende da presença da proteína de membrana lisossomal Lamp2 (codificada pelo gene *LAMP2*) (Saftig et al., 2008).

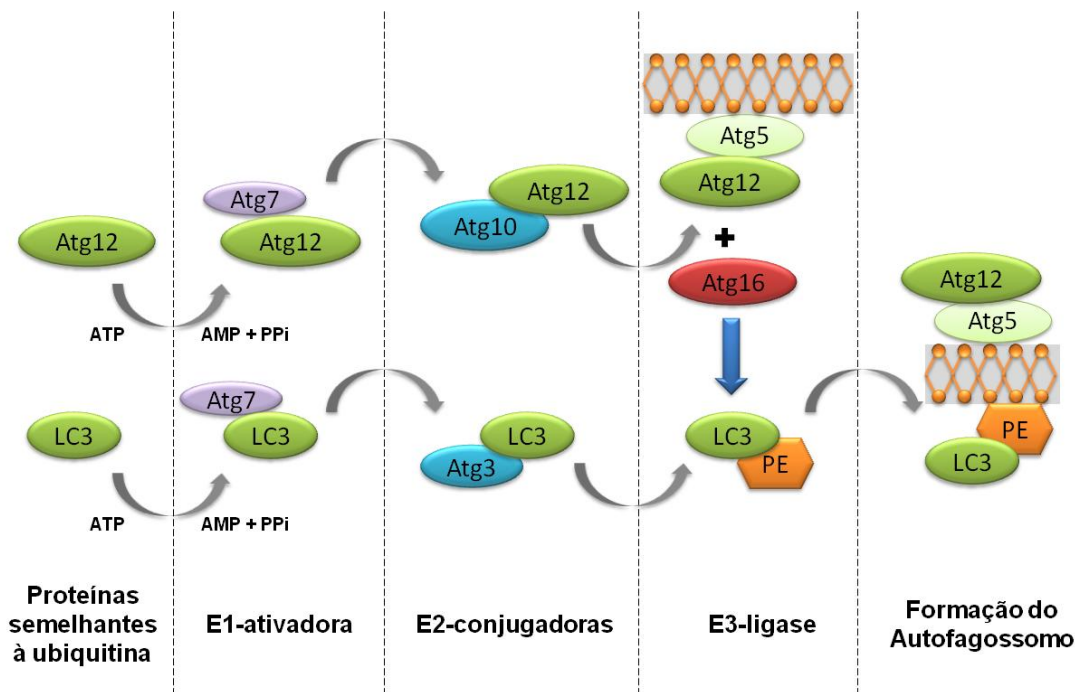


Figura 3 – Representação esquemática do sistema de conjugação de proteínas Atg à membrana de isolamento. As proteínas semelhantes à ubiquitina, Atg12 e LC3, são ativadas pela enzima E1-ativadora Atg7, que então são transferidas para as E2-conjugadoras, Atg10 e Atg3. A Atg10 promove a conjugação de Atg12 a Atg5, que irá interagir com Atg16 formando um oligômero que se associa a membranas. Já Atg3 promove a lipidação de LC3, conjugando-o a PE (fosfatidiletanolamina), sendo que esta reação é catalisada pelo complexo Atg12-Atg5-Atg16, que atua como uma enzima E3-ligase. Adaptado de Sandri (2010).

Até o momento, as únicas proteínas conhecidas que se mantêm ligadas ao autofagossomo mesmo após sua maturação são as formas lipidadas dos homólogos da Atg8 (LC3 e Gabarap1). Dessa maneira, avaliação da expressão de LC3-II, principalmente, tem sido muito utilizada como marcador do número de autofagossomos intracelulares (Klionsky et al., 2012).

A autofagia é uma resposta clássica ao jejum, como demonstrado por Kuma et al. (Kuma et al., 2004), observando que a inativação gênica de

ATG5 promovia a morte de camundongos neonatos. Os autores verificaram que a morte prematura ocorre por uma deficiência nutricional após a interrupção do fornecimento de nutrientes pela placenta. Dessa maneira, a autofagia atua na degradação componentes celulares, liberando seus aminoácidos para serem utilizados na produção de energia. Assim, o aumento da autofagia é uma resposta crítica para a sobrevivência no período de jejum neonatal.

Contudo, a autofagia também ocorre em níveis basais em todos os tecidos, onde cataboliza ~1,5% de todas as proteínas celulares por hora, mesmo em condições nutricionais adequadas. Assim, a autofagia auxilia na manutenção da reserva plasmática de aminoácidos e na gliconeogênese no fígado (Mizushima e Komatsu, 2011).

Além do seu papel no metabolismo energético, a autofagia está envolvida em diversos processos celulares como embriogênese, diferenciação celular, inflamação, resposta imunológica e envelhecimento. Tal fato se deve principalmente ao seu papel no controle de qualidade de componentes citoplasmáticos ao degradar agregados proteicos, proteínas mal enoveladas e organelas danificadas e/ou envelhecidas. Nesse sentido, a autofagia é fundamental para manutenção da homeostase de células pós-mitóticas como neurônios, hepatócitos e células musculares (Choi et al., 2013; Mizushima e Komatsu, 2011).

Apesar do controle de qualidade celular promovido pela autofagia ser parcialmente alcançado de forma não-seletiva, evidências crescentes indicam que proteínas e organelas são seletivamente degradadas via

autofagia. Essa autofagia seletiva ocorre constitutivamente e pode ser induzida em resposta à diversos tipos de estresse celular (Mizushima e Komatsu, 2011).

De fato, estudos recentes demonstraram a existência de sinais que encaminham especificamente algumas proteínas ou organelas para o englobamento pela vesícula autofágica. A proteína p62/SQSTM1 pode se ligar à substratos ubiquitinados, interagindo em seguida com LC3, encaminhando dessa maneira a proteína para dentro do autofagossomo em formação (Pankiv et al., 2007).

Além disso, um tipo seletivo de autofagia que tem ganhado grande destaque é a mitofagia (autofagia de mitocôndrias). Atualmente já foram identificadas algumas moléculas que migram para a membrana de mitocôndrias danificadas e/ou envelhecidas e as encaminham para mitofagia, também por meio da interação com LC3 (Youle e Narendra, 2011). Os mecanismos envolvidos na mitofagia serão descritos no próximo capítulo.

Embora ocorra sob condições fisiológicas, a autofagia e a degradação lisossomal possuem suas funções alteradas por situações de estresse celular como deficiência de nutrientes, sinalização próinflamatória, infecção bacteriana, hipóxia tecidual e estresse oxidativo, que por sua vez podem ser induzidas por diversas doenças crônico-degenerativas como neurodegeneração, doenças cardíacas, hepáticas e musculares, câncer, sepse e envelhecimento (Levine e Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008). Tais alterações no sistema lisossomal/autofágico têm o objetivo de promover

a sobrevivência celular por meio da liberação de substratos energéticos derivados da degradação dos componentes celulares e eliminação de organelas danificadas e agregados proteicos, os quais são altamente citotóxicos. Porém, um processo autofágico excessivo e descontrolado pode levar à depleção de componentes essenciais para o funcionamento da célula, levando assim à morte celular (Wang et al., 2010).

3.6 Papel do sistema lisossomal/autofágico na musculatura esquelética

A fibra muscular, como qualquer outra célula, necessita de mecanismos eficientes de remoção de agregados proteicos, proteínas oxidadas e/ou mal enoveladas e organelas danificadas e/ou envelhecidas, a fim de manter as funções celulares essenciais intactas. Como já descrito anteriormente, três importantes sistemas de degradação proteica que atuam para tal são os sistemas ubiquitina/proteassoma, dependente de calpaínas e lisossomal/autofágico, que no músculo esquelético possuem uma ação coordenada, a fim de manter uma composição normal de proteínas e organelas na célula (Korolchuk et al., 2010; Zhao et al., 2007).

Os mecanismos envolvidos na autofagia passaram a ser melhor estudados e compreendidos após o desenvolvimento de camundongos transgênicos que expressam LC3 ligada à proteína fluorescente verde (GFP) (Mizushima et al., 2004). Este modelo animal foi extremamente útil para determinar a taxa de formação de autofagossomos em diferentes tecidos, inclusive no músculo esquelético, e em diversas situações. A análise morfológica desses animais em situação de jejum demonstrou que a

musculatura esquelética apresenta níveis elevados de formação de autofagossomos em relação a outros tecidos, sendo ainda que os músculos mais afetados foram aqueles com uma predominância de fibras tipo II. Outra observação feita pelo mesmo estudo foi que os autofagossomos presentes nos músculos possuem um tamanho muito reduzido quando comparado aos de outros tecidos, o que explica a dificuldade que anteriormente se tinha de avaliar o processo autofágico em fibras musculares.

Em alguns tipos de miopatias esqueléticas, a deficiência de proteínas lisossomais leva ao acúmulo de autofagossomos, ou ao excesso de autofagia, e conseqüente perda de função muscular, como observado nas doenças de Pompe, Danon, miopatia ligada ao cromossomo X com excesso de autofagia (XMEA), ou ainda pela inibição farmacológica da função lisossomal pela cloroquina (Sandri, 2008). De fato, estudos demonstram que tanto um aumento exacerbado como a inibição do processo autofágico causam efeitos deletérios na musculatura esquelética (Mammucari et al., 2007; Masiero et al., 2009; Sandri, 2010).

Em modelo animal de inativação gênica de *ATG7* específica no músculo esquelético (Masiero et al., 2009), verificou-se acúmulo de mitocôndrias não funcionais, desestabilização do retículo sarcoplasmático e desorganização miofibrilar. Dessa maneira, os autores sugerem que a inibição da autofagia pode contribuir para a degeneração e fraqueza muscular, uma vez que ela é um importante mecanismo no controle de qualidade de proteínas celulares. Em contrapartida, outros estudos demonstram que a ativação da autofagia está relacionada à atrofia

muscular induzida por diversos estados catabólicos (O'Leary e Hood, 2009; Ogata et al., 2010; Tassa et al., 2003). De fato, Mammucari et al. (2007) demonstraram que a atrofia muscular induzida por super-expressão de FoxO3a era parcialmente prevenida quando a expressão de LC3 era reduzida por meio de transfecção muscular *in vivo* com RNA de interferência (RNAi), evidenciando a participação do processo autofágico no desenvolvimento da atrofia muscular.

No entanto, pouco se sabe sobre os substratos degradados especificamente pela autofagia, que ao serem removidos irão contribuir para a atrofia muscular. Nesse sentido, Rossi et al. (2009) identificaram que a enzima sialidase Neu2 é degradada via autofagia em cultura de miotubos C2C12 atroficos. Contudo, não são conhecidas as modificações pós-traducionais na proteína Neu2 que a encaminham para a degradação autofágica. Já um interessante estudo de Arndt et al. (2010), demonstrou que a filamina, proteína estrutural presente nos discos Z, é degradada especificamente pela autofagia, em um processo dependente de co-chaperonas, ubiquitinação e reconhecimento do substrato por p62. Ainda, o bloqueio da degradação de filamina via autofagia causou uma miopatia severa associada a desorganização miofibrilar por meio do rompimento dos discos Z. Este estudo foi o primeiro a demonstrar que proteínas musculares estruturais podem ser degradadas especificamente pelo sistema lisossomal/autofágico.

A relação entre prejuízos no metabolismo energético e a atrofia muscular já é bem conhecida (Sandri, 2008). Lecker et al. (2004) apontam

que 10% dos genes relacionados à atrofia (atrogenes) estão diretamente envolvidos na produção energética, onde vários desses genes que codificam importantes enzimas para a glicólise e fosforilação oxidativa são coordenadamente inibidos em músculos atroficos. Uma vez que as mitocôndrias são a principal fonte de produção energética nas células, não é de se admirar que estas sofram profundas alterações em casos de atrofia muscular. Realmente, Romanello et al. (2010) e Lokireddy et al. (2012) demonstraram que em processos atroficos ocorre fragmentação mitocondrial, diminuição da eficiência dessas organelas e aumento da autofagia. Romanello et al. (2010) demonstraram ainda que a simples super-expressão de Bnip3 (*Bcl-2/E1B-19K interacting protein 3*), proteína relacionada a mitofagia, era suficiente para causar danos mitocondriais e consequentemente atrofia muscular.

Assim, o remodelamento mitocondrial tem sido considerado parte do processo atrofico, onde o sistema lisossomal/autofágico tem papel importante ao remover seletivamente as mitocôndrias danificadas/disfuncionais por meio da mitofagia (Lokireddy et al., 2012; Romanello et al., 2010).

A mitofagia ocorre pela ação coordenada da quinase mitocondrial PINK1, da ubiquitina E3-ligase Parkin e da proteína Bnip3 (Youle e Narendra, 2011). A proteína Bnip3 desenvolve papel fundamental na mitofagia ao migrar para a membrana externa de mitocôndrias danificadas, alterando seu potencial de membrana. Por sua vez, PINK1 acumula na membrana externa de mitocôndrias despolarizadas e facilita a translocação

de Parkin para a organela, onde atuará conjugando ubiquitinas a diversas proteínas de membrana mitocondrial (Shiba-Fukushima et al., 2012). Assim, alguns substratos ubiquitinados são degradados pelo proteassoma, enquanto outros são reconhecidos por p62, a qual sinaliza para a autofagia da mitocôndria. Além disso, a própria Bnip3 possui um sítio de interação com LC3/Gabarapl1, facilitando assim o englobamento da mitocôndria pelo autofagossomo (Novak et al., 2010).

Além da mitofagia, os processos de dinâmica mitocondrial (fusão e fissão de mitocôndrias) também atuam no remodelamento mitocondrial (Youle e van der Bliek, 2012). A fusão mitocondrial é o processo pelo qual duas ou mais mitocôndrias unem suas membranas internas e externas, formando uma única mitocôndria. As proteínas mitofusina 1 (Mfn1), mitofusina 2 (Mfn2) e *optic atrophy protein 1* (OPA1) são essenciais para que a fusão mitocondrial ocorra. Já a fissão é o processo pelo qual uma mitocôndria se divide em duas, uma totalmente funcional e íntegra, e outra danificada e disfuncional. As duas principais proteínas envolvidas na fissão mitocondrial são a DRP1 (*dynamin-related protein 1*) e a Fis1. Assim, a fissão mitocondrial atua na segregação de regiões mitocondriais danificadas, sendo essencial para encaminhamento destas para a mitofagia. De fato, foi demonstrado que o bloqueio da fissão mitocondrial impede o processo mitofágico (Twig et al., 2008). Além disso, Lokireddy et al. (2012) evidenciaram que em estados atróficos ocorre a degradação de Mfn2 induzida pela E3-ligase Mul1, processo que facilita a fragmentação e despolarização das mitocôndrias, a mitofagia e a perda de massa muscular.

As mitocôndrias são a principal fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente quando estão danificadas, o que facilita a instalação de um quadro de estresse oxidativo exacerbado. McClung et al. (2010), ao induzirem estresse oxidativo em cultura de miotubos C2C12, verificaram uma diminuição do diâmetro dos miotubos correlacionada com um aumento na expressão de genes *ATG*, sendo ainda que ao inibirem a proteólise lisossomal tal diminuição não ocorria. Já O'Leary et al. (2013), estudando o músculo tibial anterior de ratos, sugerem que o estresse oxidativo induzido por desuso leva à translocação de LC3-II para membrana mitocondrial, sugerindo ocorrência de mitofagia. Dessa maneira, o estresse oxidativo pode ser um sinal para indução de mitofagia, e por sua vez irá auxiliar no desenvolvimento da miopatia esquelética presente em diversas doenças crônicas, como a IC.

Uma vez que a miopatia esquelética está relacionada à intolerância ao esforço físico induzida pela IC, e que o sistema proteolítico lisossomal/autofágico está envolvido no remodelamento metabólico e estrutural da musculatura esquelética, levantamos a hipótese de que desenvolvimento da miopatia esquelética da IC está associado à alterações no sistema lisossomal/autofágico.

4 MÉTODOS

4.1 Modelo animal e desenho experimental

Foram estudados ratos machos (Wistar) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com oito semanas de idade no início do experimento. Os animais foram mantidos no Biotério da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, onde permaneceram em gaiolas com quatro animais, e foram alimentados com dieta laboratorial padrão (Nuvilab®CRU, Nuvital Nutrientes, Brasil) e água *ad libitum*. A temperatura ambiente foi mantida entre 22-23°C e foi adotado ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos propostos para o presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (CEP #2008/40).

No presente estudo utilizamos um modelo experimental de IM induzido por ligadura da artéria coronária descendente anterior (Johns e Olson, 1954). Animais com oito semanas de idade (250-300 g) foram aleatoriamente divididos entre os grupos: infartados (IM) ou controle (Sham). Os animais do grupo IM foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e ketamina (50 mg/kg, i.p.), intubados e artificialmente ventilados (70 incursões/minuto; 2,5 mL/incursão). Na sequência foi realizada incisão torácica e ligadura da artéria coronária descendente esquerda. Ao final do procedimento, o tórax foi fechado e os gases

remanescentes em seu interior retirados para reestabelecimento do diferencial pressórico de gases (retirada do pneumotórax), permitindo a respiração natural dos animais. Os animais do grupo Sham foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos mas sem a ligadura da artéria coronária, mimetizando o estresse cirúrgico do grupo IM.

Doze semanas após os procedimentos cirúrgicos, foram iniciadas as avaliações *in vivo* da função cardíaca e tolerância à realização de esforços físicos. Após um intervalo de 72h-120h do teste de tolerância ao esforço os animais foram sacrificados e tiveram os tecidos dissecados conforme descrição detalhada a seguir (item 4.4).

4.2 Avaliação ecocardiográfica

A função contrátil do ventrículo esquerdo foi avaliada por ecocardiograma em modo M doze semanas após os procedimentos cirúrgicos. A avaliação ecocardiográfica foi realizada em colaboração com o Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP). Os ratos foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg, i.p.) e ketamina (50 mg/kg, i.p.), colocados em posição supina 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) equipado com transdutor linear de 14 Mhz e as medidas

ecocardiográficas seguiram recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Picard et al., 2011).

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

Cabe informar que a frequência cardíaca sob anestesia foi mantida em valores similares nos animais de ambos os grupos Sham e IM para que alterações na mesma não interferissem na contratilidade miocárdica per se (efeito escada ou Bowditch).

4.3 Tolerância ao exercício físico

A tolerância ao exercício físico foi avaliada doze semanas após os procedimentos cirúrgicos por meio de um teste incremental máximo em esteira rolante. O teste consistiu em corrida em esteira rolante, inclinada a vinte graus, iniciando na velocidade de 6 m/min, com incrementos de 3 m/min a cada três minutos até a exaustão do animal, conforme protocolo adaptado de Brooks e White (1978) e Ferreira et al. (2007). O tempo de teste foi registrado e a distância total percorrida calculada. Os animais foram

adaptados ao ambiente de teste durante uma semana antes das avaliações (10 min/dia em diferentes velocidades).

4.4 Coleta dos tecidos

Os animais foram mortos por decapitação e os músculos sóleo e plantar, bem como coração, pulmões e fígado foram cuidadosamente dissecados, pesados e congelados em nitrogênio líquido ou em freezer (-80°C), dependendo do experimento a que foram destinados. Pulmões e fígado foram submetidos à secagem em estufa (37°C) e pesados a cada 24 horas até que não houvesse mais alteração de massa, permitindo o cálculo da razão massa úmida:massa seca, como um índice de edema pulmonar e hepático.

4.5 Morfometria cardíaca

Após 48 horas de fixação em formalina tamponada (10%), o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico habitual e coloração por hematoxilina-eosina e tricroma de Masson. A análise morfométrica cardíaca foi realizada pela determinação do tamanho da área infartada e medida do diâmetro dos cardiomiócitos.

A medida do diâmetro transverso dos cardiomiócitos foi realizada em sistema computadorizado acoplado a um microscópio óptico com aumento de 400x (Leica Qwin, Alemanha). Os cardiomiócitos utilizados para medida estavam localizados na área remota (distante da área infartada), na parede livre do ventrículo esquerdo e orientados em corte longitudinal. O diâmetro

dos cardiomiócitos foi considerado a partir de uma média de 10 valores medidos para cada animal, para determinação do grau de hipertrofia dos miócitos.

A análise quantitativa do percentual de tecido contrátil necrosado, avaliada pela razão entre o volume da área marcada com o corante tricroma de Masson e o volume total do coração, demonstra o quão efetiva foi a cirurgia de indução de infarto do miocárdio.

4.6 Estrutura da musculatura esquelética

Para confirmar a atrofia muscular nos ratos infartados, além da massa total, avaliamos também a área de secção transversa dos diferentes tipos de fibras dos músculos sóleo e plantar. Os músculos, após serem submetidos a um processo de crioproteção em isopentano, foram cortados utilizando um criostato (Leica CM1850, Leica Microsystems, Alemanha) em secções transversais de 10 µm para processamento posterior. A avaliação da área de secção transversa e dos tipos de fibras musculares foi realizada por meio da reação para miosina ATPase (Brooke e Kaiser, 1970), utilizando soluções em pH diferentes (10,3 ou 4,6). As fibras do tipo I (lentas e oxidativas) reagem fortemente na solução ácida, podendo ser identificadas em imagens microscópicas adquiridas como as fibras mais escuras, enquanto as fibras do tipo II (rápidas e glicolíticas) podem ser identificadas como sendo as mais claras. O inverso ocorre na solução básica. A área de cada fibra muscular foi mensurada e a média calculada.

A proporção dos diferentes tipos de fibras foi calculada. A Figura 4 exemplifica o procedimento de identificação dos tipos de fibras musculares. As imagens representam o mesmo campo visual do músculo plantar de um de nossos animais, sendo a solução na qual as secções foram imersas, a única distinção entre elas. As imagens serão registradas em computador acoplado a um microscópio óptico e conectado a um sistema fotográfico (magnificação de 200x) (Leica Qwin, Alemanha).

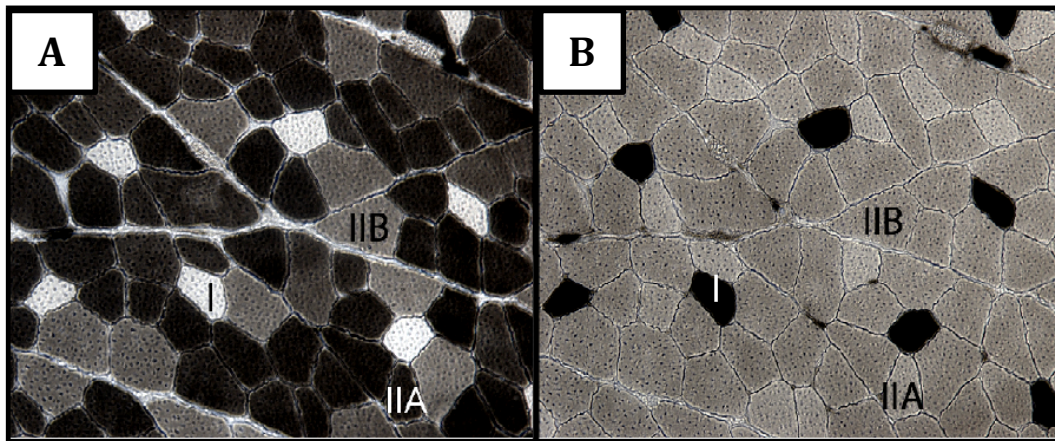


Figura 4 – Ilustração da histoquímica para miosina ATPase do músculo plantar, realizada em cortes transversais de 10 μm de espessura, para a análise dos diferentes tipos de fibras musculares. A lâmina A foi incubada em pH básico (10,3), portanto as fibras escuras são as do tipo II e as claras do tipo I. O reverso ocorreu na lâmina B, que foi incubada em banho com pH ácido (4,3).

4.7 Avaliação da expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada por meio da quantificação dos níveis de RNAm dos genes *BECN1*, *ATG7*, *MAP1LC3B*, *GABARAPL1*, *ATG12*, *BNIP3*, *LAMP2* e *CTSL1* nos músculos sóleo e plantar utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR). Para isso, foi realizado o isolamento do RNA total utilizando Trizol (Invitrogen, EUA). As concentrações de RNA foram determinadas por medida de absorvância de

260nm. A pureza do RNA foi determinada pelo cálculo da razão das absorvâncias de 260nm e 280nm (espectrofotometria por NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) e por gel de agarose 1% marcado com Nancy-520 (Sigma-Aldrich, Brasil). O RNA isolado foi armazenado a -80°C até sua utilização para a reação em cadeia da polimerase (PCR para a confecção de cDNA). A transcrição reversa (cDNA) foi realizada utilizando *Revertaid™ First Strand cDNA synthesis kit* (Fermentas, EUA), onde 2 µg de RNA total foram adicionados numa reação contendo oligo dT (0.5µg), *RiboLock™ RNase inhibitor* (20U), 1mM de dNTP mix, *RevertAid™ Reverse Transcriptase* (200U), totalizando uma solução final de 20 µL (Fermentas, USA), a qual foi incubada a 42°C por 1 hora mais 10 min a 70°C para término da transcrição reversa. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real utilizando *primers* específicos (Tabela 1) e *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas, EUA). A análise do PCR em tempo real foi realizada utilizando os seguintes parâmetros de ciclos: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15s cada ciclo e 60°C por 1min. A quantificação da fluorescência e análise da amplificação das bandas foi feita pelo Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, EUA). 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 cada amostra e para cada gene de interesse como o Ct do gene de interesse menos o Ct do gene normalizador, no caso, a *Ciclofilina A*. O cálculo das mudanças relativas no nível de expressão do gene de interesse (DDCt) foi realizado por

subtração da média do DCt do grupo Sham para o correspondente DCt de cada amostra do grupo IM, seguido de $2^{-(DDCt)}$. Para fins representativos, os valores do grupo Sham foram arbitrariamente definidos como 1. Nas correlações entre os resultados de expressão gênica e outras variáveis, utilizamos o valores de $2^{-(DCt)}$, para que assim fosse excluída a correção pelo grupo Sham.

Tabela 1 – Primers utilizados para avaliação da expressão gênica em qRT-PCR

Gene	Gene ID	Sequência Forward	Sequência Reverse
<i>MAP1LC3B</i>	64862	5'-ACCCCTCCCTGCATGCAGCTGTCC-3'	5'-ACCAGGGACATGACGACGTACACAACC-3'
<i>GABARAPL1</i>	689161	5'-CAAATGAAGAGCGCTCCTCCCGTTG-3'	5'-CAAAGTTCAGAACCTGATGCCGACA-3'
<i>ATG7</i>	74244	5'-GCTCCTCACTTTTTGCCAACA-3'	5'-GGAGCCACCACATCATTGC-3'
<i>ATG12</i>	361321	5'-CACCACTGCACCTGCCTCATTTTTAACTC-3'	5'-ATGGCACACATGGCTGAGGACTACTCTG-3'
<i>BECN1</i>	114558	5'-GGTAGCTTTTCTGGACTGTGTGCAGCAG-3'	5'-GTCCTCAATCTTGCTTTCTCCACGTCC-3'
<i>BNIP3</i>	84480	5'-CAGAGCGGCGAGGAGAACCTGCAG-3'	5'-GCTGCTCCCATTCCCATTGCTGAAG-3'
<i>CTSL1</i>	25697	5'-CACTACATCCGAAGGAGTTCATCTT-3'	5'-ATTCAAGTACCATGGTCTCACTCAGA-3'
<i>LAMP2</i>	24944	5'-TGGCTCAGCTTTCATTGTTTC-3'	5'-CATATAAGAACTTCCCAGAGGAGCAT-3'
<i>Ciclofilina A</i>	25518	5'-TGGCAAGCATGTGGTCTTTGGAAG-3'	5'-GGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGCCATTC-3'

4.8 Avaliação da expressão proteica

A expressão de proteínas integrantes do sistema lisossomal/autofágico, bem como proteínas relacionadas ao controle desse sistema, foi avaliada no músculo plantar por meio da técnica de *Western blotting*. Os músculos foram homogeneizados por meio de homogeneizador Polytron (PT-K Brinkman Instruments, EUA) em volumes (5x sua massa) de tampão de fosfato (K_2HPO_4 50mM, ajustado para pH 7,4 com solução KH_2PO_4 50mM) contendo um coquetel de inibidor de proteases e fosfatases (1:100; Sigma-Aldrich, Brasil). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm 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 (Bradford, 1976).

As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra (SDS 10%, TrisHCL 300mM pH 6.8, glicerol 50%, azul de bromofenol 0,05%, β -mercaptoetanol 20%) e separadas em gel SDS-poliacrilamida utilizando um tampão de corrida (Tris-Base 25mM, Glicina 192mM e SDS 0,1%).

As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência contendo Tris-Base (48 mM), glicina (39mM), metanol (20%) e SDS (0,0375%). Para verificar a eficiência de transferência utilizamos s-Ponceau (s-Ponceau 0,2%, ácido acético 5%). As membranas foram lavadas duas vezes com solução TBS-T (Tris-Base 50 mM, NaCl 0.9% e Tween 20 0,1%). Em seguida, o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS-T e BSA (5%) por 120 min em temperatura ambiente com agitação constante. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos diluídos em solução bloqueadora a 4°C por 12 horas com agitação constante. Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas três vezes em solução de TBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários específicos diluídos em solução bloqueadora por uma hora e meia em temperatura ambiente com agitação constante. Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante

(Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, EUA). As análises quantitativas dos blots foram realizadas por meio do programa ImageJ (Scion Corporation, EUA).

Como normalizador utilizamos a quantificação do rastro de proteínas por meio da coloração das membranas com s-Ponceau conforme Romero-Calvo et al. (2010).

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes:

- LC3, anti-coelho (gentilmente cedido por Dr. Ron Kopito da Universidade de Stanford, EUA), titulação 1:1000.
- Bnip3, anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- Beclin-1, anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- Atg7, anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:750.
- Atg12-Atg5, anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- p62, anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- FoxO3a, anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- pFoxO3a (Thr32), anti-coelho (Millipore, EUA), titulação 1:1000.
- Akt, anti-coelho (Abcam, EUA), titulação 1:200.
- pAkt (Ser 473), anti-coelho (Abcam, EUA), titulação 1:500.
- mTOR, anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- pmTOR (Ser2448), anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- Mfn1, anti- galinha (Thermo Scientific, EUA), titulação 1:1000.
- Mfn2, anti-camundongo (Novus Biologicals, EUA), titulação 1:1000.
- OPA1, anti-coelho (Abcam, EUA), titulação 1:1000.
- DRP1, anti-coelho (Thermo Scientific, EUA), titulação 1:1000.

- Fis1, anti-coelho (Thermo Scientific, EUA), titulação 1:1000.

Os anticorpos secundários utilizados foram os seguintes:

- Anti-coelho (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- Anti-camundongo (Cell Signaling, EUA), titulação 1:1000.
- Anti-galinha (Invitrogen, EUA), titulação 1:10000.

4.9 Atividade enzimática da Catepsina L

Após homogeneização dos músculos em tampão fosfato sem adição do coquetel de inibidores de protease, 200 ug de lisado total foram utilizados para avaliação da atividade da catepsina L por meio de um kit fluorimétrico (*Cathepsin L Activity Assay Kit*, Abcam, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O ensaio consiste na incubação (1-2 horas à 37°C) do lisado com um substrato preferencial para a catepsina L marcado com o fluoróforo AFC (amino-4-trifluorometil coumarina). A clivagem do substrato sintético libera AFC livre, o qual pode ser detectado utilizando um fluorímetro (λ_{exc} 400nm, λ_{em} 505nm). A especificidade do substrato foi testada pela adição de um inibidor da catepsina L (fornecido pelo fabricante).

4.10 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo

4.10.1 Hidroperóxidos lipídicos totais

O método descrito por Nourooz-Zadeh et. al. (1994) se baseia na oxidação do ferro da substância Xylenol Orange (FOX) por hidroperóxidos presentes no homogeneizado do músculo esquelético gerando uma coloração que altera a absorvância de luz a um comprimento de onda de

560nm, que pode ser lida em espectrofotômetro. A quantificação de hidroperóxidos lipídicos totais foi realizada no músculo plantar homogeneizado (1:20 w/v) em tampão fosfato-salina (100mM, pH 7,4) e imediatamente centrifugado a 12.000 g por 20 min à 4°C. As proteínas foram então precipitadas com ácido tricloroacético (10% w/v) e o sobrenadante foi misturado ao reagente FOX e incubado por 30min. A absorbância da amostra foi lida à 560nm. Os resultados foram normalizados para as concentrações de proteínas (Bradford, 1976).

4.10.2 Quantificação de proteínas carboniladas

A quantificação de proteínas carboniladas/oxidadas no músculo plantar foi realizada por meio de um kit específico (*OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit*, Millipore, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A detecção das proteínas carboniladas acontece por meio da reação do grupo carbonil das cadeias laterais das proteínas com *2,4-dinitrophenylhydrazine* (DNP), resultando em *2,4-dinitrophenylhydrazone*. Após essa etapa as proteínas foram carregadas em gel de eletroforese e identificadas por meio da técnica de *Western blotting*, conforme descrito na seção de avaliação da expressão proteica, e identificadas utilizando um anticorpo específico para *2,4-dinitrophenylhydrazone* fornecido pelo kit.

4.11 Análise Estatística

Utilizamos o teste de Shapiro-Wilks para verificação de distribuição normal dos dados. Portanto, os dados obtidos nesse estudo foram

apresentados como média \pm erro padrão da média. Para comparar as diferenças entre os dados dos grupos Sham e IM utilizamos o teste paramétrico *t* de *Student* para dados não pareados. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para determinar a linearidade entre as análises realizadas. Como nível de significância foi adotado um $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

A seguir serão detalhados os resultados obtidos no presente estudo. Com intuito de realizar uma caracterização fenotípica do modelo, avaliamos em animais submetidos às cirurgias de IM ou Sham, a função e morfologia do coração, alguns sinais clínicos de IC como edema pulmonar, edema hepático e tolerância à realização de esforço físico, bem como dados relativos à morfologia dos músculos sóleo e plantar. A atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico foi inicialmente abordada por meio de expressão gênica nos músculos sóleo e plantar. Em seguida, concentramos as análises no músculo plantar, verificando expressão de proteínas relacionadas à autofagia, atividade enzimática da protease lisossomal Catepsina L, além da avaliação de estresse oxidativo. Por fim, apresentaremos correlações encontradas entre as variáveis analisadas.

Cabe ressaltar que durante a cirurgia obtivemos 52% de mortalidade dos animais, e durante todo o protocolo o índice de mortalidade foi menor que 1%. É importante destacar que realizamos uma avaliação ecocardiográfica 30 dias após os procedimentos cirúrgicos, com o intuito de descartar os animais infartados com fração de encurtamento do ventrículo esquerdo superior a 35%. Dessa forma 27% dos animais infartados sobreviventes foram descartados.

5.1 Caracterização fenotípica

5.1.1 Função e morfologia do coração

Para avaliar os efeitos do IM na função e remodelamento do ventrículo esquerdo, realizamos exame ecocardiográfico (em colaboração com o Dr. Paulo Magno do Instituto do Coração – HCFMUSP). Dessa maneira, pudemos verificar a fração de encurtamento ventricular, um importante índice de função sistólica, além das dimensões do coração, utilizadas como parâmetros para indicar a ocorrência de remodelamento cardíaco patológico pós IM.

Na Tabela 2 estão apresentados os parâmetros ecocardiográficos avaliados em animais Sham e IM doze semanas após os procedimentos cirúrgicos. Conforme esperado, encontramos diminuição significativa da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, demonstrando que os animais do grupo IM possuem redução da função contrátil cardíaca. Encontramos um aumento no diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE) no grupo IM, característica de um ventrículo que apresenta disfunção contrátil. Verificamos tendência de diminuição ($p=0,08$) da espessura do septo interventricular ao final da diástole (SIVD), o que caracteriza um princípio de dilatação da câmara ventricular esquerda. Tais dados corroboram os da literatura demonstrando que os animais do grupo IM apresentam disfunção cardíaca e remodelamento ventricular patológico (Fishbein et al., 1978). Cabe ressaltar que a frequência cardíaca sob anestesia (FC) não diferiu entre os grupos, demonstrando a confiabilidade

dos resultados obtidos, uma vez que diferenças na FC basal resultam em mudanças na contratilidade miocárdica (Quinones et al., 1976).

Tabela 2 – Parâmetros ecocardiográficos avaliados em animais controle (Sham) e infartados (IM)

	Sham	IM	p
FE, %	39.7±1.7 (9)	24.4±2.4 (13)	0.00
DSFVE, mm	4.86±0.28 (9)	6.56±0.41 (13)	0.00
DDFVE, mm	8.04±0.33 (9)	8.61±0.32 (13)	0.12
SIVS, mm	1.78±0.10 (9)	1.69±0.09 (13)	0.27
SIVD, mm	1.12±0.07 (9)	1.02±0.32 (13)	0.08
PPVES, mm	2.39±0.07 (9)	2.56±0.11 (13)	0.13
PPVED, mm	1.33±0.09 (9)	1.38±0.06 (13)	0.32
FC, bpm	250±11 (9)	258±10 (13)	0.31

Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FE); 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 em anestesia (FC). Dados apresentados como média ± erro padrão da média. O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$.

Aproximadamente doze semanas após os procedimentos cirúrgicos, os animais tiveram a massa corporal aferida, foram sacrificados segundo diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e tiveram os tecidos coletados. Conforme podemos observar na Tabela 3, não encontramos diferenças significativas nas massas corporal e cardíaca dos animais IM. Contudo, ao corrigir a massa cardíaca pela massa corporal ou pelo comprimento da tíbia observamos aumentos significativos

de ambas no grupo IM quando comparada ao grupo Sham. O aumento da massa cardíaca corrigida foi acompanhada de tendência a aumento do diâmetro transversal dos cardiomiócitos ($p=0,06$) presentes na área remota do ventrículo esquerdo. A avaliação de cortes histológicos cardíacos corados com tricromo de Masson permitiu verificar que os animais IM apresentaram aproximadamente 28% de área infartada, demonstrando a eficácia do procedimento cirúrgico e uma alteração significativa da estrutura do miocárdio. Ainda, conforme Tabela 3, se observa que a massa úmida dos pulmões e do fígado não diferiram entre os grupos. Contudo, houve um aumento significativo na razão massa úmida:massa seca dos pulmões no grupo IM, sugerindo a instalação de edema pulmonar, característica considerada um dos sinais clínicos de IC (Lucas et al., 2000). Apesar da presença de edema pulmonar, não observamos edema hepático nos animais IM, uma vez que a razão massa úmida:massa seca do fígado não diferiu entre os grupos. Observando tais alterações em conjunto com os dados ecocardiográficos, constatamos um remodelamento cardíaco patológico associado à presença de edema pulmonar e IC nos animais IM.

Tabela 3 – Massa corporal (MC), massa cardíaca, massa cardíaca corrigida pela massa corporal, massa cardíaca corrigida pelo comprimento da tibia, área infartada, diâmetro de cardiomiócitos, massa dos pulmões e fígado e razão massa úmida : massa seca dos tecidos dos animais controle (Sham) e infartados (IM).

	Sham	IM	p
Massa corporal, g	442±15(14)	426±9 (13)	0,19
Massa cardíaca, mg	1222±48 (12)	1310±50 (11)	0,11
Massa cardíaca/MC, mg/g	2,81±0,06 (12)	3,10±0,06 (10)	0,00
Massa cardíaca/tibia, mg/mm	28,44±0,87 (11)	31,71±1,10 (11)	0,02
Diâmetro de cardiomiócito, µm	14,19±0,42 (6)	14,76±0,17 (6)	0,06
Área infartada, %	0,00±0,00 (6)	27,90±1,40 (6)	0,00
Pulmões, g	2,10±0,15 (11)	2,12±0,10 (11)	0,35
Fígado, g	3,63±0,25 (8)	3,50±0,22 (8)	0,35
Pulmões, úmidos:secos	4,39±0,07 (11)	4,64±0,09 (11)	0,02
Fígado, úmido:seco	2,92±0,02 (8)	2,92±0,01 (8)	0,38

Dados apresentados como média ± erro padrão da média. O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$.

5.1.2 Tolerância à realização de esforço físico

Um dos sinais clássicos da IC é a intolerância à realização de esforço físico (Clark et al., 1996; Sullivan et al., 1991; Witte e Clark, 2007). Dessa maneira, submetemos os animais a um teste incremental máximo em esteira rolante aproximadamente doze semanas após procedimentos cirúrgicos. De fato, a disfunção cardíaca promovida pela cirurgia de IM foi capaz de reduzir significativamente a distância percorrida do grupo IM no teste incremental

máximo (Figura 5), definindo assim a presença de intolerância à realização de esforço físico nesses animais.

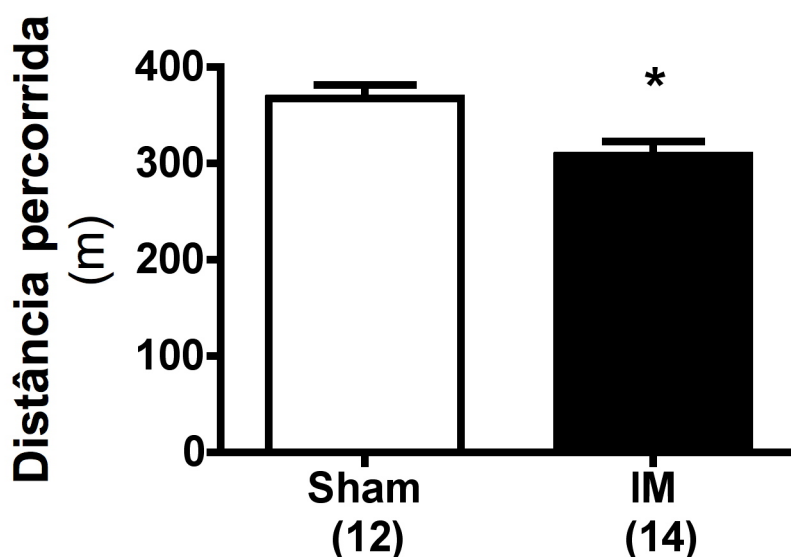


Figura 5 – Distância percorrida em teste incremental máximo em esteira rolante dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada a análise de variância para dois caminhos, $p \leq 0,05$.

5.1.3 Morfologia do músculo esquelético

A redução da massa muscular induzida pela IC é um dos principais fatores que levam à intolerância ao esforço físico presente nesta síndrome (Harrington et al., 1997; Mancini et al., 1992). Além disso, a progressão da atrofia muscular pode culminar em caquexia, considerada um fator independente de mortalidade para pacientes com IC (Anker et al., 1997). O músculo sóleo possui predominância de fibras do tipo I/vermelhas, apresentando assim um fenótipo mais oxidativo, já no músculo plantar as fibras do tipo II/brancas predominam, conferindo a esse músculo um fenótipo

mais glicolítico. Nesse sentido, avaliamos a morfologia tanto do músculo sóleo como do plantar, uma vez que estes possuem características metabólicas, estruturais e contráteis distintas e apresentam diferentes padrões de resposta ao dano muscular induzido por doenças crônicas. De fato, em doenças associadas a problemas inflamatórios, como a IC, músculos glicolíticos parecem ser mais susceptíveis a processos atróficos do que músculos oxidativos (Acharyya et al., 2004; Li et al., 2007).

No entanto, verificamos que tanto o músculo sóleo como o plantar dos animais IM encontram-se com as massas totais (Figuras 6-A e 6-D) e corrigidas pela massa corporal (Figuras 6-B e 6-E) reduzidas nos animais IM. Além disso, as massas corrigidas pelo comprimento da tíbia de ambos os músculos (Figuras 6-C e 6-F) apresentaram tendência ($p=0,07$) à redução nos animais IM.

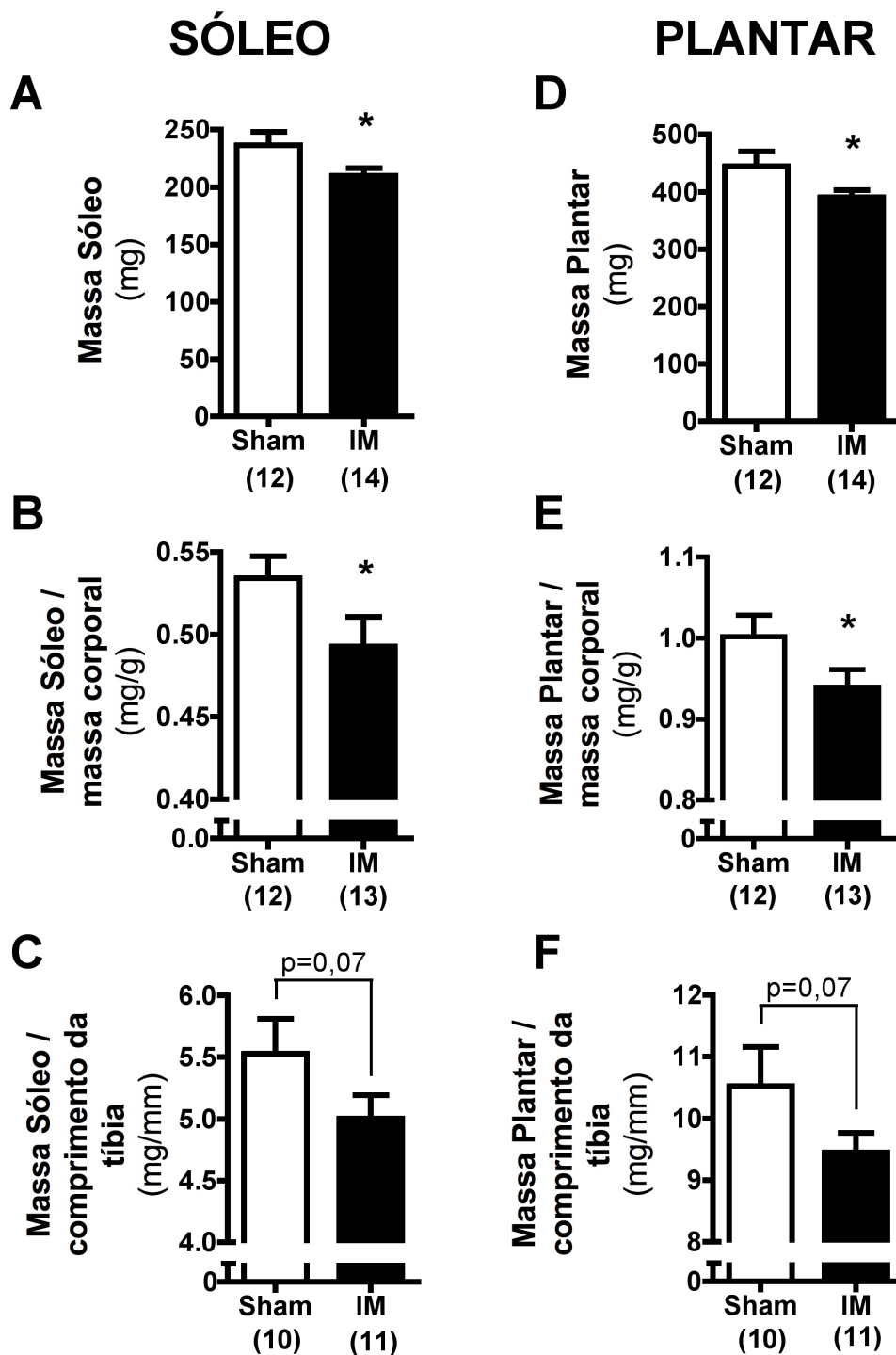


Figura 6 – Massa do sóleo total (A), corrigida pela massa corporal (B) e corrigida pelo comprimento da tíbia (C); Massa do plantar total (D), corrigida pela massa corporal (E) e corrigida pelo comprimento da tíbia (F) dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

Uma vez que apenas a massa do músculo não é um indicativo definitivo de atrofia muscular, analisamos a área de secção transversa das fibras musculares dos tipos I e II, por meio da técnica de histoquímica para miosina ATPase.

Pudemos verificar que os animais IM apresentaram menor área de secção transversa (AST) das fibras musculares do tipo I (Figuras 7-A e 7-E) e do tipo II (Figuras 7-B e 7-F), e também da análise conjunta de todos os tipos de fibras (Figuras 7-C e 7-G) tanto no músculo sóleo como no plantar. Contudo, não encontramos diferenças no padrão de distribuição das fibras dos músculos sóleo e plantar entre os grupos estudados (Figuras 7-D e 7-H), o que demonstra que não ocorreu mudança das fibras oxidativas para um padrão mais glicolítico.

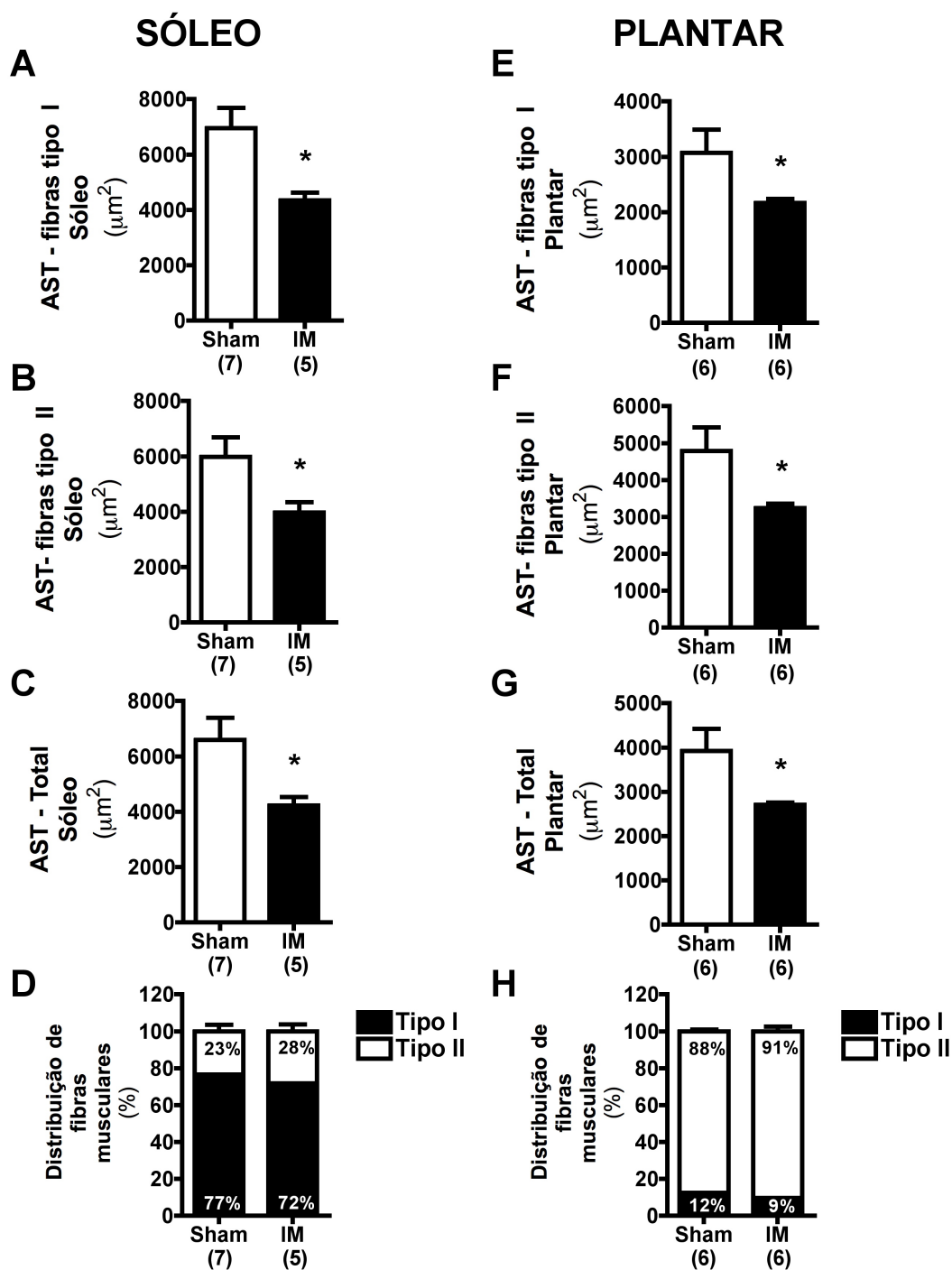


Figura 7 – Área de secção transversa (AST) das fibras musculares do tipo I, tipo II e total e distribuição dos tipos de fibras nos músculos sóleo (A, B, C e D) e plantar (E, F, G e H), respectivamente, dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de Student para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

Em conjunto, os resultados apresentados na caracterização fenotípica, demonstram que a cirurgia de IM foi eficaz em induzir as adaptações cardíacas e musculares esqueléticas esperadas, promovendo redução da função cardíaca, edema pulmonar, miopatia esquelética e intolerância ao esforço físico, fatores que sugerem a presença de IC nesses animais.

5.2 Atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico

Após caracterização das mudanças fenotípicas decorrentes do IM em ratos, avaliamos a atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico e de vias celulares que regulam sua função na musculatura esquelética.

5.2.1 Expressão de genes relacionados à autofagia nos músculos sóleo e plantar

A atrofia muscular induzida por diversos estados catabólicos segue uma regulação transcricional comum, evidenciando a existência de genes relacionados à atrofia, ou atrogenes. Dentre os atrogenes identificados por Lecker et al. (2004), encontram-se alguns essenciais para o funcionamento do sistema lisossomal/autofágico, como *MAP1LC3B*, *GABARAPL1*, *BNIP3* e *CTSL1*. Dessa maneira, testamos a hipótese de que tais genes também estariam mais expressos na musculatura esquelética de animais com IC. Além dos atrogenes, também verificamos a expressão de outros genes envolvidos na autofagia, como *BECN1*, *ATG7*, *ATG12* e *LAMP2*.

Para isso, utilizamos a técnica de qRT-PCR para quantificar os níveis de RNAm dos genes citados acima nos músculos sóleo e plantar de animais Sham e IM.

No músculo sóleo, não verificamos diferença estatística entre os grupos em nenhum dos genes analisados (Figura 8-A), apesar deste músculo encontrar-se atrofiado nos animais IM. Contudo, observamos aumento significativo da expressão gênica de *ATG7*, *GABARAPL1*, *BNIP3*, *LAMP2* e *CTSL1* no músculo plantar dos animais IM (Figura 8-B).

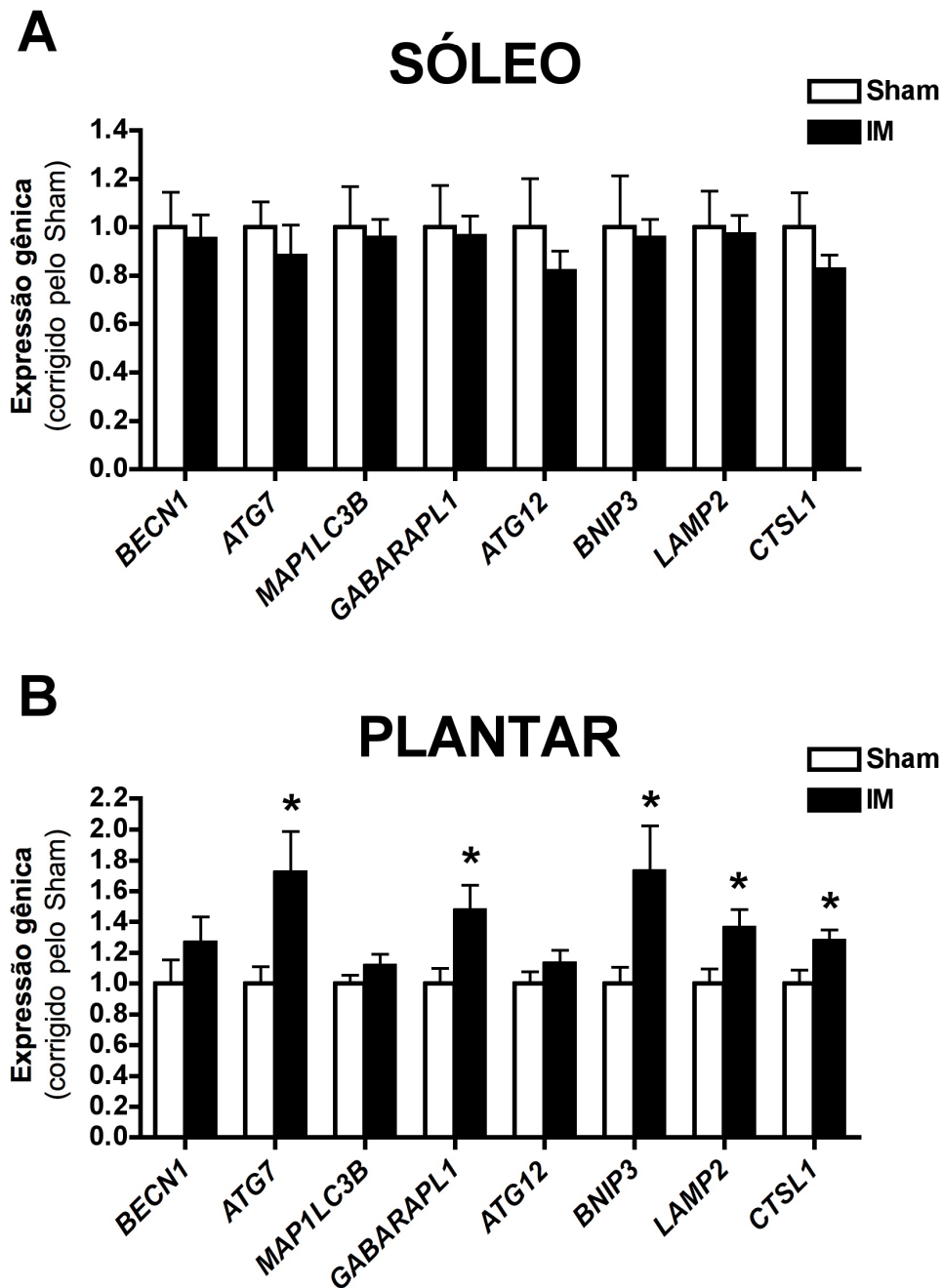


Figura 8 – Expressão dos genes *BECN1*, *ATG7*, *GABARAPL1*, *MAP1LC3B*, *ATG12*, *BNIP3*, *LAMP2* e *CTSL1* nos músculos sóleo (A) e plantar (B) dos animais controle (Sham) e infartados (IM). No músculo sóleo foram utilizados 11 animais no grupo Sham e 10 animais no grupo IM. No músculo plantar foram utilizados 11 animais por grupo, exceto nas expressões de *ATG12* (Sham = 9 animais) e *BNIP3* (Sham = 10 animais) no músculo plantar. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

Os resultados de expressão gênica demonstram uma regulação transcricional de genes autofágicos dependente do fenótipo muscular, já que encontramos aumento da expressão de alguns genes analisados apenas no músculo plantar, com fenótipo glicolítico.

Nesse sentido, decidimos direcionar as análises seguintes no músculo plantar por este ter apresentado maior responsividade na regulação transcricional de genes autofágicos, apesar de tanto o músculo sóleo como o plantar estarem atrofiados.

5.2.2 Expressão de proteínas relacionadas à autofagia no músculo plantar

Por meio da técnica de *Western Blotting*, avaliamos no músculo plantar de animais Sham e IM a expressão de proteínas chave do processo autofágico como LC3-I, LC3-II, Bnip3, Beclin-1, Atg7, Atg12-Atg5 e p62. Além disso, verificamos a expressão proteica de FoxO3a, FoxO3a fosforilada na treonina 32 (pFoxO3a), Akt, Akt fosforilada na serina 473 (pAkt), mTOR e mTOR fosforilada na serina 2448 (pmTOR), uma vez que essas proteínas estão envolvidas na regulação transcricional e não-transcricional do sistema lisossomal/autofágico. A dinâmica mitocondrial é reconhecidamente relacionada à ocorrência de mitofagia. Nesse sentido, verificamos a expressão das proteínas de fusão mitocondrial Mfn1, Mfn2 e OPA1 e das proteínas de fissão mitocondrial DRP1 e Fis1.

Na Figura 9, podemos observar que o IM não induziu alterações das proteínas LC3-I, LC3-II, razão LC3-II/LC3-I, Beclin-1, Atg7, Atg12-Atg5 e p62

no músculo plantar. Contudo, encontramos um aumento significativo na expressão proteica de Bnip3 no plantar dos animais IM.

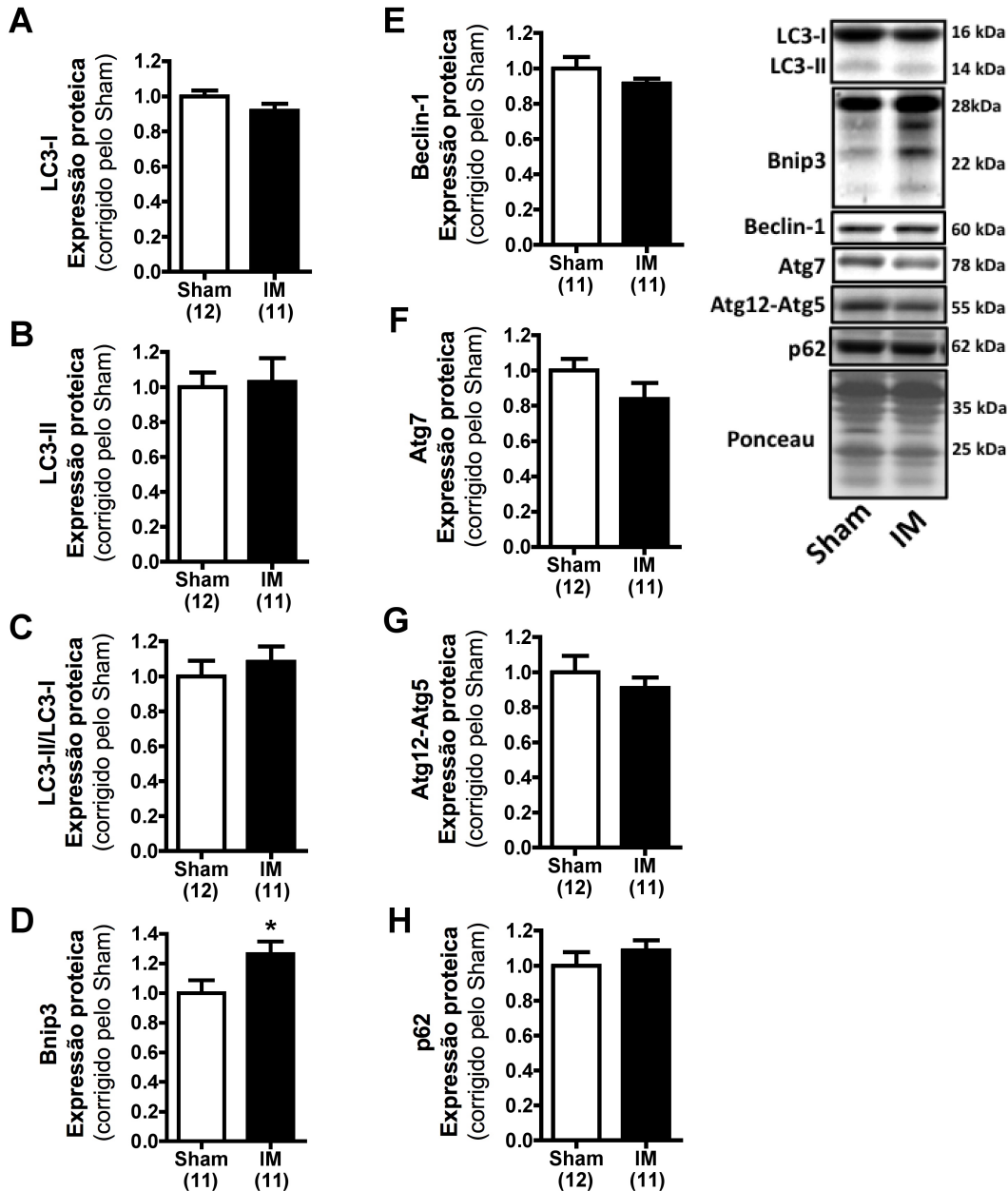


Figura 9 – Expressão proteica de LC3-I (A), LC3-II (B), razão LC3-II/LC3-I (C), Bnip3 (D), Beclin-1 (E), Atg7 (F), Atg12-Atg5 (G) e p62 (H) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

Quando presente no núcleo em sua forma não fosforilada, a proteína FoxO3a atua como fator de transcrição dos genes *MAP1LC3B*, *GABARAPL1* e *BNIP3*. Uma vez que encontramos aumento tanto da expressão gênica como da proteica de Bnip3, supusemos que FoxO3a poderia estar envolvido nesta resposta. Contudo, a expressão proteica total de FoxO3a (Figura 10-A), da sua forma fosforilada (Figura 10-B) e ainda a razão pFoxO3a/FoxO3a (Figura 10-C) não foram alteradas no plantar pelo IM.

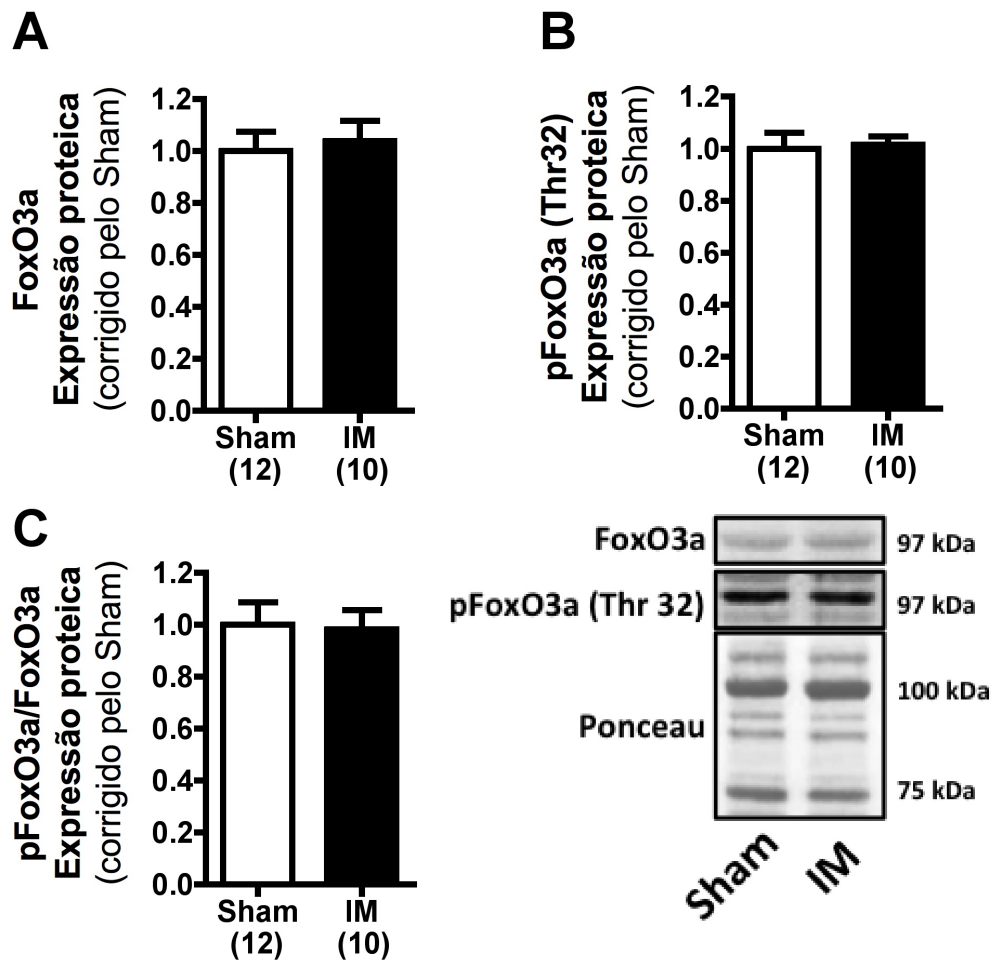


Figura 10 – Expressão proteica de FoxO3a (A), FoxO3a fosforilada na treonina 32 (pFoxO3a; B) e razão pFoxO3a/FoxO3a (C) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

A forma ativa (fosforilada) da proteína Akt atua na fosforilação de FoxO3a e impede sua ação transcricional. Corroborando os resultados de FoxO3a, também não verificamos alteração na expressão proteica de Akt (Figura 11-A), pAkt (Figura 11-B) e da razão pAkt/Akt (Figura 11-C) no plantar dos animais IM.

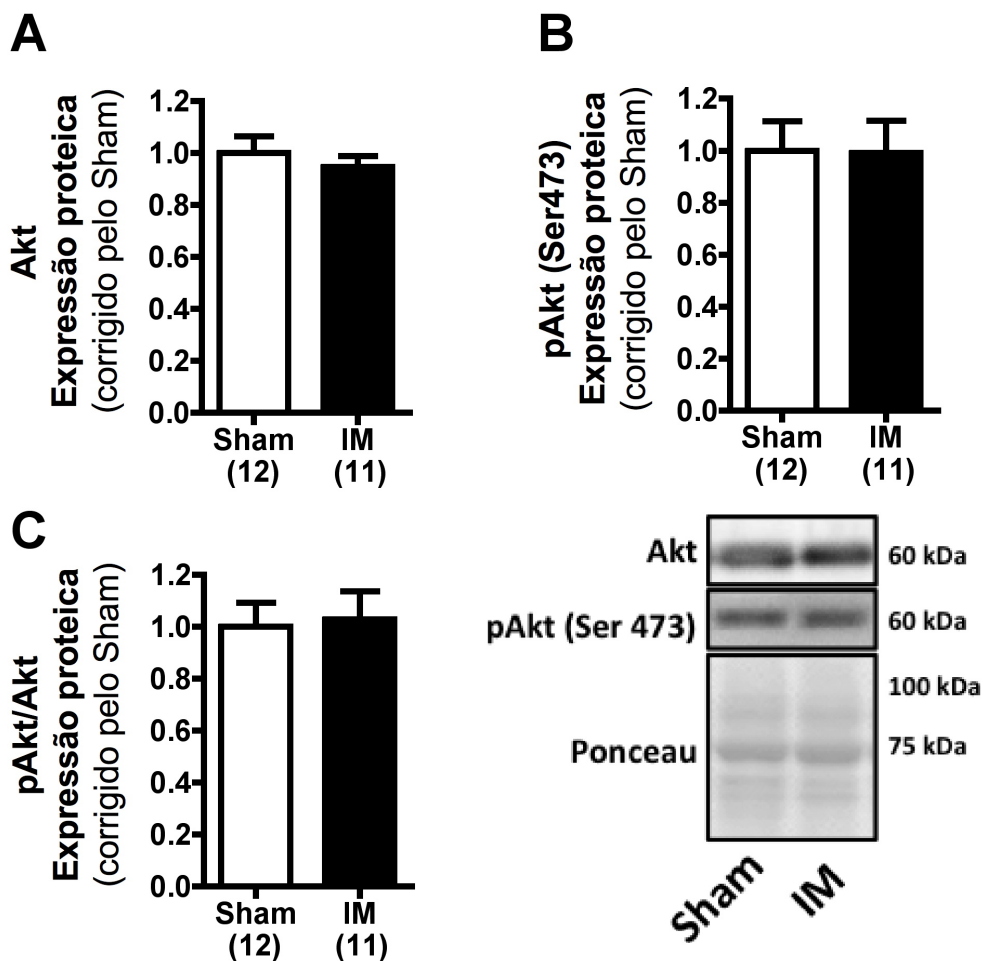


Figura 11 – Expressão proteica de Akt (A), Akt fosforilada na serina 473 (pAkt; B) e razão pAkt/Akt (C) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

A proteína Akt também é responsável pela fosforilação e ativação da quinase mTOR, que quando ativa regulada negativamente a autofagia. De forma interessante, observamos um aumento significativo da expressão total da quinase mTOR (Figura 12-A), contudo, sem alteração na sua forma fosforilada no músculos plantar do grupo IM (Figura 12-B). A razão

pmTOR/mTOR (Figura 12-C) apresentou uma tendência ($p=0,07$) a diminuição no plantar dos animais IM.

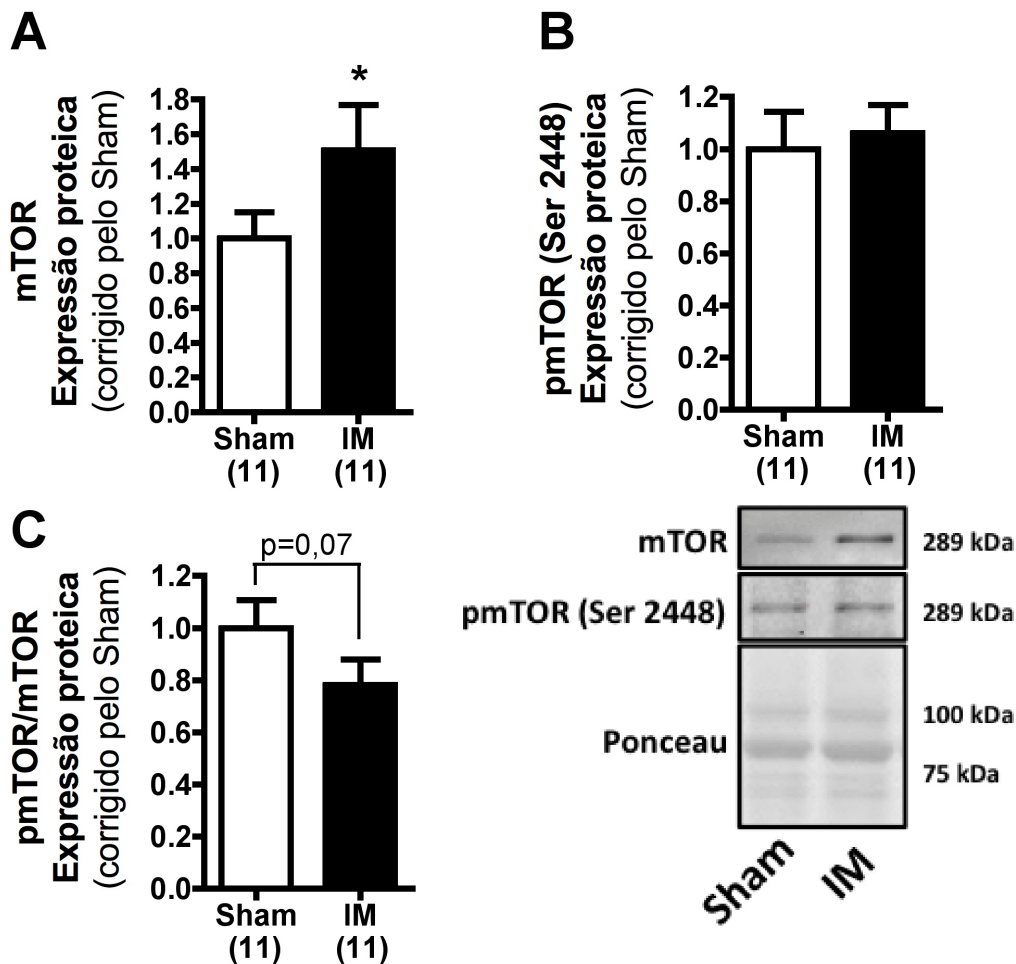


Figura 12 – Expressão proteica de mTOR (A), mTOR fosforilada na serina 2448 (pmTOR; B) e razão pmTOR/mTOR (C) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

O aumento da expressão gênica e proteica de Bnip3 sugerem a ocorrência de autofagia mitocondrial, ou mitofagia, no músculo plantar dos animais IM. Nesse sentido, supomos que os processos de dinâmica mitocondrial, envolvendo a fusão e fissão de mitocôndrias, poderiam estar

envolvidos no aumento da mitofagia, uma vez que alguns estudos apontam tal relação, como relatado na revisão de literatura.

Não observamos diferenças na expressão das proteínas de fusão mitocondrial Mfn1 (Figura 13-A), Mfn2 (Figura 13-B) e OPA1 (Figura 13-C) e da proteína de fissão mitocondrial DRP1 (Figura 13-D). No entanto, a expressão da proteína de fissão mitocondrial Fis1 (Figura 13-E) encontrou-se aumentada no músculo plantar os animais IM. Tal resultado corrobora nossa hipótese, uma vez que a fissão mitocondrial é um processo essencial para o encaminhamento de mitocôndrias para mitofagia.

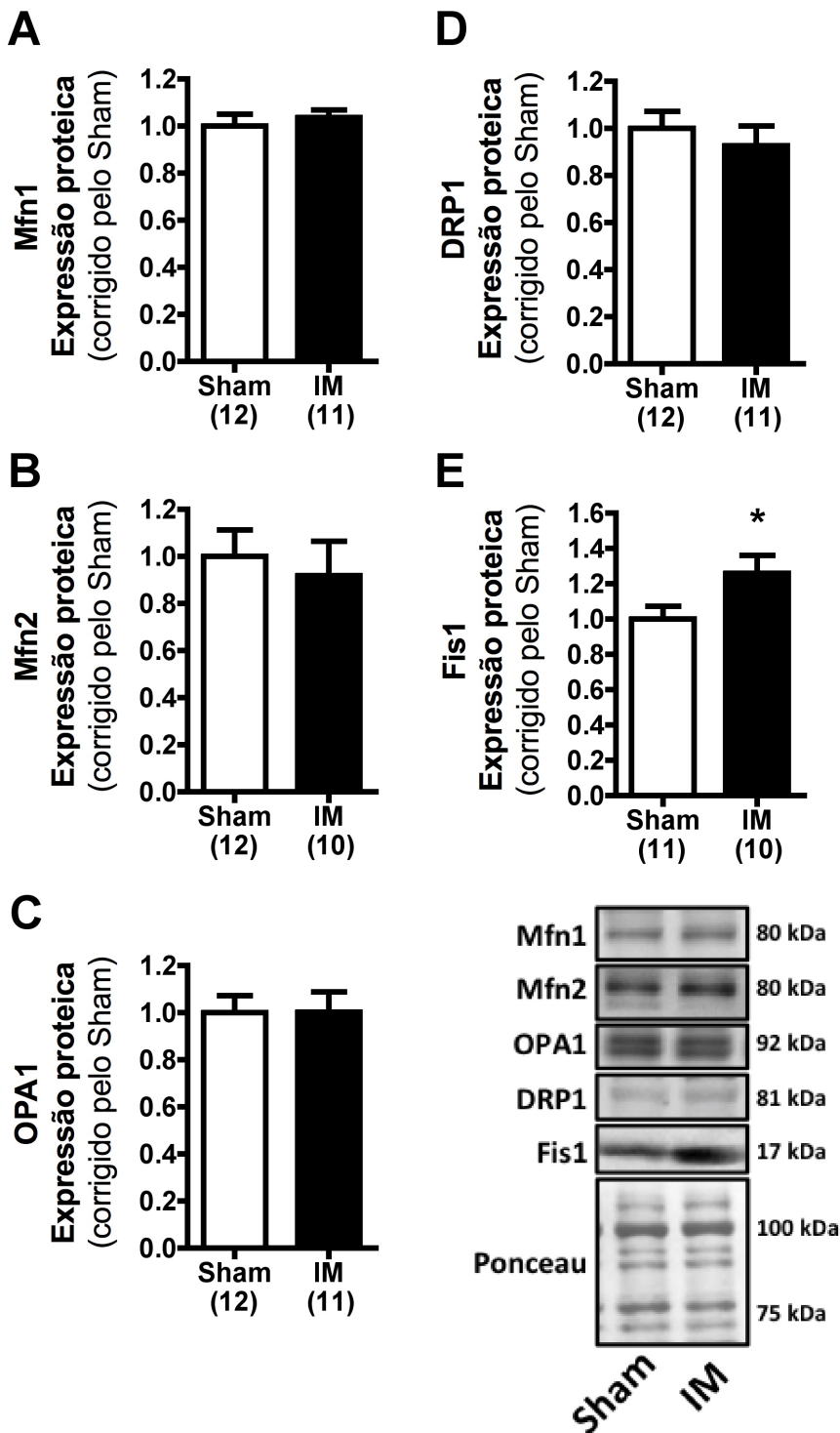


Figura 13 – Expressão das proteínas de dinâmica mitocondrial Mfn1 (A), Mfn2 (B), OPA1 (C), DRP1 (D) e Fis1 (E) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

5.2.3 Atividade enzimática da Catepsina L no músculo plantar

Após serem englobados pela vesícula autofágica, o então formado autofagossomo funde-se com um lisossomo e libera seus constituintes para degradação. A degradação de proteínas dentro dos lisossomos depende da ação de proteases ácidas. Uma vez que verificamos aumento da expressão do gene codificante (*CTSL1*) da protease Catepsina L, decidimos avaliar a sua atividade enzimática. De fato, o aumento da expressão gênica de *CTSL1* foi acompanhado por uma maior atividade da protease Catepsina L (Figura 14) no músculo plantar dos animais IM, o que evidencia aumento da degradação de proteínas dentro dos lisossomos.

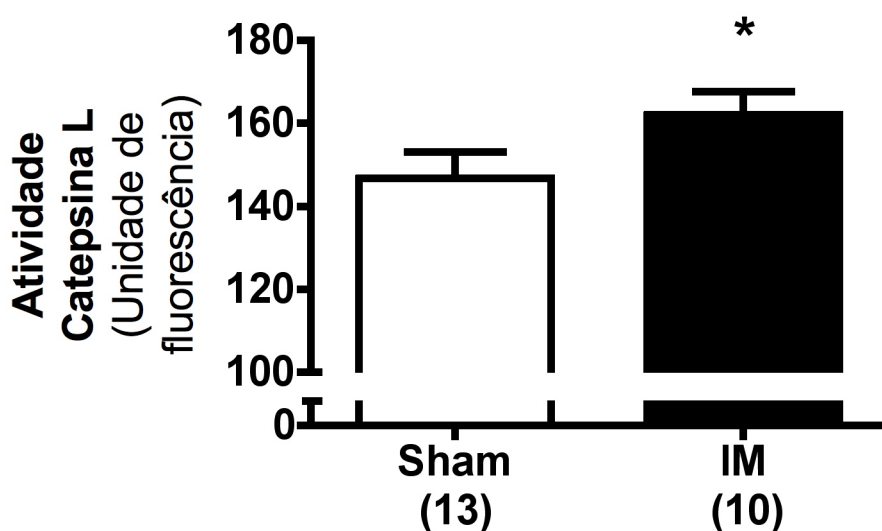


Figura 14 – Atividade enzimática da protease lisossomal Catepsina L no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

5.2.4 Parâmetros de estresse oxidativo na musculatura esquelética

Uma vez que o estresse oxidativo está relacionado à ativação de sistemas proteolíticos como o lisossomal/autofágico, e tem papel importante na indução de mitofagia, decidimos verificar a sua presença no músculo plantar dos animais infartados. De fato, observamos que os animais IM apresentam um aumento de hidroperóxidos lipídicos totais (Figura 15-A), que não foi acompanhado de aumento na carbonilação/oxidação de proteínas (Figura 15-B).

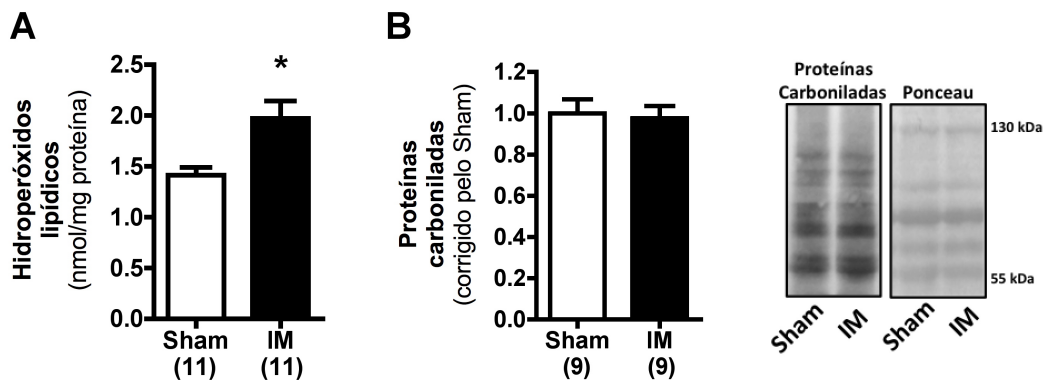


Figura 15 – Avaliação de hidroperóxidos lipídicos totais (A) e proteínas carboniladas/oxidadas (B) no músculo plantar dos animais controle (Sham) e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado entre parênteses. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizado o teste *t* de *Student* para dados não pareados, $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$ vs. Sham.

Estes resultados sugerem que o músculo plantar dos animais IM está em um quadro de estresse oxidativo, o que poderia explicar em parte o aumento da fissão mitocondrial e da mitofagia. O fato de termos encontrado aumento apenas do parâmetro de oxidação de lipídios pode estar

relacionado à gravidade do quadro de estresse oxidativo, ou ainda à localização da fonte de geração de ERO na célula.

5.3 Correlações

Por fim, testamos a correlação entre diversos resultados apresentados anteriormente, com o intuito de verificar uma possível associação entre as variáveis analisadas. Na Figura 16 encontram-se as correlações significantes que chamaram a atenção por traçar importantes paralelos entre a ativação do sistema lisossomal/autofágico e suas causas e/ou consequências.

Verificamos que o aumento a expressão gênica de *CTSL1* está significativamente correlacionado com a diminuição da AST das fibras musculares do plantar (Figura 16-A), demonstrando a associação entre a degradação lisossomal e a atrofia do plantar. É interessante ressaltar que a mesma correlação não foi encontrada no músculo sóleo (Anexo A). Além disso, a expressão gênica de *BNIP3* no músculo plantar apresentou correlação negativa com a distância percorrida em teste incremental máximo (Figura 16-B), relacionando o aumento da mitofagia com a intolerância ao esforço. Apesar da expressão proteica de LC3-II não diferir entre os animais Sham e IM, verificamos que a expressão dessa proteína também está associada à intolerância ao esforço (Figura 16-C). Ainda observamos correlação positiva entre a quantidade de hidroperóxidos lipídicos e a expressão proteica de *Bnip3* no músculo plantar (Figura 16-D), sugerindo que o estresse oxidativo está associado ao aumento da mitofagia.

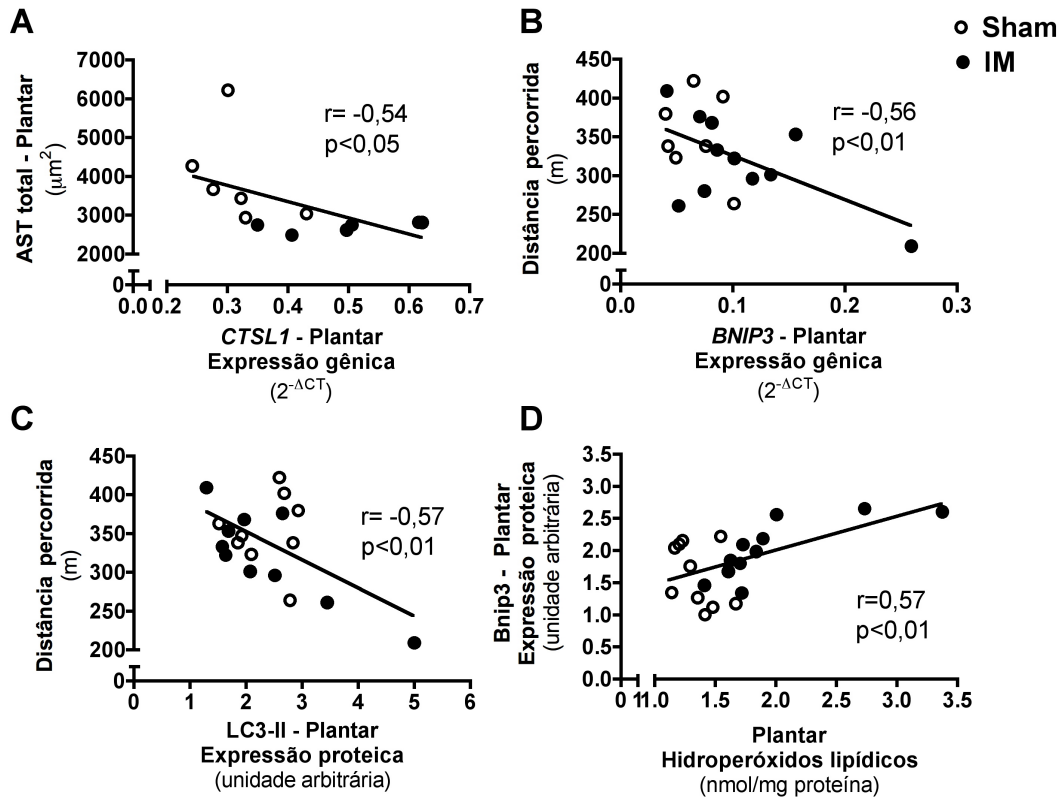


Figura 16 – Correlações entre a expressão gênica de *CTSL1* e área de secção transversa (AST) das fibras musculares do plantar (A), expressão gênica de *BNIP3* no plantar e distância percorrida em teste incremental máximo (B), expressão proteica de LC3-II no plantar e distância percorrida em teste incremental máximo (C), e hidroperóxidos lipídicos e expressão proteica de Bnip3 no plantar (D). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$.

5.4 Sumário dos resultados

Quadro 1 – Sumário dos resultados da caracterização fenotípica.

Variáveis	Efeito do infarto	
	Sóleo	Plantar
Massa corporal	↔	
Função ventricular	↓	
Massa cardíaca/massa corporal	↑	
Diâmetro de cardiomiócitos	↑*	
Área infartada	↑	
Edema pulmonar	↑	
Edema hepático	↔	
Tolerância ao esforço físico	↔	
Morfologia Muscular	Sóleo	Plantar
Massa	↓	↓
AST das fibras	↓	↓
% de fibras musculares oxidativas	↔	↔
% de fibras musculares glicolíticas	↔	↔

↔, sem alteração; ↑, aumento; ↓, diminuição; ↑*, tendência estatística para aumento.

Quadro 2 – Sumário dos resultados de expressão gênica nos músculo sóleo e plantar.

Expressão Gênica	Efeito do infarto	
	Sóleo	Plantar
<i>BECN1</i>	↔	↔
<i>ATG7</i>	↔	↑
<i>MAP1LC3B</i>	↔	↔
<i>GABARAPL1</i>	↔	↑
<i>ATG12</i>	↔	↔
<i>BNIP3</i>	↔	↑
<i>LAMP2</i>	↔	↑
<i>CTSL1</i>	↔	↑

↔, sem alteração; ↑, aumento.

Quadro 3 – Sumário dos demais resultados no músculo plantar.

Variáveis	Efeito do infarto
Expressão Proteica	Plantar
LC3-I	↔
LC3-II	↔
LC3-II/LC3-I	↔
Bnip3	↑
Beclin-1	↔
Atg7	↔
Atg12-Atg5	↔
p62	↔
FoxO3a	↔
pFoxO3a (Thr32)	↔
pFoxO3a/FoxO3a	↔
Akt	↔
pAkt (Ser473)	↔
pAkt/Akt	↔
mTOR	↑
pmTOR (Ser2448)	↔
pmTOR/mTOR	↔
Mfn1	↔
Mfn2	↔
OPA1	↔
DRP1	↔
Fis1	↑
Atividade Catepsina L	↑
Hidroperóxidos Lipídicos	↑
Proteínas Carboniladas	↔

↔, sem alteração; ↑, aumento.

Quadro 4 – Sumário das principais correlações encontradas.

Principais Correlações	
↑ RNAm <i>CTSL1</i> Plantar	↓ AST Plantar
↑ RNAm <i>BNIP3</i> Plantar	↓ Tolerância ao esforço físico
↑ Proteína LC3-II Plantar	↓ Tolerância ao esforço físico
↑ Hidroperóxidos Lipídicos Plantar	↑ Proteína Bnip3 Plantar

↑, aumento; ↓, diminuição.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo investigar a atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico no músculo esquelético de ratos infartados. Os resultados aqui apresentados demonstram pela primeira vez que a atrofia muscular induzida pelo IM em ratos está associada à alterações de componentes do sistema proteolítico lisossomal/autofágico, o que pode ter contribuído para o quadro de intolerância ao esforço físico. A seguir, serão discutidos os resultados obtidos no presente estudo e levantando as limitações encontradas.

6.1 Caracterização fenotípica do modelo experimental de insuficiência cardíaca induzida pelo infarto do miocárdio

Para estudarmos os efeitos da IC na atuação muscular esquelética do sistema proteolítico lisossomal/autofágico utilizamos o modelo experimental de infarto do miocárdio (IM) em ratos, uma vez que a IC de etiologia isquêmica é a mais prevalente em humanos. Esse modelo experimental de IC têm sido utilizado há décadas para mimetizar em animais os efeitos da isquemia cardíaca prologada, o que têm facilitado a compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações locais e sistêmicas promovidas pela lesão cardíaca e auxiliado no desenvolvimento de terapias para combatê-la (Fishbein et al., 1978).

Como esperado, doze semanas após a cirurgia de IM, os ratos apresentaram severa disfunção ventricular esquerda e remodelamento cardíaco patológico como o aumento da massa cardíaca e do diâmetro de cardiomiócitos. O funcionamento inadequado da bomba cardíaca promove frequentemente o acúmulo de fluídos nos pulmões (edema pulmonar), e no caso da IC acometer o ventrículo direito, observa-se acúmulo de líquidos no fígado (edema hepático), o que leva a disfunção de esses órgãos e contribui para a dispneia (Witte e Clark, 2007). Os animais IM apresentaram aumento da razão massa úmida:massa seca dos pulmões, evidenciando a presença de edema pulmonar. Como consequência, essas alterações promoveram a intolerância ao esforço físico nesses animais, condição comumente avaliada na clínica como forma de classificar a gravidade da doenças cardíaca em pacientes (Krum e Abraham, 2009). A disfunção cardíaca associada aos sintomas de edema pulmonar e intolerância ao esforço físico são indicativos da presença de IC nos animais infartados (Lucas et al., 2000). Todas essas alterações corroboram com resultados anteriores do nosso e de outros laboratórios (Ferreira et al., 2011; Moreira et al., 2013; Schulze et al., 2003; Tsutsui et al., 2001), e indicam que a cirurgia de IM em ratos é eficaz em promover IC e mimetizar sintomas presentes em humanos com esta doença.

A intolerância ao esforço físico, como demonstrado na revisão de literatura, está mais relacionada a alterações musculares do que a própria disfunção cardíaca presente na IC (Duscha et al., 2008; Franciosa et al., 1981; Sinoway e Li, 2005; Troosters et al., 2004; Ventura-Clapier et al., 2002; Witte e Clark, 2007). Dessa maneira, a miopatia esquelética induzida

pela IC tem ganhado destaque como potencial alvo terapêutico da intolerância ao esforço físico na síndrome. De fato, Fulster et al. (Fulster et al., 2013) demonstraram que ~20% dos pacientes com IC apresentam atrofia muscular, fato que agrava ainda mais a intolerância ao esforço físico e reduz a força muscular, comprometendo a qualidade de vida desses indivíduos.

Diante disso, avaliamos a morfologia dos músculos sóleo e plantar dos animais submetidos ao IM e pudemos observar que tanto a massa como a AST das fibras desses músculos encontram-se reduzidas, evidenciando a atrofia muscular. Embora a transição de fibras musculares oxidativas (tipo I) para um perfil mais glicolítico (tipo II) induzida pela IC já tenha sido demonstrada por diversos grupos, inclusive o nosso (Bacurau et al., 2009; Hambrecht et al., 1997; Lipkin et al., 1988; Mancini et al., 1992; Sullivan et al., 1991), não encontramos tal alteração em nenhum dos músculos analisados no presente modelo experimental utilizado. Nesse sentido, Drexler *et al.* (1992) sugerem que mudanças na distribuição dos tipos de fibras musculares induzidas pela IC ocorrem com mais frequência em estágios tardios da síndrome. Isso pode explicar a ausência dessas mudanças no presente estudo, já que as análises aqui apresentadas foram realizadas doze semanas após a cirurgia de IM.

Os resultados de caracterização fenotípica nos permitiu prosseguir com o estudo, uma vez que para testar a hipótese de que a atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico estaria relacionada à miopatia esquelética induzida pela IC, precisaríamos de um modelo experimental que

reproduzisse tais características. Assim, o modelo de IM em ratos demonstrou-se adequado.

6.2 Atuação do sistema proteolítico lisossomal/autofágico na musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca

Apesar dos esforços que têm sido realizados para combater os efeitos adversos da IC, a miopatia esquelética continua a ser um problema subestimado. A melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na miopatia esquelética induzida pela IC pode auxiliar no desenvolvimento de terapias farmacológicas e/ou gênicas para prevenir ou tratar tal condição, aumentando assim a capacidade de exercício físico, a qualidade de vida e o prognóstico desses pacientes. Uma vez que o sistema lisossomal/autofágico tem sido considerado necessário para a manutenção da massa muscular, no presente estudo testamos a atuação de diferentes componentes da via autofágica em músculos atroficos de animais com IC.

Para isso, primeiramente quantificamos nos músculos sóleo e plantar de animais IM e Sham, os níveis de RNAm de genes envolvidos em diferentes fases do processo autofágico: indução (*BECN1*, codificando Beclin-1), alongamento e maturação da vesícula autofágica (*ATG7*, *ATG12*, *MAP1LC3B*, *GABARAPL1*, codificando as proteínas Atg7, Atg12, LC3 e Gabarapl1, respectivamente), seleção de substratos (*BNIP3*, codificando Bnip3), fusão de autofagossomos com lisossomos (*LAMP2*, codificando Lamp2) e degradação lisossomal (*CTSL1*, codificando Catepsina L).

Observamos aumento nos níveis de RNAm de *ATG7*, *LAMP2* e *CTSL1* no músculo plantar dos animais IM quando comparados aos Sham. Esses resultados sugerem, respectivamente, expansão da membrana autofágica, maior fusão de autofagossomos com lisossomos, acompanhada de aumento da degradação proteica dentro dos lisossomos exclusivamente no músculo plantar. Da mesma forma, os níveis de RNAm de *GABARAPL1* e *BNIP3* também estavam aumentados apenas no músculo plantar dos animais IM, o que levanta a possibilidade de que o sistema lisossomal/autofágico estivesse ativado para remover mitocôndrias danificadas/disfuncionais, aumentando a mitofagia exclusivamente no músculo plantar. De fato, Novak et al. (2010) demonstraram que a interação de Bnip3l/Nix, homólogo de Bnip3, com Gabarapl1 é mais forte do que com LC3, e essa interação é essencial para a remoção de mitocôndrias pela autofagia.

A diferença entre as expressões dos homólogos *MAP1LC3B* e *GABARAPL1* é intrigante. Estes genes são ortólogos do gene *ATG8* presente em leveduras e atuam no alongamento e maturação da membrana do autofagossomo (Kabeya et al., 2004). Contudo, estudos recentes demonstraram que apesar de ambos serem essenciais para a formação do autofagossomo, eles parecem atuar em momentos distintos desse processo, onde a proteína LC3 atuaria na expansão inicial da vesícula autofágica, e a proteína Gabarapl1 na regulação do tamanho do autofagossomo, controlando provavelmente o processo final de vedação da vesícula (Weidberg et al., 2010). Cabe ressaltar que tal resultado também pode ser

explicado pela maior susceptibilidade do gene *GABARAPL1* em ser expresso em situações que induzem autofagia, como demonstrado por Mammucari et al. (2007), onde a realização de 24h de jejum (potente indutor de autofagia) promoveu uma expressão muito mais evidente do gene *GABARAPL1* quando comparado à expressão de *MAP1LC3B*.

Lecker et al. (2004) demonstraram que a atrofia muscular induzida por jejum, câncer, insuficiência renal crônica ou diabetes apresentam uma reprogramação gênica comum, evidenciando a existência de genes relacionados à atrofia, ou atrogenes. Dentre os atrogenes identificados, quatro estão envolvidos diretamente no sistema lisossomal/autofágico: *MAP1LC3B*, *GABARAPL1*, *BNIP3* e *CTSL1*, os quais, com exceção de *MAP1LC3B*, encontramos aumento da expressão no plantar dos animais IM. Assim, este e outros trabalhos do nosso grupo (Cunha et al., 2012; Moreira et al., 2013) demonstram que a atrofia muscular induzida pela IC apresenta uma programação transcricional semelhante a outras doenças sistêmicas.

É importante ressaltar que os genes relacionados à autofagia foram expressos de maneira distinta em músculos compostos por diferentes tipos de fibras e características metabólicas, uma vez que não observamos alterações nos genes analisados no músculo sóleo, apesar deste também encontrar-se atrofiado. O fato de termos encontrado correlação negativa entre os níveis de RNAm de *CTSL1* e a AST das fibras do músculo plantar, sugere que a degradação lisossomal ocorre especificamente na atrofia de músculos glicolíticos, pelo menos no estágio de miopatia esquelética aqui estudado (doze semanas após o IM).

Um série de estudos demonstram que músculos oxidativos são mais resistentes a estímulos atrofícos induzidos por doenças sistêmicas que músculos glicolíticos (Minnaard et al., 2005; Sandri et al., 2006; Yu et al., 2008). Esta resposta tem sido relacionada a maior expressão do co-fator de transcrição PGC-1 α em músculos oxidativos, o qual promove maior defesa antioxidante e inibição do fator de transcrição FoxO3a (Sandri et al., 2006; Yu et al., 2008). De fato, encontramos maior expressão gênica de *PGC-1 α* no músculo sóleo quando comparado ao plantar (Anexo B), enquanto não foram observadas diferenças entre os grupos Sham e IM, como publicado previamente por nosso grupo (Moreira et al., 2013). Em concordância, estudos do nosso laboratório demonstraram menor estresse oxidativo no músculo sóleo quando comparado ao músculo plantar de animais IM (Bechara, 2012; Moreira et al., 2013).

Além disso, um estudo recente (Lira et al., 2013) demonstrou que músculos oxidativos apresentam maior fluxo autofágico basal quando comparados a glicolíticos, apesar de Mizushima et al. (2004) terem demonstrado que quando submetidos a jejum os músculos glicolíticos são mais responsivos ao aumento do número de autofagossomos. De fato, Ogata et al. (2010) observaram que apesar da autofagia induzida por jejum ocorrer tanto em músculo oxidativos como glicolíticos, ela é observada mais precocemente nos glicolíticos.

Tais evidências dão suporte aos nossos resultados, uma vez que apesar de ambos os músculos estudados encontrarem-se atrofiados, verificamos alteração transcricional de genes autofágicos apenas no

músculo plantar, de característica glicolítica. Assim a atrofia do sóleo no estágio de IC estudado no presente trabalho, pode ser resultado de outros fatores que não a ativação do sistema lisossomal/autofágico. Supomos que a atrofia do músculo sóleo tenha ocorrido principalmente por maior atividade do sistema ubiquitina/proteassoma, fato já evidenciado tanto no sóleo como no plantar por estudos prévios de nosso laboratório (Bechara, 2012; Moreira et al., 2013).

Por termos encontrado regulação transcricional de genes do sistema lisossomal/autofágico apenas no músculo plantar dos animais IM, decidimos aprofundar as análises apenas nesse músculo.

Dentre as diversas proteínas relacionadas à autofagia analisadas, encontramos aumento apenas na expressão de Bnip3, o que fortalece a hipótese de mitofagia aumentada no músculo plantar dos animais IM. Diferente do esperado, não observamos alteração na expressão de LC3-I e LC3-II, uma vez que esta última é considerada marcador da quantidade de autofagossomos. Com base nos resultados de expressão gênica, podemos supor que a proteína homóloga de LC3, Gabarapl1, tenha um maior papel na formação de autofagossomos em nosso modelo experimental. Contudo, não avaliamos a expressão proteica de Gabarapl1 no presente estudo. Outra possibilidade para explicar a não alteração de LC3-II é o fato desta ser degradada junto com o autofagossomo e seu conteúdo. Dessa maneira, o acúmulo dessa proteína não aconteceria caso o fluxo autofágico estivesse aumentado. Nessa linha de pensamento, podemos sugerir que o fluxo autofágico esteja aumentado no músculo plantar dos animais IM, uma vez

que encontramos maior expressão gênica de *LAMP2*, indicando acelerada fusão dos autofagossomos com lisossomos, em adição à maior atividade da protease lisossomal Catepsina L, evidenciando aumento da degradação proteica nos lisossomos. Em conjunto, esses resultados podem indicar a rápida degradação e o não acúmulo de LC3-II.

A expressão da proteína p62 também tem sido utilizada como forma de avaliar o fluxo autofágico, uma vez que esta é considerada um substrato da autofagia por ser responsável pelo reconhecimento de proteínas específicas e seu encaminhamento para a degradação via autofagia (Klionsky et al., 2012). Assim, a sua diminuição poderia indicar maior fluxo autofágico. No presente estudo não verificamos diferença na expressão proteica de p62, resposta a qual supomos que seja devido a uma compensação por meio do aumento da sua expressão gênica. Contudo, a avaliação dos níveis de RNAm de p62 não foi realizada no presente estudo.

A proteína FoxO3a é um conhecido fator de transcrição de atrogenes, como *Atrogin-1/MAFbx*, *MuRF1*, *MAP1LC3B*, *GABARAPL1* e *BNIP3* (Mammucari et al., 2007; Sandri et al., 2004). Assim, supusemos que o aumento da expressão gênica de *GABARAPL1* e *BNIP3*, poderia ser decorrente de maior atividade desse fator de transcrição. Para isso, avaliamos a expressão de FoxO3a e da sua forma fosforilada e inativa, pFoxO3a (Thr32). Diferente do esperado, não observamos alterações significantes nas expressões de FoxO3a e pFoxO3a (Thr32). Também não verificamos alteração na proteína Akt e na sua forma fosforilada, pAkt

(ser473), o que corrobora o resultado de FoxO3a, uma vez que Akt fosforila FoxO3a e impede sua atividade transcricional.

A proteína quinase mTOR, regulada positivamente pela Akt, além de ter um importante papel na síntese de proteínas, também está relacionada à inibição da autofagia (Bonaldo e Sandri, 2013). De forma intrigante, observamos aumento da expressão total de mTOR no plantar dos animais IM, contudo, sem alteração na quantidade de sua forma fosforilada e ativa, pmTOR (Ser2448). O aumento da expressão total de mTOR poderia ser uma resposta compensatória para aumentar a síntese proteica e sustentar a massa muscular. Porém, sem sucesso, uma vez que tal regulação não resultou no aumento da fosforilação de mTOR. Em relação à regulação autofágica mediada pela mTOR, Mammucari et al. (2007) demonstraram que a autofagia não é afetada pelo bloqueio da mTOR nos músculos esqueléticos, descartando seu papel na atrofia muscular induzida pelo aumento da autofagia.

Dessa maneira, os resultados encontrados para as proteínas FoxO3a, Akt e mTOR indicam a não participação das mesmas nas alterações encontradas no sistema lisossomal/autofágico no músculo plantar dos animais IM.

Os indícios de maior ocorrência de mitofagia no músculo plantar dos animais IM nos levaram a avaliar os processos de fissão e fusão de mitocôndrias, uma vez que estes atuam em conjunto da mitofagia e promovem o remodelamento da estrutura mitocondrial. Nesse sentido, não verificamos alterações significativas em proteínas relacionadas à fusão

mitocondrial. Contudo, a expressão de Fis1, proteína importante para a fissão mitocondrial, estava aumentada no músculo plantar dos animais IM, o que pode sugerir que processo de fissão mitocondrial esteja induzido nesse músculo. Tal resultado reforça ainda mais o quadro mitofágico, uma vez que Twig (2008) demonstraram que a fissão mitocondrial é um passo anterior e necessário para que ocorra a mitofagia. Além disso, Romanello et al. (2010) demonstraram que a atrofia muscular induzida por jejum era prevenida ao inibir Fis1 e/ou Bnip3, sendo que tal resposta era decorrente da diminuição do processo autofágico.

A indução de fissão mitocondrial e mitofagia está relacionada a maior produção de ERO pela mitocôndria (Thomas et al., 2011; Youle e Narendra, 2011). Assim, decidimos avaliar o estado de estresse oxidativo no músculo plantar. De fato, verificamos aumento da concentração de hidroperóxidos lipídicos no plantar dos animais IM, contudo, sem alteração na carbonilação/oxidação de proteínas. A correlação entre o aumento da expressão proteica de Bnip3 e maiores concentrações de hidroperóxidos lipídicos no músculo plantar indica que o estresse oxidativo presente nesse músculo pode ser um fator indutor do processo mitofágico. É interessante ressaltar que ao avaliarmos tal correlação separadamente nos animais Sham e IM (Anexo C), observamos que ela se mantém significativa apenas nos animais IM, indicando que o aumento da mitofagia muscular devido ao estresse oxidativo ocorre somente após o IM.

Por fim, é interessante observar que a expressão de LC3-II no plantar se correlacionou negativamente com a distância percorrida em um teste

incremental máximo, muito embora sua expressão não tenha sido alterada pelo IM. Além disso, os níveis elevados de RNAm de *BNIP3* no plantar também apresentaram correlação negativa com a distância percorrida. Em ambas correlações, ao separarmos os dados dos animais Sham e IM, apenas nos animais IM, as correlações se mantiveram significativas (Anexos D e E), demonstrando serem respostas induzidas especificamente pelo IM.

Em conjunto, tais correlações e os resultados já apresentados sugerem a possibilidade do fluxo autofágico muscular estar direcionado para a remoção de mitocôndrias, auxiliando na readequação metabólica causada pela IC, a qual culmina em intolerância ao esforço físico. Essa mudança no metabolismo energético foi evidenciada pelo nosso laboratório, onde observamos diminuição nas atividades das enzimas citrato sintase (metabolismo oxidativo) e hexoquinase (metabolismo glicolítico) na musculatura esquelética de animais IM (Moreira et al., 2013).

Num primeiro momento, o aumento da mitofagia nas fibras musculares dos animais com IC parece ser necessário para remover mitocôndrias disfuncionais impedindo a progressão do estresse oxidativo. Contudo, em um segundo momento, o processo mitofágico aumentado pode reduzir a capacidade de produção de energia da fibra muscular, contribuindo para o quadro de intolerância ao esforço físico.

Em geral, o presente estudo forneceu evidências de que o sistema lisossomal/autofágico está ativado especificamente no músculo plantar dos animais IM, e pode ter contribuído para a atrofia muscular e intolerância ao esforço físico presente nesse modelo.

6.3 Limitações e perspectivas

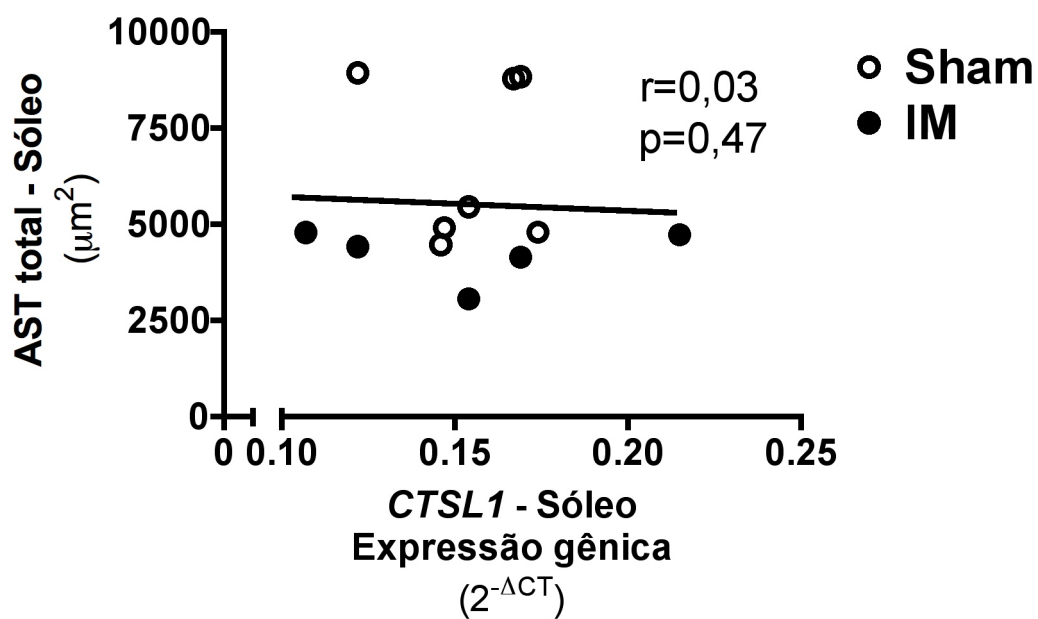
Os experimentos apresentados no presente estudo foram realizados doze semanas após a cirurgia de IM, uma vez que nosso grupo havia demonstrado previamente a presença de atrofia muscular nesse estágio de progressão da IC. Assim, nossos resultados são restritos a esse momento, e não podemos excluir a possibilidade de regulação diferenciada do sistema lisossomal/autofágico em outros estágios da doença, incluindo o aumento da transcrição de genes autofágicos no músculo sóleo em momento posterior ao aqui analisado.

Outros estudos devem ser realizados para melhor elucidar os mecanismos envolvidos na atuação do sistema lisossomal/autofágico na musculatura esquelética de modelos experimentais de IC e em humanos com essa doença, levando em consideração principalmente as respostas diferenciadas de músculos oxidativos e glicolíticos.

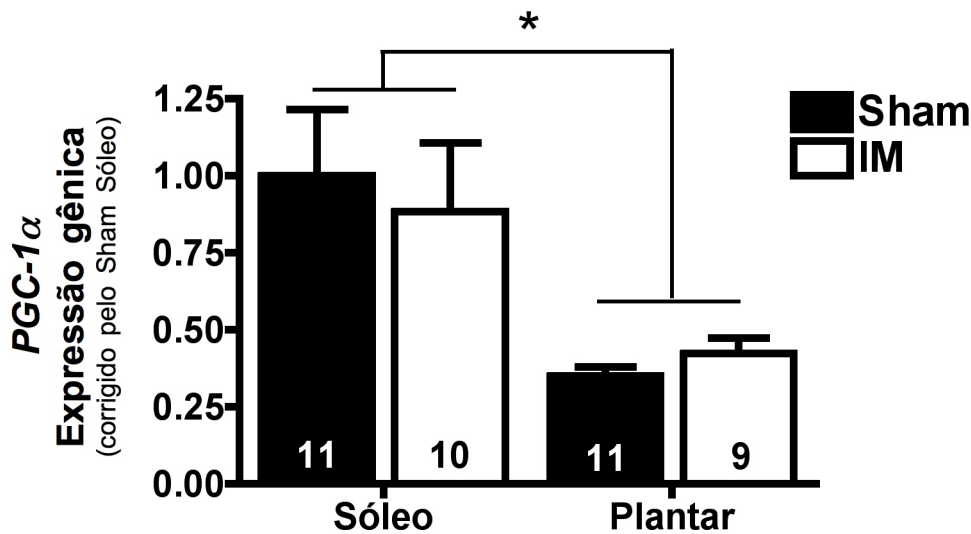
7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o IM em ratos levou ao aumento da transcrição de genes do sistema lisossomal/autofágico especificamente no músculo plantar cujo metabolismo predominante é glicolítico, o mesmo não ocorrendo no músculo sóleo de perfil metabólico oxidativo. A ativação de alguns componentes do sistema lisossomal/autofágico sugere a participação desse sistema proteolítico para a atrofia do músculo plantar e para o quadro de intolerância ao esforço físico nos animais com IC.

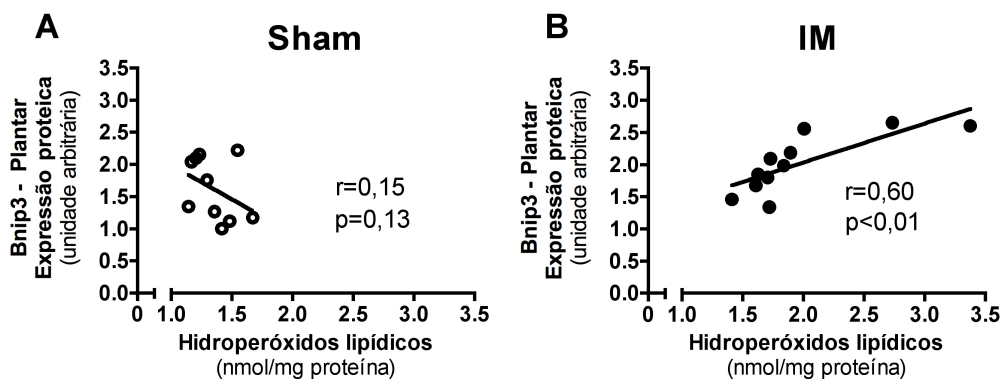
8 ANEXOS



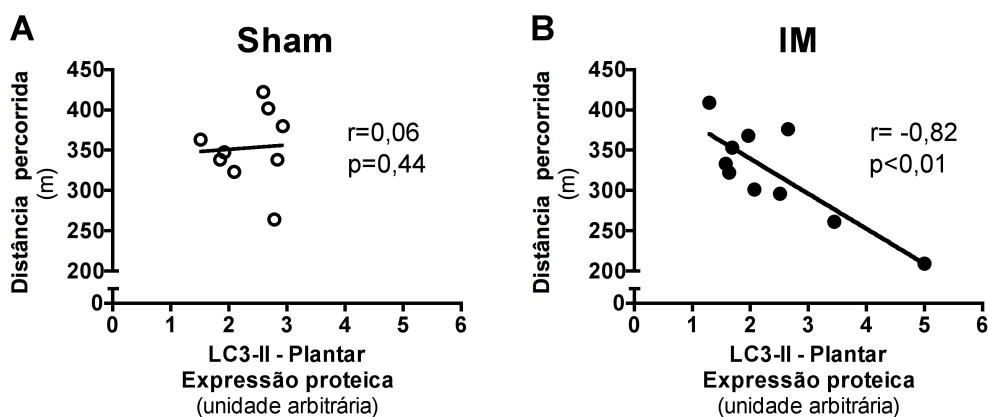
Anexo A – Correlação entre a expressão gênica de *CTSL1* e área de secção transversa (AST) das fibras musculares do sóleo. Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$.



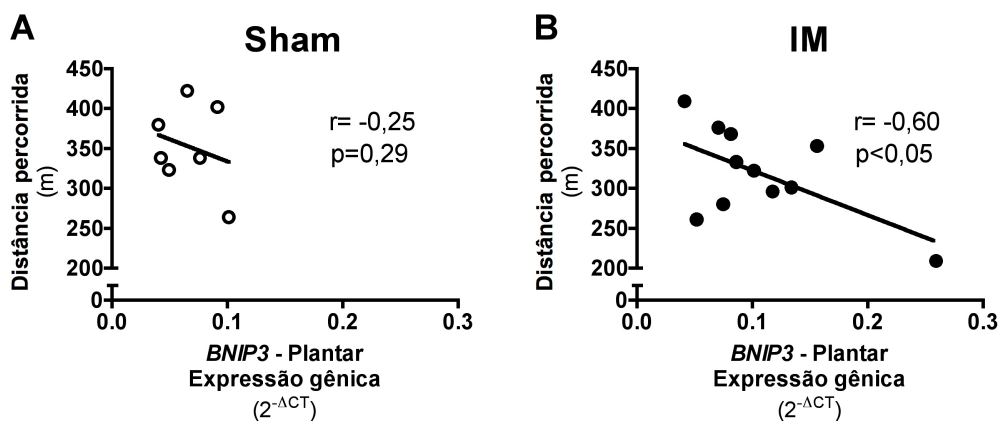
Anexo B – Expressão gênica de *PGC-1α* nos músculos sóleo e plantar de animais Sham e infartados (IM). O número de animais utilizado em cada análise está apresentado dentro das barras. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise estatística foi utilizada análise de variância para dois caminhos. * representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os músculos.



Anexo C – Correlações entre a concentração hidróperóxidos lipídicos e expressão proteica de Bnip3 no plantar de animais Sham (A) e infartados (IM) (B). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$.



Anexo D – Correlações entre a expressão proteica de LC3-II no plantar e distância percorrida em teste incremental máximo de animais Sham (A) e infartados (IM) (B). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$.



Anexo E – Correlações entre a expressão gênica de *BNIP3* no plantar e distância percorrida em teste incremental máximo de animais Sham (A) e infartados (IM) (B). Para análise estatística foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com um nível de significância de $p \leq 0,05$.

9 REFERÊNCIAS

Abraham WT, Fisher WG, Smith AL, Delurgio DB, Leon AR, Loh E, et al. Cardiac resynchronization in chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2002;346(24):1845-53.

Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest*. 2004;114(3):370-8.

Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, et al. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet*. 1997;349(9058):1050-3.

Anker SD, Sharma R. The syndrome of cardiac cachexia. *Int J Cardiol*. 2002;85(1):51-66.

Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, et al. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol*. 2010;20(2):143-8.

Bacurau AV, Jardim MA, Ferreira JC, Bechara LR, Bueno CR, Jr., Alba-Loureiro TC, et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol*. 2009;106(5):1631-40.

Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 2008;319(5865):916-9.

Bechara LRG. *Contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular de ratos infartados: influência do treinamento físico aeróbico* [Tese]. São Paulo: Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo; 2012.

Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(10):2098-114.

Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature*. 2010;466(7302):68-76.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294(5547):1704-8.

Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech*. 2013;6(1):25-39.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25(5):563-75.

Brooke MH, Kaiser KK. Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem*. 1970;18(9):670-2.

Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol*. 1978;45(6):1009-15.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857-68.

Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med*. 2013;368(7):651-62.

Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(1):79-87.

Clark AL, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Exercise limitation in chronic heart failure: central role of the periphery. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(5):1092-102.

Coats AJ, Clark AL, Piepoli M, Volterrani M, Poole-Wilson PA. Symptoms and quality of life in heart failure: the muscle hypothesis. *Br Heart J*. 1994;72(2 Suppl):S36-9.

Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol*. 2009;185(6):1083-95.

Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1984;311(13):819-23.

Colucci WS. The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure. *Clin Cardiol*. 1998;21(12 Suppl 1):I20-4.

Cooksey JD, Reilly P, Brown S, Bomze H, Cryer PE. Exercise training and plasma catecholamines in patients with ischemic heart disease. *Am J Cardiol*. 1978;42(3):372-6.

Crimi E, Ignarro LJ, Cacciatore F, Napoli C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(4):292-300.

Cuervo AM. The plasma membrane brings autophagosomes to life. *Nat Cell Biol*. 2010;12(8):735-7.

Cunha TF, Bacurau AV, Moreira JB, Paixao NA, Campos JC, Ferreira JC, et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *Plos One*. 2012;7(8):e41701.

Dalla Libera L, Sabbadini R, Renken C, Ravara B, Sandri M, Betto R, et al. Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(10):1871-8.

De Duve C. The lysosome. *Sci Am*. 1963;208:64-72.

Deval C, Mordier S, Obled C, Bechet D, Combaret L, Attaix D, et al. Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *Biochem J*. 2001;360(Pt 1):143-50.

Drexler H, Banhardt U, Meinertz T, Wollschlager H, Lehmann M, Just H. Contrasting peripheral short-term and long-term effects of converting enzyme inhibition in patients with congestive heart failure. A double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation*. 1989;79(3):491-502.

Drexler H, Riede U, Munzel T, Konig H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation*. 1992;85(5):1751-9.

Duscha BD, Kraus WE, Keteyian SJ, Sullivan MJ, Green HJ, Schachat FH, et al. Capillary density of skeletal muscle: a contributing mechanism for exercise intolerance in class II-III chronic heart failure independent of other peripheral alterations. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(7):1956-63.

Duscha BD, Schulze PC, Robbins JL, Forman DE. Implications of chronic heart failure on peripheral vasculature and skeletal muscle before and after exercise training. *Heart Fail Rev*. 2008;13(1):21-37.

Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*. 2013;17(2):162-84.

Esler M, Kaye D. Measurement of sympathetic nervous system activity in heart failure: the role of norepinephrine kinetics. *Heart Fail Rev*. 2000;5(1):17-25.

Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. 2008;27(6):793-9.

Ferreira JC, Brum PC, Mochly-Rosen D. betaIIIPKC and epsilonPKC isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(4):479-84.

Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(8):760-5.

Fink LI, Wilson JR, Ferraro N. Exercise ventilation and pulmonary artery wedge pressure in chronic stable congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 1986;57(4):249-53.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol.* 1978;90(1):57-70.

Franciosa JA, Park M, Levine TB. Lack of correlation between exercise capacity and indexes of resting left ventricular performance in heart failure. *Am J Cardiol.* 1981;47(1):33-9.

Fulster S, Tacke M, Sandek A, Ebner N, Tschope C, Doehner W, et al. Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). *Eur Heart J.* 2013;34(7):512-9.

Gielen S, Adams V, Mobius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, et al. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(5):861-8.

Glass DJ. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(3):225-9.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2013;127(1):e6-e245.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(25):14440-5.

Gordon A, Voipio-Pulkki LM. Crosstalk of the heart and periphery: skeletal and cardiac muscle as therapeutic targets in heart failure. *Ann Med.* 1997;29(4):327-31.

Hambrecht R, Fiehn E, Yu J, Niebauer J, Weigl C, Hilbrich L, et al. Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(5):1067-73.

Hanada T, Ohsumi Y. Structure-function relationship of Atg12, a ubiquitin-like modifier essential for autophagy. *Autophagy*. 2005;1(2):110-8.

Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, et al. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(7):1758-64.

Heart Failure Society Of America. Conceptualization and working definition of heart failure. *J Card Fail*. 2006;12(1):e10-1.

Hollriegel R, Beck EB, Linke A, Adams V, Mobius-Winkler S, Mangner N, et al. Anabolic effects of exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb): Impact on ubiquitin-protein ligases expression and skeletal muscle size. *Int J Cardiol*. 2012

Hood DA, Irrcher I, Ljubcic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol*. 2006;209(Pt 12):2265-75.

Huang J, Forsberg NE. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12100-5.

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, 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*. 2005;112(12):e154-235.

Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*. 2000;408(6811):488-92.

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C834-43.

Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(3):133-9.

Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 1954;140(5):675-82.

Jondeau G, Katz SD, Zohman L, Goldberger M, McCarthy M, Bourdarias JP, et al. Active skeletal muscle mass and cardiopulmonary reserve. Failure to attain peak aerobic capacity during maximal bicycle exercise in patients with severe congestive heart failure. *Circulation*. 1992;86(5):1351-6.

Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 13):2805-12.

Karagounis LG, Hawley JA. Skeletal muscle: increasing the size of the locomotor cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(9):1376-9.

King D, Smith ML, Chapman TJ, Stockdale HR, Lye M. Fat malabsorption in elderly patients with cardiac cachexia. *Age Ageing.* 1996;25(2):144-9.

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 2012;8(4):445-544.

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003;5(4):539-45.

Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* 2010;584(7):1393-8.

Krum H, Abraham WT. Heart failure. *Lancet.* 2009;373(9667):941-55.

Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 2004;432(7020):1032-6.

Kung T, Szabo T, Springer J, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. Cachexia in heart disease: highlights from the ESC 2010. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2011;2(1):63-9.

Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004;18(1):39-51.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.

Li P, Waters RE, Redfern SI, Zhang M, Mao L, Annex BH, et al. Oxidative phenotype protects myofibers from pathological insults induced by chronic heart failure in mice. *Am J Pathol.* 2007;170(2):599-608.

Lipkin DP, Jones DA, Round JM, Poole-Wilson PA. Abnormalities of skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol.* 1988;18(2):187-95.

Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J.* 2013

Lokireddy S, Wijesoma IW, Teng S, Bonala S, Gluckman PD, McFarlane C, et al. The ubiquitin ligase Mul1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. *Cell Metab.* 2012;16(5):613-24.

Lopez-Jaramillo P. Defining the research priorities to fight the burden of cardiovascular diseases in Latin America. *J Hypertens.* 2008;26(9):1886-9.

Lucas C, Johnson W, Hamilton MA, Fonarow GC, Woo MA, Flavell CM, et al. Freedom from congestion predicts good survival despite previous class IV symptoms of heart failure. *Am Heart J.* 2000;140(6):840-7.

Lunde PK, Sjaastad I, Schiotz Thorud HM, Sejersted OM. Skeletal muscle disorders in heart failure. *Acta Physiol Scand.* 2001;171(3):277-94.

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 2007;6(6):458-71.

Mancini DM, Coyle E, Coggan A, Beltz J, Ferraro N, Montain S, et al. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 1989;80(5):1338-46.

Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation.* 1992;85(4):1364-73.

Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.* 2009;10(6):507-15.

Maskin CS, Forman R, Sonnenblick EH, Frishman WH, LeJemtel TH. Failure of dobutamine to increase exercise capacity despite hemodynamic improvement in severe chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 1983;51(1):177-82.

Massie B, Conway M, Yonge R, Frostick S, Ledingham J, Sleight P, et al. Skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure: relation to clinical severity and blood flow. *Circulation.* 1987;76(5):1009-19.

Massie BM, Kramer B, Haughom F. Acute and long-term effects of vasodilator therapy on resting and exercise hemodynamics and exercise tolerance. *Circulation.* 1981;64(6):1218-26.

Massie BM, Simonini A, Sahgal P, Wells L, Dudley GA. Relation of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in men with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(1):140-5.

- McClung JM, Judge AR, Powers SK, Yan Z. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298(3):C542-9.
- Mettauer B, Zoll J, Sanchez H, Lampert E, Ribera F, Veksler V, et al. Oxidative capacity of skeletal muscle in heart failure patients versus sedentary or active control subjects. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(4):947-54.
- Middlekauff HR. Making the case for skeletal myopathy as the major limitation of exercise capacity in heart failure. *Circ Heart Fail*. 2010;3(4):537-46.
- Minnaard R, Drost MR, Wagenmakers AJ, van Kranenburg GP, Kuipers H, Hesselink MK. Skeletal Muscle wasting and contractile performance in septic rats. *Muscle Nerve*. 2005;31(3):339-48.
- Minotti JR, Pillay P, Oka R, Wells L, Christoph I, Massie BM. Skeletal muscle size: relationship to muscle function in heart failure. *J Appl Physiol*. 1993;75(1):373-81.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 2004;15(3):1101-11.
- Moreira JB, Bechara LR, Bozi LH, Jannig PR, Monteiro AW, Dourado PM, et al. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol*. 2013;114(8):1029-41.
- Nader GA. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(10):1985-96.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem*. 1994;220(2):403-9.
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep*. 2010;11(1):45-51.
- O'Leary MF, Hood DA. Denervation-induced oxidative stress and autophagy signaling in muscle. *Autophagy*. 2009;5(2):230-1.

O'Leary MF, Vainshtein A, Iqbal S, Ostojic O, Hood DA. Adaptive plasticity of autophagic proteins to denervation in aging skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(5):C422-30.

Ogata T, Oishi Y, Higuchi M, Muraoka I. Fasting-related autophagic response in slow- and fast-twitch skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(1):136-40.

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24131-45.

Picard MH, Adams D, Bierig SM, Dent JM, Douglas PS, Gillam LD, et al. American Society of Echocardiography recommendations for quality echocardiography laboratory operations. *J Am Soc Echocardiogr*. 2011;24(1):1-10.

Pina IL, Apstein CS, Balady GJ, Belardinelli R, Chaitman BR, Duscha BD, et al. Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. *Circulation*. 2003;107(8):1210-25.

Quinones MA, Gaasch WH, Alexander JK. Influence of acute changes in preload, afterload, contractile state and heart rate on ejection and isovolumic indices of myocardial contractility in man. *Circulation*. 1976;53(2):293-302.

Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J*. 2010;29(10):1774-85.

Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*. 2010;401(2):318-20.

Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*. 2008;4(4):510-2.

Sandek A, Bauditz J, Swidsinski A, Buhner S, Weber-Eibel J, von Haehling S, et al. Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(16):1561-9.

Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23:160-70.

Sandri M. Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298(6):C1291-7.

Sandri M. New findings of lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(3):223-9.

Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(44):16260-5.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;117(3):399-412.

Savin WM, Haskell WL, Schroeder JS, Stinson EB. Cardiorespiratory responses of cardiac transplant patients to graded, symptom-limited exercise. *Circulation*. 1980;62(1):55-60.

Schaufelberger M, Drexler H, Schieffer E, Swedberg K. Angiotensin-converting enzyme gene expression in skeletal muscle in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*. 1998;4(3):185-91.

Schaufelberger M, Eriksson BO, Grimby G, Held P, Swedberg K. Skeletal muscle alterations in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1997;18(6):971-80.

Schulze PC, Gielen S, Adams V, Linke A, Mobius-Winkler S, Erbs S, et al. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2003;98(4):267-74.

Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, et al. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep*. 2012;2:1002.

Simonini A, Long CS, Dudley GA, Yue P, McElhinny J, Massie BM. Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circ Res*. 1996;79(1):128-36.

Sinoway LI, Li J. A perspective on the muscle reflex: implications for congestive heart failure. *J Appl Physiol*. 2005;99(1):5-22.

Sinoway LI, Minotti JR, Davis D, Pennock JL, Burg JE, Musch TI, et al. Delayed reversal of impaired vasodilation in congestive heart failure after heart transplantation. *Am J Cardiol*. 1988;61(13):1076-9.

Solomon V, Goldberg AL. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem*. 1996;271(43):26690-7.

Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced

ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 2004;14(3):395-403.

Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation*. 1990;81(2):518-27.

Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity. *Circulation*. 1991;84(4):1597-607.

Sullivan MJ, Knight JD, Higginbotham MB, Cobb FR. Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. Muscle blood flow is reduced with maintenance of arterial perfusion pressure. *Circulation*. 1989;80(4):769-81.

Suzuki K, Ohsumi Y. Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett*. 2010;584(7):1280-6.

Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem*. 2001;276(3):1701-6.

Tassa A, Roux MP, Attaix D, Bechet DM. Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J*. 2003;376(Pt 3):577-86.

Thomas RL, Kubli DA, Gustafsson AB. Bnip3-mediated defects in oxidative phosphorylation promote mitophagy. *Autophagy*. 2011;7(7):775-7.

Thompson MG, Palmer RM. Signalling pathways regulating protein turnover in skeletal muscle. *Cell Signal*. 1998;10(1):1-11.

Thygesen K, Alpert JS, White HD, Jaffe AS, Apple FS, Galvani M, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2007;116(22):2634-53.

Toth MJ, Ward K, van der Velden J, Miller MS, Vanburen P, Lewinter MM, et al. Chronic heart failure reduces Akt phosphorylation in human skeletal muscle: relationship to muscle size and function. *J Appl Physiol*. 2011;110(4):892-900.

Troosters T, Gosselink R, Decramer M. Chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: two muscle diseases? *J Cardiopulm Rehabil*. 2004;24(3):137-45.

Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Tsutsui T, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist decreases plasma levels of tumor

necrosis factor alpha, interleukin-6 and soluble adhesion molecules in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):714-21.

Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J, et al. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation*. 2001;104(2):134-6.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(6):H2181-90.

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*. 2008;27(2):433-46.

Ventura-Clapier R, De Sousa E, Veksler V. Metabolic myopathy in heart failure. *News Physiol Sci*. 2002;17:191-6.

Vescovo G, Serafini F, Facchin L, Tenderini P, Carraro U, Dalla Libera L, et al. Specific changes in skeletal muscle myosin heavy chain composition in cardiac failure: differences compared with disuse atrophy as assessed on microbiopsies by high resolution electrophoresis. *Heart*. 1996;76(4):337-43.

Volterrani M, Clark AL, Ludman PF, Swan JW, Adamopoulos S, Piepoli M, et al. Predictors of exercise capacity in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1994;15(6):801-9.

Vyas DR, Spangenburg EE, Abraha TW, Childs TE, Booth FW. GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(2):C545-51.

Wang X, Proud CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:362-9.

Wang ZV, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in hypertensive heart disease. *J Biol Chem*. 2010;285(12):8509-14.

Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83(6):1849-65.

Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*. 2010;29(11):1792-802.

Witte KK, Clark AL. Why does chronic heart failure cause breathlessness and fatigue? *Prog Cardiovasc Dis*. 2007;49(5):366-84.

World Health Organization. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. Mendes S, Puska P, Norrving B, editors. Geneva: World Health Organization; 2011.

Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1102-9.

Yoshida T, Semprun-Prieto L, Sukhanov S, Delafontaine P. IGF-1 prevents ANG II-induced skeletal muscle atrophy via Akt- and Foxo-dependent inhibition of the ubiquitin ligase atrogin-1 expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(5):H1565-70.

Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):9-14.

Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012;337(6098):1062-5.

Yu Z, Li P, Zhang M, Hannink M, Stamler JS, Yan Z. Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli. *Plos One.* 2008;3(5):e2086.

Zannad F, Stough WG, Pitt B, Cleland JG, Adams KF, Geller NL, et al. Heart failure as an endpoint in heart failure and non-heart failure cardiovascular clinical trials: the need for a consensus definition. *Eur Heart J.* 2008;29(3):413-21.

Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab.* 2007;6(6):472-83.

Zhao J, Brault JJ, Schild A, Goldberg AL. Coordinate activation of autophagy and the proteasome pathway by FoxO transcription factor. *Autophagy.* 2008;4(3):378-80.

Apêndices

Sham								
N	FS, %	DSFVE, mm	DDFVE, mm	SIVS, mm	SIVD, mm	PPVES, mm	PPVED, mm	FC, bpm
1	45	4.83	8.77	1.65	0.89	2.42	1.27	207
2	37	5.34	8.52	1.91	0.89	2.03	1.40	240
3	31	6.61	9.53	1.91	1.40	2.67	1.78	207
4	46	4.45	8.26	1.91	1.20	2.29	1.02	222
5	36	4.96	7.75	2.03	1.40	2.67	1.14	273
6	38	4.19	6.74	2.29	1.14	2.54	1.53	300
7	40	4.19	6.99	1.53	1.14	2.16	1.40	273
8	44	3.81	6.86	1.53	1.14	2.29	0.89	286
9	40	5.34	8.90	1.27	0.89	2.42	1.53	240
MÉDIA	39.7	4.86	8.04	1.78	1.12	2.39	1.33	250
DPM	5.0	0.84	1.00	0.31	0.20	0.22	0.28	34
EPM	1.7	0.28	0.33	0.10	0.07	0.07	0.09	11

IM								
N	FS, %	DSFVE, mm	DDFVE, mm	SIVS, mm	SIVD, mm	PPVES, mm	PPVED, mm	FC, bpm
N	29	5.36	7.50	1.65	1.02	2.42	1.14	222
1	25	7.11	9.53	1.14	0.89	3.05	1.27	222
2	26	5.36	7.25	2.03	1.27	2.54	1.40	261
3	38	5.65	9.15	2.42	0.76	3.18	1.53	231
4	30	6.09	8.64	1.78	0.89	3.18	1.65	333
5	6	9.57	10.20	1.40	1.02	2.03	1.27	231
6	13	8.70	10.00	1.40	1.14	2.29	1.14	231
7	21	5.51	6.98	1.65	1.14	2.03	1.27	286
8	32	5.07	7.50	1.91	0.89	2.92	1.27	286
9	18	8.40	10.30	1.40	0.89	2.67	1.40	240
10	32	5.21	7.63	1.65	1.14	2.42	1.65	316
11	23	6.74	8.77	1.65	1.02	2.42	1.78	231
12	24	6.48	8.52	1.91	1.14	2.16	1.14	261
MÉDIA	24.4	6.56	8.61	1.69	1.02	2.56	1.38	258
DPM	8.5	1.48	1.17	0.33	0.15	0.41	0.21	37
EPM	2.4	0.41	0.32	0.09	0.04	0.11	0.06	10

Apêndice 1 – Dados individuais de Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FE), 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 em anestesia (FC) dos animais Sham e infartado (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

N	Sham	IM
1	420	356
2	445	420
3	470	469
4	504	430
5	481	448
6	415	413
7	504	444
8	548	428
9	442	451
10	436	407
11	373	401
12	396	479
13	347	386
14	404	
MÉDIA	442	426
DPM	55	34
EPM	15	9

Apêndice 2 – Dados individuais de massa corporal dos animais Sham e infartado (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham				
N	Massa cardíaca, mg	Massa cardíaca/MC, mg/g	Massa cardíaca/tíbia, mg/mm	Diâmetro de cardiomiócito, μm
1	1380	3.29	32.86	14.17
2	1376	3.09	32.22	13.63
3	1501	2.98	28.58	12.67
4	1156	2.79	29.81	14.20
5	1312	2.60	31.90	14.76
6	1400	2.56	26.11	15.69
7	1110	2.51	28.19	
8	1207	2.77	25.03	
9	1071	2.87	26.23	
10	1062	2.68	24.92	
11	980	2.82	27.00	
12	1104	2.73		
MÉDIA	1222	2.81	28.44	14.19
DPM	166	0.23	2.90	1.02
EPM	48	0.06	0.87	0.42

IM				
N	Massa cardíaca, mg	Massa cardíaca/MC, mg/g	Massa cardíaca/tíbia, mg/mm	Diâmetro de cardiomiócito, μm
1	1021.6	2.87	25.60	14.49
2	1417.5	3.02	35.22	15.37
3	1261.4	2.93	30.51	14.81
4	1242.0	3.39	30.04	14.98
5	1519.9	3.06	35.18	15.51
6	1263.9	3.16	30.68	14.60
7	1404.0	3.23	33.07	
8	1317.0	2.89	30.81	
9	1160.4	3.34	28.51	
10	1597	3.12	38.86	
11	1202.8		30.37	
MÉDIA	1310	3.10	31.71	14.96
DPM	165	0.18	3.64	0.41
EPM	50	0.06	1.10	0.17

Apêndice 3 – Dados individuais de massa cardíaca, massa cardíaca corrigida pela massa corporal (MC), massa cardíaca corrigida pelo comprimento da tíbia e diâmetro de cardiomiócitos dos animais Sham e infartado (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham				
N	Pulmões, g	Fígado, g	Pulmões, úmido:seco	Fígado, úmido:seco
1	1.63	3.18	4.38	2.95
2	2.40	2.53	4.46	2.89
3	2.43	3.52	4.50	2.96
4	2.52	3.74	4.23	2.94
5	2.33	5.05	4.65	2.93
6	3.01	3.49	4.47	2.94
7	2.05	3.73	4.55	2.83
8	1.82	3.80	4.53	2.90
9	1.87		4.07	
10	1.29		4.47	
11	1.77		3.92	
MÉDIA	2.10	3.63	4.39	2.92
DPM	0.49	0.71	0.22	0.04
EPM	0.15	0.25	0.07	0.02

IM				
N	Pulmões, g	Fígado, g	Pulmões, úmido:seco	Fígado, úmido:seco
1	1.80	2.90	4.10	2.93
2	2.30	4.12	4.59	2.91
3	2.41	4.44	4.86	2.98
4	2.37	2.53	4.91	2.90
5	2.03	3.34	4.30	2.89
6	2.40	3.60	4.73	2.96
7	2.58	3.50	5.17	2.88
8	1.82	3.60	4.74	2.93
9	2.14		4.57	
10	1.95		4.73	
11	1.55		4.29	
MÉDIA	2.12	3.50	4.64	2.92
DPM	0.32	0.61	0.31	0.03
EPM	0.10	0.22	0.09	0.01

Apêndice 4 – Dados individuais de massa dos pulmões e fígado e razão massa úmida : massa seca dos tecidos dos animais Sham e infartados (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

N	Sham	IM
1	323	409
2	264	322
3	422	368
4	363	353
5	338	301
6	338	333
7	380	209
8	402	296
9	347	376
10	406	261
11	406	280
12	423	250
13		279
14		273
MÉDIA	368	308
DPM	48	55
EPM	14	15

Apêndice 5 – Dados individuais de distância percorrida em teste incremental máximo em esteira rolante dos animais Sham e infartados (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham						
N	Massa Sóleo, mg	Massa Sóleo/MC, mg/g	Massa Sóleo/tíbia, mg/mm	Massa Plantar, mg	Massa Plantar/MC, mg/g	Massa Plantar/tíbia, mg/mm
1	239	0.57	5.69	448	1.07	10.67
2	236	0.53	5.53	434	0.97	10.15
3	258	0.51	6.20	452	0.90	12.93
4	240	0.50	7.14	432	0.90	14.90
5	273	0.54	5.29	569	1.13	10.13
6	314	0.57	6.40	654	1.19	10.57
7	225	0.51	4.86	431	0.97	8.17
8	274	0.63	4.47	452	1.04	9.80
9	208	0.56	4.24	350	0.94	8.53
10	181	0.46	5.46	397	1.00	9.35
11	167	0.48		335	0.97	
12	223	0.55		382	0.95	
MÉDIA	238	0.53	5.53	450	1.01	11.08
DPM	42	0.05	0.94	91	0.09	2.19
EPM	13	0.01	0.31	27	0.03	0.83

IM						
N	Massa Sóleo, mg	Massa Sóleo/MC, mg/g	Massa Sóleo/tíbia, mg/mm	Massa Plantar, mg	Massa Plantar/MC, mg/g	Massa Plantar/tíbia, mg/mm
1	221	0.62	5.54	354	1.00	8.87
2	218	0.52	4.60	421	1.00	9.87
3	185	0.39	4.44	397	0.85	9.50
4	184	0.43	5.45	393	0.91	6.93
5	225	0.44	4.56	286	0.91	9.41
6	197	0.42	4.17	406	1.02	10.19
7	172	0.54	5.68	420	0.91	9.52
8	241	0.57	4.72	404	0.80	10.65
9	245	0.46	4.92	344	0.92	9.08
10	206	0.49	6.23	415	1.12	10.94
11	202	0.50	4.72	455	0.92	8.97
12	200	0.53		369	0.94	
13	256	0.48		450	0.92	
14	187			355		
MÉDIA	209	0.49	4.92	391	0.94	9.13
DPM	24	0.07	0.61	46	0.09	1.17
EPM	7	0.02	0.23	14	0.03	0.48

Apêndice 6 – Dados individuais de massa total dos músculos sóleo e plantar, e corrigidas pela massa corporal (MC) e pelo comprimento da tíbia dos animais Sham e infartados (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham					
N	Área de secção transversa			Distribuição	
	Tipo I, μm^2	Tipo II, μm^2	Total, μm^2	Tipo I, %	Tipo II, %
1	4886	4033	4460	65	35
2	8986	8669	8827	81	19
3	5981	4910	5446	63	37
4	9966	7592	8779	78	22
5	9216	8645	8930	79	21
6	5071	4501	4786	88	12
7	5500	4305	4902	82	18
MÉDIA	7087	6093	6590	76	24
DP	2201	2112	2130	10	10
EPM	832	798	805	4	4

IM					
N	Área de secção transversa			Distribuição	
	Tipo I, μm^2	Tipo II, μm^2	Total, μm^2	Tipo I, %	Tipo II, %
1	3361.1	2750.8	3056	65	35
2	5361.0	3463.4	4412	76	24
3	3949.1	4320.6	4135	84	16
4	4508.6	4933.7	4721	64	36
5	4579.0	4976.6	4778	70	30
MÉDIA	4352	4089	4220	72	28
DPM	748	967	700	8	8
EPM	335	432	313	4	4

Apêndice 7 – Dados individuais de área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, tipo II e total e distribuição dos tipos de fibras do músculo sóleo dos animais Sham e infartados (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham					
N	Área de secção transversa			Distribuição	
	Tipo I, μm^2	Tipo II, μm^2	Total, μm^2	Tipo I, %	Tipo II, %
1	2258	5069	3664	14	86
2	2214	3862	3038	9	91
3	3210	3652	3431	13	87
4	3880	4656	4268	14	86
5	4658	7780	6219	14	86
6	2187	3680	2933	10	90
MÉDIA	3068	4783	3926	12	88
DPM	1036	1576	1222	2	2
EPM	423	644	499	1	1

IM					
N	Área de secção transversa			Distribuição	
	Tipo I, μm^2	Tipo II, μm^2	Total, μm^2	Tipo I, %	Tipo II, %
1	2137	2832	2484	12	88
2	2233	3381	2807	4	96
3	2222	3402	2812	8	92
4	2264	2970	2617	20	80
5	1839	3654	2746	4	96
6	2307	3187	2747	9	91
MÉDIA	2167	3238	2702	9	91
DPM	170	303	128	6	6
EPM	70	124	52	2	2

Apêndice 8 – Dados individuais de área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, tipo II e total e distribuição dos tipos de fibras do músculo plantar dos animais Sham e infartados (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham								
N	BECN1	ATG7	MAP1LC3B	GABARAPL1	ATG12	BNIP3	LAMP2	CTSL1
1	0.46	0.63	1.21	1.34	0.66	0.23	0.69	0.82
2	0.93	0.93	1.11	1.11	0.92	0.78	0.58	0.82
3	1.50	0.96	1.04	0.73	1.09	2.27	1.25	0.78
4	0.84	0.90	0.73	1.12	0.83	0.44	0.71	0.94
5	2.11	1.93	2.50	2.48	2.94	0.92	2.38	2.42
6	1.01	0.96	1.04	0.85	0.95	1.05	0.93	0.86
7	1.21	1.26	0.93	0.92	0.99	1.46	1.12	0.94
8	1.05	0.98	0.86	0.96	0.75	2.22	0.93	0.94
9	0.80	0.88	0.76	0.78	0.78	0.78	0.75	0.68
10	0.53	0.96	0.40	0.28	0.54	0.33	0.91	0.97
11	0.56	0.61	0.43	0.45	0.56	0.52	0.76	0.82
MÉDIA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DPM	0.48	0.35	0.56	0.57	0.67	0.71	0.50	0.48
EPM	0.15	0.11	0.17	0.17	0.20	0.21	0.15	0.14

IM								
N	BECN1	ATG7	MAP1LC3B	GABARAPL1	ATG12	BNIP3	LAMP2	CTSL1
1	0.62	0.46	0.73	0.93	0.57	0.73	0.96	0.86
2	0.65	0.38	0.78	1.27	0.65	0.78	0.56	0.51
3	0.49	0.51	0.72	1.16	0.58	0.72	0.66	0.68
4	1.25	1.15	0.85	0.69	0.77	0.85	1.13	0.95
5	0.75	0.52	0.97	1.23	0.66	0.97	0.84	0.84
6	0.88	1.03	0.88	0.76	0.80	0.88	0.91	0.78
7	1.33	1.22	1.05	0.69	1.17	1.05	1.26	0.90
8	1.39	1.60	1.30	0.85	1.25	1.30	1.39	1.20
9	1.11	1.16	1.44	1.36	1.12	1.44	0.94	0.91
10	1.06	0.77	0.85	0.69	0.62	0.85	1.05	0.60
MÉDIA	0.95	0.88	0.96	0.96	0.82	0.96	0.97	0.82
DPM	0.32	0.41	0.24	0.27	0.26	0.24	0.25	0.20
EPM	0.10	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06

Apêndice 9 – Dados individuais de expressão dos genes *BECN1*, *ATG7*, *MAP1LC3B*, *GABARAPL1*, *ATG12*, *BNIP3*, *LAMP2* e *CTSL1* no músculo sóleo dos animais Sham e infartados (IM). Resultados corrigidos pelo grupo Sham. DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham								
N	<i>BECN1</i>	<i>ATG7</i>	<i>MAP1LC3B</i>	<i>GABARAPL1</i>	<i>ATG12</i>	<i>BNIP3</i>	<i>LAMP2</i>	<i>CTSL1</i>
1	0.46	0.50	0.76	0.72	0.98	0.80	0.55	0.72
2	1.55	0.49	1.04	1.18	1.26	1.64	1.08	1.11
3	0.82	1.09	1.13	1.45	0.68	1.05	0.80	0.83
4	2.12	1.77	1.24	0.76	1.21	0.69	1.77	1.43
5	0.51	0.66	0.67	0.71	1.25	1.23	0.61	0.63
6	1.32	1.06	0.84	0.65	0.72	0.87	0.94	0.78
7	0.73	1.01	1.18	1.39	0.76	0.81	1.06	1.11
8	0.51	1.01	0.93	1.22	1.01	0.78	1.02	0.85
9	0.80	0.90	1.04	0.74	1.13	0.65	0.98	1.15
10	0.89	1.15	1.04	1.44		1.48	1.17	1.54
11	1.29	1.36	1.13	0.74			1.02	0.85
MÉDIA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DPM	0.52	0.37	0.18	0.33	0.23	0.34	0.32	0.30
EPM	0.16	0.11	0.05	0.10	0.08	0.11	0.10	0.09

IM								
N	<i>BECN1</i>	<i>ATG7</i>	<i>MAP1LC3B</i>	<i>GABARAPL1</i>	<i>ATG12</i>	<i>BNIP3</i>	<i>LAMP2</i>	<i>CTSL1</i>
1	0.78	1.29	0.98	1.48	0.83	0.67	1.12	1.05
2	1.21	0.78	0.94	1.46	0.99	1.64	1.24	1.17
3	1.63	1.20	1.09	1.01	1.47	1.32	1.88	1.61
4	1.94	1.44	0.96	0.95	1.32	2.53	1.62	1.59
5	1.84	1.37	1.10	1.11	1.13	2.17	1.41	1.19
6	0.73	1.04	1.28	2.64	0.87	1.39	1.06	1.34
7	1.78	1.44	1.40	1.55	1.55	4.19	1.97	1.54
8	1.93	3.32	1.02	0.77	1.55	1.90	1.72	1.29
9	0.79	2.98	1.71	2.11	1.06	1.14	0.99	1.31
10	0.53	2.90	0.89	1.79	0.74	0.84	0.62	0.90
11	0.75	1.17	0.87	1.38	0.92	1.21	1.33	1.07
MÉDIA	1.27	1.72	1.11	1.48	1.13	1.73	1.36	1.28
DPM	0.56	0.89	0.26	0.55	0.30	0.99	0.41	0.23
EPM	0.17	0.27	0.08	0.16	0.09	0.30	0.12	0.07

Apêndice 10 – Dados individuais de expressão dos genes *BECN1*, *ATG7*, *MAP1LC3B*, *GABARAPL1*, *ATG12*, *BNIP3*, *LAMP2* e *CTSL1* no músculo plantar dos animais Sham e infartados (IM). Resultados corrigidos pelo grupo Sham. DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham							
N	LC3-I	LC3-II	LC3-II/LC3-I	Bnip3	Beclin-1	Atg7	Atg12-Atg5
1	1.01	0.89	0.99	0.73	1.00	1.21	1.40
2	0.93	1.19	1.42	0.84	1.09	1.12	1.59
3	0.93	1.11	1.32	1.10	0.92	1.06	1.23
4	0.80	0.65	0.90	0.70	0.64	1.42	1.01
5	1.03	1.21	1.30	1.28	0.92	0.93	0.81
6	1.16	0.79	0.76	0.63	1.49	0.90	1.30
7	1.02	1.09	0.95	1.35	0.84	0.70	0.63
8	0.92	0.43	0.41	1.31	0.99	0.83	1.02
9	0.90	1.41	1.39	0.79	0.88	0.98	0.78
10	1.14	1.25	0.97	1.39	1.22	0.97	0.90
11	1.16	1.14	0.87	0.89	1.01	1.26	0.74
12	1.01	0.82	0.72			0.61	0.58
MÉDIA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DPM	0.11	0.28	0.31	0.29	0.22	0.23	0.32
EPM	0.03	0.08	0.09	0.09	0.07	0.07	0.09

IM							
N	LC3-I	LC3-II	LC3-II/LC3-I	Bnip3	Beclin-1	Atg7	Atg12-Atg5
1	0.91	0.55	0.67	1.60	0.98	0.83	0.72
2	0.79	0.70	0.98	0.84	0.81	0.54	0.84
3	0.69	0.84	1.34	1.05	0.91	1.14	1.06
4	0.84	0.72	0.96	1.31	1.08	1.14	1.09
5	0.92	0.89	1.06	1.13	0.83	1.32	0.95
6	0.77	0.67	0.96	1.15	0.91	0.43	0.75
7	1.06	2.14	1.78	1.66	1.04	0.55	1.36
8	1.11	1.07	0.86	1.63	0.97	0.72	0.79
9	1.02	1.13	0.98	0.91	0.80	0.93	0.87
10	1.03	1.47	1.27	1.37	0.86	0.56	0.90
11	0.95	1.12	1.04	1.24	0.86	1.07	0.69
MÉDIA	0.92	1.03	1.08	1.26	0.91	0.84	0.91
DPM	0.13	0.45	0.29	0.28	0.09	0.30	0.20
EPM	0.04	0.14	0.09	0.09	0.03	0.09	0.06

Apêndice 11 – Dados individuais de expressão proteica de LC3-I, LC3-II, LC3II/LC3-I, Bnip3, Beclin1, Atg7 e Atg12-Atg5 no músculo plantar dos animais Sham e infartados (IM). Resultados corrigidos pelo grupo Sham. DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham							
N	p62	FoxO3a	pFoxO3a	pFoxO3a/ FoxO3a	Akt	pAkt	pAkt/Akt
1	0.84	1.08	0.95	0.84	1.18	0.57	0.48
2	1.04	1.62	1.38	0.81	1.22	0.76	0.62
3	1.04	1.18	0.81	0.66	0.84	0.93	1.11
4	0.87	0.99	0.74	0.71	0.70	0.71	1.01
5	1.47	1.21	1.09	0.86	0.58	0.49	0.84
6	1.47	0.74	0.92	1.17	0.93	0.89	0.96
7	0.88	0.98	0.71	0.69	0.80	1.17	1.46
8	0.64	0.80	1.06	1.26	1.09	0.79	0.72
9	1.03	0.90	1.36	1.43	1.14	1.23	1.07
10	0.68	1.00	0.89	0.85	1.14	1.19	1.03
11	1.15	0.85	1.07	1.20	1.19	1.88	1.57
12	0.89	0.65	1.03	1.51	1.21	1.38	1.13
MÉDIA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DPM	0.26	0.26	0.21	0.30	0.22	0.39	0.32
EPM	0.08	0.07	0.06	0.09	0.06	0.11	0.09

IM							
N	p62	FoxO3a	pFoxO3a	pFoxO3a/ FoxO3a	Akt	pAkt	pAkt/Akt
1	1.16	0.93	1.08	1.10	0.94	0.75	0.80
2	1.04	1.21	1.11	0.87	0.94	0.50	0.52
3	1.06	1.45	0.81	0.53	0.95	0.65	0.69
4	1.20	1.19	0.98	0.78	0.80	0.97	1.20
5	1.20	1.18	1.06	0.86	0.84	0.86	1.01
6	1.39	1.18	1.14	0.92	0.77	0.59	0.76
7	1.37	0.69	0.90	1.24	0.85	0.98	1.14
8	0.94	0.68	0.94	1.31	0.95	0.96	1.00
9	0.78	0.94	1.09	1.11	1.25	1.17	0.92
10	0.90	0.93	1.05	1.07	1.13	1.82	1.59
11	0.93				0.98	1.65	1.66
MÉDIA	1.09	1.04	1.02	0.98	0.95	0.99	1.03
DPM	0.20	0.25	0.10	0.23	0.14	0.42	0.36
EPM	0.06	0.08	0.03	0.07	0.04	0.13	0.11

Apêndice 12 – Dados individuais de expressão proteica de p62, FoxO3a, pFoxO3a (Thr32), pFoxO3a/FoxO3a, Akt, pAkt (Ser473) e pAkt/Akt no músculo plantar dos animais Sham e infartados (IM). Resultados corrigidos pelo grupo Sham. DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham						
N	mTOR	pmTOR	pmTOR/mTOR	Mfn1	Mfn2	OPA1
1	1.71	1.84	1.01	1.03	0.98	1.17
2	2.12	1.90	0.84	1.08	1.56	1.02
3	0.96	0.97	0.95	0.98	1.35	0.86
4	0.91	1.05	1.08	0.62	1.19	0.52
5	1.14	0.92	0.76	0.96	1.46	1.25
6	0.55	0.59	1.00	1.15	1.45	1.35
7	1.00	0.48	0.45	1.05	0.44	0.86
8	0.55	0.83	1.41	0.91	0.88	1.18
9	0.74	0.50	0.64	1.22	0.68	1.17
10	0.55	1.03	1.75	0.84	0.60	0.69
11	0.76	0.91	1.11	1.26	0.73	1.13
12				0.91	0.68	0.80
MÉDIA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
DPM	0.50	0.47	0.36	0.18	0.39	0.25
EPM	0.15	0.14	0.11	0.05	0.11	0.07

IM						
N	mTOR	pmTOR	pmTOR/mTOR	Mfn1	Mfn2	OPA1
1	1.10	0.97	0.82	1.17	1.00	1.58
2	3.29	1.09	0.31	0.89	0.86	0.67
3	1.47	1.48	0.95	1.10	1.55	0.92
4	2.62	1.26	0.45	1.09	1.58	0.90
5	1.18	1.30	1.03	0.94	1.38	1.20
6	1.46	0.94	0.60	0.98	0.84	1.24
7	2.30	1.69	0.69	1.21	0.24	1.28
8	1.00	0.56	0.53	1.07	0.49	0.73
9	0.85	1.04	1.14	0.88	0.64	0.79
10	0.55	0.82	1.41	1.07	0.60	0.90
11	0.77	0.54	0.65	1.01		0.80
MÉDIA	1.51	1.06	0.78	1.04	0.92	1.00
DPM	0.86	0.36	0.33	0.11	0.46	0.29
EPM	0.26	0.11	0.10	0.03	0.14	0.09

Apêndice 13 – Dados individuais de expressão proteica de mTOR, pmTOR (Ser2448), Mfn1, Mfn2 e OPA1 no músculo plantar dos animais Sham e infartados (IM). Resultados corrigidos pelo grupo Sham. DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham		
N	DRP1	Fis1
1	1.07	0.90
2	1.19	1.04
3	1.35	0.75
4	1.39	0.95
5	0.78	0.79
6	0.69	1.16
7	0.69	0.78
8	1.12	0.72
9	0.70	1.21
10	1.01	1.36
11	1.06	1.36
12	0.95	
MÉDIA	1.00	1.00
DPM	0.25	0.24
EPM	0.07	0.07

IM		
N	DRP1	Fis1
1	1.23	1.26
2	0.77	1.46
3	1.07	1.23
4	1.24	0.82
5	0.80	0.71
6	0.53	1.22
7	1.04	1.51
8	0.46	1.47
9	0.79	1.76
10	1.02	1.17
11	1.24	
MÉDIA	0.93	1.26
DPM	0.28	0.32
EPM	0.08	0.10

Apêndice 14 – Dados individuais de expressão proteica de DRP1 e Fis1 no músculo plantar dos animais Sham e infartados (IM). Resultados corrigidos pelo grupo Sham. DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.

Sham			
N	Atividade Catepsina L	Hidroperóxidos Lipídicos Totais	Proteínas Carboniladas
1	140	1.67	0.84
2	147	1.14	1.01
3	143	1.29	1.40
4	154	1.48	1.07
5	158	1.17	0.77
6	110	1.36	0.77
7	145	1.42	1.01
8	176	1.23	1.17
9	179	1.21	0.95
10	128	2.01	
11	121	1.36	
12	182	1.55	
13	125		
MÉDIA	146.77	1.41	1.00
DPM	22.76	0.25	0.20
EPM	6.31	0.07	0.07

IM			
N	Atividade Catepsina L	Hidroperóxidos Lipídicos Totais	Proteínas Carboniladas
1	182	2.01	1.07
2	179	1.72	0.89
3	177	1.61	0.99
4	158	1.73	0.99
5	150	1.71	1.03
6	148	1.63	0.68
7	155	2.74	0.86
8	135	3.38	0.92
9	151	1.41	1.35
10	186	1.90	
11		1.84	
MÉDIA	162.10	1.97	0.98
DPM	17.46	0.58	0.18
EPM	5.52	0.17	0.06

Apêndice 15 – Dados individuais de atividade da catepsina L (unidade de fluorescência), hidroperóxidos lipídicos totais (nmol/mg proteína) e expressão de proteínas carboniladas (corrigida pelo Sham) no músculo plantar dos animais Sham e infartados (IM). DPM, Desvio Padrão da Média. EPM, Erro Padrão da Média.