

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

MARCOS ELIEZECK DOS SANTOS INACIO

**A COMUNICAÇÃO ENTRE A INERVAÇÃO SIMPÁTICA E OS RECEPTORES
β-ADRENÉRGICOS CONTRIBUI PARA A HIPERTROFIA CARDÍACA PÓS-
NATAL**

Belo Horizonte, 2022

MARCOS ELIEZECK DOS SANTOS INACIO

**A COMUNICAÇÃO ENTRE A INERVAÇÃO SIMPÁTICA E OS RECEPTORES
β-ADRENÉRGICOS CONTRIBUI PARA A HIPERTROFIA CARDÍACA PÓS-
NATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de mestre.

Area de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Guatimosim

Coorientador: Dr. Itamar Couto Guedes de Jesus

Belo Horizonte, 2022

043

Inacio, Marcos Eliezeck dos Santos.

A comunicação entre a inervação simpática e os receptores β -adrenérgicos contribui para a hipertrofia cardíaca pós-natal [manuscrito] / Marcos Eliezeck dos Santos Inacio. – 2022.

61 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Guatimosim. Coorientador: Dr. Itamar Couto Guedes de Jesus.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Miócitos Cardíacos/inervação. 3. Cardiomegalia. 4. Receptores Adrenérgicos beta. I. Fonseca, Silvia Carolina Guatimosim. II. Jesus, Itamar Couto Guedes de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 553 DE MARCOS ELIEZECK DOS SANTOS INÁCIO

"A Comunicação Entre A Inervação Simpática e Os Receptores
β-Adrenérgicos Contribui Para A Hipertrofia Cardíaca Pós-natal"

MARCOS ELIEZECK DOS SANTOS INÁCIO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **08 de março de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes examinadores:

Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz, ICB/USP

Prof. Dr. Thassio Ricardo Ribeiro Mesquita, Cedars-Sinai Medical Center

Dr. Itamar Couto Guedes de Jesus, ICB/UFMG - Coorientador

Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca, ICB/UFMG - Orientadora

Belo Horizonte, 08 de março de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Itamar Couto Guedes de Jesus**, **Usuário Externo**, em 09/03/2022, às 09:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Placoná Diniz**, **Usuário Externo**, em 09/03/2022, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 11/03/2022, às 08:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thássio Ricardo Ribeiro Mesquita**, **Usuário Externo**, em 15/03/2022, às 23:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1287644** e o código CRC **4EA706FE**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO Nº 553 DE MARCOS ELIEZECK DOS SANTOS INÁCIO

Às 13:30 horas do dia **08 do mês de março de 2022**, transmitida pela plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Marcos Eliezeck dos Santos Inácio**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz**, ICB/Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Thássio Ricardo Ribeiro Mesquita**, Cedars-Sinai Medical Center, **Dr. Itamar Couto Guedes de Jesus**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, coorientador, e **Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**A Comunicação Entre A Inervação Simpática e Os Receptores β -Adrenérgicos Contribui Para A Hipertrofia Cardíaca Pós-natal**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 08 de março de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Itamar Couto Guedes de Jesus, Usuário Externo**, em 09/03/2022, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Placoná Diniz, Usuário Externo**, em 09/03/2022, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 11/03/2022, às 08:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thássio Ricardo Ribeiro Mesquita, Usuário Externo**, em 15/03/2022, às 23:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1287641** e o código CRC **42D22E36**.

AGRADECIMENTOS

O Desenvolvimento deste trabalho, só foi possível devido ao apoio e suporte de pessoas que estiveram comigo durante toda esta caminhada árdua e extenuante, primeiramente agradeço a **DEUS**, por me guiar e me acompanhar a cada dia. Gostaria também de agradecer e dedicar esta dissertação a pessoas que estiveram comigo e fizeram parte desta trajetória durante este período.

Primeiramente aos meus pais Deli Inácio e Regina Claudia e a minha avó, Carmelita, por me darem a vida, cuidarem de mim, me apoiarem em cada decisão tomada e por sempre serem meu suporte mais importante desde sempre. Jamais serei capaz de retribuir tudo o que fizeram por mim.

Aos meus tios, tias e irmãos, Ester, Gabriel e Sarah por contribuírem de todas as formas possíveis para que este dia chegasse. A Vivian, que me apoiou durante todo o processo e compreendeu minha ausência pelo tempo dedicado aos estudos.

A Dr.a Carla Jeane, que confiou no meu trabalho me colocando em contato com a prof.a Silvia Guatimosim, me inserindo assim no universo da ciência básica.

A prof.a Silvia Guatimosim, pela oportunidade de frequentar seu laboratório além de toda paciência, incentivo, disponibilidade, e inspiração, sem dúvidas a melhor pesquisadora/orientadora que eu tive a oportunidade de trabalhar.

Ao meu co-orientador Dr. Itamar, por toda a amizade, parceria, paciência, disponibilidade, ensinamentos e por todo conhecimento transmitido.

Aos amigos e colegas que o laboratório de Sinalização cardíaca me deu: Anderson, André, Bruno e Fernando. Aos demais membros do laboratório que contribuíram de forma direta e indireta neste trabalho.

Aos meus amigos de graduação Matheus e Maxwell por toda trajetória científica que construímos juntos.

RESUMO

A maturação cardíaca pode ser entendida como um conjunto de modificações na expressão gênica, no perfil metabólico e na estrutura da célula muscular cardíaca fetal, o cardiomiócito (CM), até que esta atinja um fenótipo adulto. Este processo maturacional, divide-se basicamente em períodos, que compreendem o pré, peri e pós-natal. A hipertrofia cardíaca (HC) corresponde a uma etapa importante do processo de maturação cardíaca, principalmente durante o período pós-natal, em que os CM utilizam deste processo para que ocorra um aumento do volume cardíaco, sendo a sinalização adrenérgica um sistema clássico envolvido na regulação do tamanho do CM. Apesar deste conhecimento, pouco se sabe acerca da contribuição da sinalização adrenérgica na regulação da hipertrofia cardíaca pós-natal. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi investigar o papel da inervação simpática sobre o processo de maturação cardíaca. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Comitê de Ética para o uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 29/2021). Foram utilizados nesse estudo 40 camundongos com idade entre 1 e 45 dias de ambos os sexos, da linhagem C57BL/6J selvagens e geneticamente modificados da linhagem FVB.129-Adrb2tm1Bkk/J (B2-KO) (Strain #031496) e Myh7^{tm1Unc} (MGI:3776012) (Myh7-YFP). Os protocolos experimentais envolveram tratamentos com 6-OHDA (100 mg/kg), Atenolol, propranolol, isoproterenol, formoterol ou dobutamina (5 mg/kg, via subcutânea). Corações coletados nos pontos P1 (um dia pós-nascimento), P11, P21 e P45 foram analisados por western-blot, imunofluorescência, microscopia confocal e HPLC-ED. A análise estatística foi realizada por meio do teste t-Student ou One-Way ANOVA. O primeiro passo foi caracterizar temporalmente a maturação da sinalização adrenérgica no coração de camundongos C57BL/6J. BDNF e NGF, neurotrofinas envolvidas no crescimento neuronal, apresentaram pico no coração no P1 e P45 respectivamente. A tirosina hidroxilase (TH) e a Monoamio-oxidase (MAO), enzimas envolvidas na síntese e degradação de noradrenalina (NE), respectivamente, apresentaram aumento gradativo na expressão desde P1 até P21, atingindo seu pico em P45. Da mesma forma, o conteúdo de NE cardíaco revelou um padrão semelhante. Assim pode-se concluir nesta etapa que a inervação simpática cardíaca sofre um processo de maturação no período pós-natal, com a identificação da NE e seus receptores em P21. Com isso em mente, promovemos a desnervação simpática pelo tratamento com 6-OHDA e avaliamos a HC em P21. O coração de camundongos tratados com 6-OHDA apresentou redução do peso cardíaco (PC) e da área dos CM em P21, sem impacto em outros aspectos da maturação cardíaca, como a contratilidade de CMs, formação de túbulos T, proliferação celular, ou regulação negativa do gene fetal. De forma interessante, o tratamento com 6-OHDA induziu uma redução na população de CMs tetranucleados quando comparados com o controle. Para confirmar o efeito da sinalização simpática no crescimento pós-natal do CM, realizou-se o bloqueio do receptor β -adrenérgico (β AR) em camundongos de P11 a P20. Similar ao observado com a 6-OHDA, o tratamento com propranolol induziu uma redução semelhante no PC e na área dos CMs. A participação dos receptores β 1AR e β 2AR na HC pós-natal, foi comprovada por meio do tratamento com 6-OHDA seguido de tratamento com isoproterenol (agonista β AR não seletivo), dobutamina ou formoterol, agonistas seletivos dos β 1AR e β 2AR, respectivamente. Em todas as condições supracitadas a estimulação adrenérgica foi capaz de prevenir o efeito da 6-OHDA na área do CM. Em conjunto os resultados mostram que a inervação simpática cardíaca sofre um processo de maturação no período pós-natal, com a identificação da NE e seus receptores em P21, sendo que a ativação de ambos os receptores β 1 e β 2 contribui para a indução da HC pós-natal, sem afetar de forma significativa outros parâmetros maturacionais. Em conjunto estes dados apotam a importância da inervação simpática para a maturação cardíaca.

PALAVRAS-CHAVE: Maturação cardíaca; Cardiomiócitos; Hipertrofia Cardíaca; Inervação Simpática e Sinalização adrenérgica.

ABSTRACT

Cardiac maturation can be understood as a set of changes in gene expression, metabolic profile and in the structure of the fetal cardiomyocyte (CM), until this cell reaches an adult phenotype. The maturation process is basically divided into periods, the pre, peri and post natal periods. Cardiac hypertrophy (CH) is an important step in the process of cardiac maturation, especially during the postnatal period, in which CMs use this process to increase in volume. Adrenergic signaling is a classic system involved in the regulation of hypertrophic cardiac growth. Despite this knowledge, little is known about the contribution of adrenergic signaling in the regulation of postnatal cardiac hypertrophy. Therefore, the main goal of this work was to investigate the role of sympathetic innervation on the cardiac maturation process. All experiments were performed according to the protocols established by the Ethics Committee for the use of animals at the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 29/2021). Forty mice aged between 1 and 45 days of both sexes were used in this study, and these included wild-type C57BL/6J, strain and genetically engineered FVB.129-Adrb2tm1Bkk/J (B2-KO) (Strain #031496) and Myh7^{tm1Unc} (MGI: 3776012) (Myh7-YFP) mice. Our experimental protocols included treatments with 6-OHDA (100 mg/kg), Atenolol, propranolol, isoproterenol, formoterol or dobutamine (5 mg/kg, subcutaneously). Hearts were collected at P1 (one day after birth), P11, P21 and P45, and used for western blot, immunofluorescence, confocal microscopy and HPLC-ED measurements. Statistical analysis was performed using the t-Student or One-Way ANOVA test. We first temporally characterized the maturation of adrenergic signaling in the heart of C57BL/6J mice. BDNF and NGF, neurotrophins involved in neuronal growth, peaked in the heart at P1 and P45 respectively. Tyrosine hydroxylase (TH) and Monoaminooxidase (MAO), enzymes involved in the synthesis and degradation of noradrenaline (NE), respectively, showed a gradual increase in the expression from P1 to P21, reaching its peak at P45. Likewise, cardiac NE content revealed a similar pattern. Thus, it can be concluded at this point that the cardiac sympathetic innervation undergoes a maturation process in the postnatal period, with the identification of NE and its receptors in P21. With this in mind, we promoted sympathetic denervation by 6-OHDA treatment and assessed CH at P21. 6-OHDA heart showed a reduction in cardiac weight (CW) and cardiomyocyte area at P21, with no impact on other aspects of cardiac maturation, such as cardiomyocyte contractility, T-tubule formation, cell proliferation or downregulation of fetal genes. Strikingly, 6-OHDA treatment induced a decrease in the tetranucleated CM population when compared to control. To further confirm the involvement of adrenergic signaling in the control of CM hypertrophy, we treated mice with the β -blocker, propranolol. Blockade of the β -adrenergic receptor (β AR) in mice from P11 to P20 induced a similar reduction in CW and cardiomyocyte area. The participation of postnatal β 1AR and β 2AR in CH was confirmed when the reduction in cardiomyocyte area promoted by 6-OHDA was prevented by treatment with isoproterenol (non-selective β AR agonist), dobutamine or formoterol, selective β 1AR and β 2AR agonists, respectively. In conclusion, our data show that cardiac sympathetic innervation undergoes a process of maturation in the postnatal period, with the identification of NE and its receptors in P21. Activation of both β 1 and β 2 receptors contributes to postnatal CH, reinforcing the importance of sympathetic innervation for cardiac maturation.

KEYWORDS: Cardiac maturation; Cardiomyocytes; Cardiac Hypertrophy; Sympathetic Innervation and Adrenergic Signaling

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características da maturação dos Cardiomiócitos.....	20
Figura 2. Origem e projeção da inervação simpática cardíaca.....	24
Figura 3. Comparativo morfoestrutural entre diferentes Cardiomiócitos isolados.....	29
Figura 4. Esquema experimental de tratamento farmacológico com 6-OHDA...31	
Figura 5. Esquema experimental de tratamento farmacológico com propranolol.....	32
Figura 6. Esquema experimental de tratamento farmacológico com Atenolol....	32
Figura 7. Esquema experimental de tratamento farmacológico com a 6-OHDA + Isoproterenol.....	33
Figura 8. Esquema experimental de tratamento farmacológico com a 6-OHDA + Formoterol.....	33
Figura 9. Esquema experimental de tratamento farmacológico com a 6-OHDA + Dobutamina.....	34
Figura 10. Desenvolvimento pós-nataldo coração.....	41
Figura 11. Desenvolvimento dos componentes envolvidos no acoplamento excitação-contração e na formação e manutenção dos túbulos-T.....	42
Figura 12. Expressão cardíaca de neurotrofinas BDNF e NGF.....	44
Figura 13. Desenvolvimento pós-natalda maquinaria de síntese e degradação de noradrenalina no coração.....	45
Figura 14. Desenvolvimento de componentes celulares da sinalização β -adrenérgica no tecido cardíaco.....	46
Figura 15. O tratamento com 6-OHDA reduz a expressão da TH no tecido cardíaco.....	48
Figura 16. A desnervação simpática não altera a expressão dos receptores β 1 e β 2 adrenérgicos no coração.....	48
Figura 17. A desnervação simpática não altera a presença de túbulos-t nos cardiomiócitos ventriculares.....	49
Figura 18. A desnervação simpática não altera a fração de encurtamento de cardiomiócitos ventriculares.....	51
Figura 19. A desnervação simpática não altera expressão de células YFP+ em animais MYH7.....	52
Figura 20. A desnervação simpática desacelera o crescimento cardíaco pós-natal.....	53

Figura 21. A desnervação simpática prejudica o crescimento de cardiomiócitos ventriculares.....	54
Figura 22. A desnervação simpática prejudica a fosforilação de proteínas pró-hipertróficas.....	55
Figura 23. O antagonismo dos receptores β -AR prejudica o crescimento cardíaco pós-natal.....	56
Figura 24. O antagonismo dos receptores β 1-AR e animais transgênicos β 2-KO apresentam prejuízo no crescimento cardíaco pós-natal.....	56
Figura 25. A estimulação β -adrenérgica reverte o remodelamento atrófico induzido pela 6-OHDA.....	58
Figura 26. A desnervação simpática afeta o processo de multinucleação dos cardiomiócitos ventriculares:.....	60
Figura 27. A desnervação simpática não altera o perfil proliferativo dos cardiomiócitos no 21 ^o dia de vida pós-natal.....	62
Figura 28. Mecanismo fenotípico e molecular sugerido por nossos achados...74	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg- Micrograma	Formot.- Formoterol
µL- Microlitro	G1- Fase do ciclo celular
6-OHDA- 6-hidroxidopamina	GSK3β- Glycogen synthase kinase 3 beta
a.u- Unidade arbitrária	H- Hora
AKT- Proteína Kinase B	HCN4- Hyperpolarization cyclic nucleotide 4
Ang II- Angiotensina 2	HEPES- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina -N-2-etanossulfônico
AT1- Receptor da Ang II	HPLC- Cromatografia Líquida de alta eficiência
ATP- Trifosfato de Adenosina	HSP90- Heat shock protein 90
AURKB- Gene Aurora Kinase B	Hz- Hertz
BDNF Brain Derived Neurotrophic Factor	i.p- Intraperitoneal
Ca²⁺- íon Cálcio	IF- Imunofluorescência
CaCl- Cloreto de Cálcio	IGF1- Fator de crescimento semelhante a insulina 1
CASZ1- Gene castor zinc finger 1	ISO- Isoproterenol
CAV-3- Caveolina 3	JPH2- Junctofilina
CCNB1- Gene Ciclina B1	KCl- Cloreto de Potássio
CDK1- Gene Cyclin-dependent kinase 1	Kda- Kilodaltons
CMs- Cardiomiócitos	Kg- Kilograma
CMs-hiPSCM- Cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas	Kir 2.2- Canais de potássio retificadores de entrada subtipo 2.2
CSQ- Calsaquestrina	Kir2.1- Canais de potássio retificadores de entrada subtipo 2.1
CTR- Controle	KO- Knockout
DAPI- 4',6-diamidino-2-fenilindol	MAO-A- Monoamina-Oxidase A
DCV- Doenças Cardiovasculares	MEIS1- Gene Meis Homeobox 1
Dobuta.- Dobutamina	MgCl₂- Cloreto de magnésio
ECL- Enhanced chemiluminescence	Min- Minuto
EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-cético	MI- Mililitro
EGF- Fator de Crescimento Epidérmico	
ERK1/2- Extracellular signal-regulated kinases	

mmol- Milimolar

Ms- Milissegundos

mV- Milivolts

n- Número amostral

NaCl- Cloreto de Sódio

NaF- Fluoreto de sódio

NAV 1.5- Canais de sódio dependentes de voltagem

Ng- Nanograma

NGF- Nerve Growth Factor

nm- Nanômetros

nM- Nanomolar

NPA- Peptídeo natriurético atrial

NRG1- Neurogulina 1

°C- Graus Celsius

OCT- Meio de montagem Optimal Cutting Temperature

OMS- Organização mundial de saúde

P1- 1 dia de vida pós-natal

P11- 11 dias de vida pós-natal

P21- 21 dias de vida pós-natal

P45- 45 dias de vida pós-natal

PBS- Tampão fosfato-salino

PCA- ácido perclórico

PFA- Paraformaldeído

pH- potencial hidrogeniônico

PLN- Fosfolambam

PMSF- Fluoreto de fenilmetilsulfonil

Rpm- Rotação por minuto

SCN5A- Gene sodium voltage-gated channel alpha subunit 5

Ser- Serina

SERCA2- Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase

SNA- Sistema Nervoso Autônomo

SNAP- Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático

SNAS: Sistema Nervoso Autônomo Simpático

T3- Hormônio tireoidiano T3

TBS-T- Soro fisiológico tamponado com tris e tween

TH- Tirosina-Hidroxilase

Thr- Treonina

Tris- Tris(hidroximetil)aminometano

Tris-HCL- Tris hydrochloride

Triton- Sufactante Ânionico

Tween- Polissorbato 20

V- Volts

WGA- Wheat germ agglutinin

WT- Animais selvagens

α-MHC- cadeia pesada de miosina do subtipo α, codificado pelo gene *Myh6*

β1-AR- Receptor β1 adrenérgico

β2-AR- Receptor β2 adrenérgico

β-AR- Receptor β adrenérgico

β-MHC- Cadeia pesada de miosina do subtipo β codificado pelo gene *Myh7*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 O processo de maturação cardíaca:	17
2.2 Fatores que influenciam no processo de maturação:.....	21
2.3 O sistema nervoso simpático e a maturação cardíaca.....	24
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo geral:.....	30
4.2 Objetivos específicos:	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Animais	31
5.2 Tratamento Farmacológico	31
5.2.1 Simpatectomia por 6-OHDA	31
5.2.2 Tratamento com Propranolol	32
5.2.3 Tratamento com Atenolol.....	32
5.2.4 Tratamento com Isoproterenol.....	33
5.2.5 Tratamento com Formoterol	33
5.2.6 Tratamento com Dobutamina	34
5.3 Western Blot.....	34
5.4 Histologia	36
5.4.1 Área Celular (tecido)	36
5.4.2 Imunofluorescência (Tecido).....	37
5.4.3 Morfometria celular e análise de polinucleação (célula)	37
5.4 Isolamento de Cardiomiócitos Ventriculares	38
5.5 Análise de Túbulo-T (célula)	38
5.6 Contratilidade Celular.....	38
5.7 HPLC	39
5.8 Análise Estatística.....	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Desenvolvimento pós-natal de camundongos:.....	41
6.2 Desenvolvimento pós-natal de componentes envolvidos no acoplamento excitação-contração, desenvolvimento e manutenção dos túbulos-T.....	41
6.3 Expressão cardíaca das neurotrofinas BDNF e NGF:.....	43

6.4 Desenvolvimento pós-natal da maquinaria de síntese e degradação de noradrenalina no coração:	44
6.5 Desenvolvimento pós-natal de componentes celulares da sinalização β -adrenérgica.	46
6.6 O tratamento com 6-OHDA abole a expressão de TH.....	47
6.7 A desnervação simpática não altera a presença dos de Túbulos-T no cardiomiócito ventricular	49
6.8 A desnervação simpática não altera a função contrátil de cardiomiócitos ventriculares:.....	50
6.9 A desnervação simpática não altera expressão de células YFP+ em animais repórter para MYH7	51
6.10 A desnervação simpática desacelera o crescimento cardíaco pós-natal	52
6.11 A desnervação simpática atenua a fosforilação de proteínas pró-hipertróficas	55
6.12 O antagonismo dos receptores β -AR prejudica o crescimento cardíaco pós-natal	56
6.13 A estimulação β -adrenérgica reverte o fenótipo induzido pela 6-OHDA	57
6.14 A desnervação simpática prejudica o processo de polinucleação dos cardiomiócitos ventriculares:.....	60
6.15 A desnervação simpática não altera o perfil proliferativo dos cardiomiócitos no 21º dia de vida pós-natal.....	61
7. DISCUSSÃO.....	63
8. CONCLUSÃO.....	75
9. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV), são segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a principal causa de morte no Brasil e no mundo. Ainda segundo a OMS, até o ano de 2030, aproximadamente 23,6 milhões de pessoas morrerão por DCV (OMS, 2021). Dentre as patologias cardiovasculares fatais mais comuns, está o infarto agudo do miocárdio (IAM), que é caracterizado pela morte súbita e demasiada cardiomiócitos, geralmente por hipóxia originada de uma isquemia por oclusão ou rompimento de um ou mais vasos coronários (FRANGOGIANNIS, 2015).

Após a morte celular, ocorrerá uma redução da função sistólica cardíaca e o coração, que têm como característica a perda da capacidade de regeneração logo nos primeiros dias de vida pós-natal, realiza um processo de reparo. O processo de reparo, consiste na substituição do tecido contrátil original por fibras de colágeno. Durante este processo, as células restantes aumentam o seu diâmetro para tentar suprir a demanda sanguínea, processo denominado hipertrofia, que em um primeiro momento é induzida para compensar a perda de cardiomiócitos (CMs), e desta forma resulta em células cardíacas com maior força de contração, o que chamamos de fase compensada. No entanto, com o estímulo persistente ocorre perda de função contrátil e má adaptação. Estas características podem fragilizar o coração e induzir patologias secundárias graves (GUO e PU, 2020; FRANGOGIANNIS, 2015; MAROLI e BRAUN, 2020). Em paralelo, durante eventos cardiovasculares como o IAM, a inervação simpática sofre degeneração do tipo Walleriana, fazendo com que a inervação fique heterogênea e desproporcional, podendo causar arritmias fatais (PAESSENS e BORCHARD, 1980). Portanto, alterações morfológicas do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) no coração, podem gerar complicações que criam situações de incompatibilidade com a vida. Um método que surgiu de forma promissora para atenuar os efeitos deletérios do IAM, baseia-se no transplante de CMs derivados de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (CMs-hiPSCM), porém esta terapia depende de um amplo conhecimento sobre o processo de maturação cardíaca. (KARBASSI *et al.*, 2020).

A maturação das células cardíacas compreende a última fase do processo de desenvolvimento cardíaco. Em síntese, trata-se da transição do CM fetal para o fenótipo adulto, que é dividido em três períodos: 1- o período pré-natal: caracterizado

por todas as alterações cardíacas que ocorrem durante o período intrauterino, 2- período perinatal: alterações que ocorrem durante a concepção em que há o primeiro contato do organismo com o ambiente externo e 3- o período pós-natal: que compreende alterações que ocorrem após o nascimento, e se estendem até aproximadamente o 21º dia pós nascimento. As alterações que ocorrem nestes 3 períodos supracitados, abrangem tanto o plano celular quanto tecidual, e envolvem mudanças no metabolismo, estrutura, funcionalidade e expressão gênica do cardiomiócito. Estas alterações tem como objetivo primordial otimizar o funcionamento do coração, tornando o bombeamento mais forte e eficiente. Tais alterações acompanharão cada indivíduo durante toda a sua vida, ou seja, deverão suportar bilhões de ciclos de contração e relaxamento cardíaco (MAROLI e BRAUN, 2020).

Embora não exista uma relação direta descrita entre a maturação cardíaca e a inervação simpática, é sabido que essa inervação contribui para o crescimento hipertrófico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar se esta inervação simpática contribui para a maturação dos CMs durante o período pós-natal, com enfoque na hipertrofia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O processo de maturação cardíaca:

O coração é o primeiro órgão funcional a se desenvolver no embrião (LINDSEY, BUTCHER e YALCIN, 2014). A maturação desse órgão, é um processo fundamental para a sobrevivência do indivíduo, e uma série de mudanças, em vários âmbitos ocorrem para que esse processo seja concluído com êxito (Figura 1). Neste capítulo abordaremos as principais mudanças que ocorrem durante o processo de maturação do coração e das células cardíacas. Para que ocorra a expansão cardíaca, as células passam primeiro por um processo de mitose, aumentando em número (hiperplasia), e logo após perderem essa capacidade de proliferação, as mesmas crescem em volume (hipertrofia). De acordo com Mahmoud *et al.* (2013) a capacidade proliferativa dos cardiomiócitos de roedores se mantém até por volta do sétimo dia pós-natal. Já segundo Li *et al.* (1996), em coração de roedores, o processo de transição da hiperplasia para unicamente a hipertrofia ocorre exatamente entre os dias 3-4 após o nascimento. O mesmo estudo constatou que o aumento expressivo de volume e a transição de miócitos mononucleados para binucleados aconteceu a partir de P3 (terceiro dia pós-nascimento), período que coincide com a perda da atividade proliferativa (KREIPKE E BIRREN 2015). A capacidade proliferativa é controlada por genes específicos como CDK1, CCNB1, AURKB. O silenciamento desses genes durante o desenvolvimento pós-natal, faz com que os CMs entrem em quiescência mitótica, e parada na fase G0 por tempo indeterminado (Guo e Pu, 2020).

O aumento do tamanho dos CMs, assim como a binucleação que ocorre em 80% das células maduras de roedores (Guo e Pu, 2020), é um evento que garante uma maior produção de RNA e conseqüentemente aumento da síntese proteica, suprimindo assim as demandas de uma célula maior. Dentre estas demandas, podemos citar a necessidade de uma contração rápida e sincicial, que requer rápida propagação do potencial de ação. Para atender esta demanda específica, a membrana plasmática cria várias invaginações no sentido transversal e axial, que são chamados de Túbulos-T (KARBASSI *et al.*, 2020). Cada túbulo-T, estará localizado próximo ao retículo sarcoplasmático, a principal organela armazenadora de cálcio (Ca^{2+}), que nos CMs se encontram em formato de rede. Durante o amadurecimento ocorre o aumento do volume dessas reservas e sua

reorganização topográfica para que se aproximem do túbulo-t, se localizando a uma distância de aproximadamente 10nm de cada túbulo. Paralelamente, ocorre a expressão de proteínas envolvidas no manuseio do Ca^{2+} . Neste grupo citamos principalmente os receptores de rianodina que são muito mais abundantes em CMs maduros, e os canais de cálcio tipo L principalmente do subtipo $\text{Cav}\beta 2$. Também ocorre a expressão de Calsequestrina, que é pouco expressa em células imaturas, além de outras proteínas e canais como Serca, Fosfolambam, dentre outras (MAROLI e BRAUN, 2020; KARBASSI *et al.*, 2020 e KAHALY E DILLMANN, 2005). Como consequência deste processo a cinética do Ca^{2+} é otimizada no CM, produzindo contrações mais vigorosas e eficientes do que em CM neonatais.

Outra mudança importante do CM, é o aumento dos sarcômeros em número e em tamanho, que se expandem em série, e em paralelo, tornando o filamento mais espesso e comprido. Enquanto CM maduros possuem sarcômeros relaxados com tamanho de aproximadamente 2,2 μm , o comprimento do sarcômero do CM imaturo é de 1,65 μm (KARBASSI *et al.*, 2020; GUO e PU, 2020). Outra diferença importante, é a presença da isoforma curta e rígida da titina (N2B) em CM adultos, enquanto que CM fetais expressam a isoforma de titina N2BA58, que é mais longa e menos rígida (KARBASSI *et al.*, 2020; GUO e PU, 2020).

Uma célula maior e trabalhando de forma mais intensa, terá uma demanda energética maior. Ocorre, portanto, mudanças metabólicas e morfoestruturais importantes. De início as mitocôndrias saem de uma forma mais arredondada para uma forma mais oval, mudam sua localização (saem de uma disposição aleatória no citoplasma para uma organização linear mais próxima das miofibrilas), e proliferam (chegam a ocupar ~30-40% do volume total da célula, enquanto na célula imatura, a porcentagem representa apenas 5%) (KARBASSI *et al.*, 2020; GUO e PU, 2020; MAROLI e BRAUN, 2020).

Devido as condições ambientais em que se encontram (baixa concentração de ácidos graxos e alto nível de lactato) os CM imaturos obtém energia através de glicólise anaeróbica. Já os CM maduros têm como principal fonte de energia a fosforilação oxidativa. Os CMs maduros também passam a expressar enzimas envolvidas na β -oxidação, que fornecerá cerca de 80% de todo ATP consumido pela célula madura, enquanto no CM imaturo, esta porcentagem gira em torno de 15% de todo o ATP gerado. (GUO e PU, 2020; MAROLI e BRAUN, 2020; KARBASSI *et al.*, 2020).

No que tange a eletrofisiologia, observa-se diferenças consideráveis entre o potencial de repouso e de ação de células fetais e maduras. O potencial de ação do CM maduro, tende a ser maior em amplitude e duração, enquanto o potencial de repouso, mais eletronegativo. O potencial de repouso da célula madura normal, varia em torno de -85 a -90 mV, enquanto o mesmo potencial em células imaturas atinge cerca -50 a -60 mV. Esta diferença é atribuída a menor expressão de Kir2.1 e Kir2.2 nas células imaturas, que são canais de potássio retificadores de entrada, responsáveis pelo controle do potencial de repouso da membrana dos CM. A velocidade de disparo do potencial da célula imatura é muito mais lenta devido a menor expressão do canal de sódio NAV 1.5, codificado pelo gene SCN5A, além do fato do potencial de repouso ser menos hiperpolarizado, o que contribui para essa despolarização mais lenta. Esse potencial de repouso mais próximo do limiar, confere aos CM imaturos uma maior automaticidade, quando comparado ao CM maduro (KARBASSI *et al.*, 2020), o que lembra as células marca-passo. Esta despolarização espontânea das células imaturas, também são influenciadas pela alta concentração de canais de HCN4, um tipo de canal iônico expresso nas células cardíacas imaturas, que diminuem sua expressão à medida que o coração amadurece. Com o advento da maturação, os canais iônicos no sarcolema são remodelados, fazendo com que a automaticidade seja perdida em todo o coração, exceto nos centros de marcapasso como nó sinoatrial e atrioventricular, que possuem a atividade de marcapasso atribuída a alta expressão de canais HCN4 (Guo e Pu, 2020; MAROLI e BRAUN, 2020)

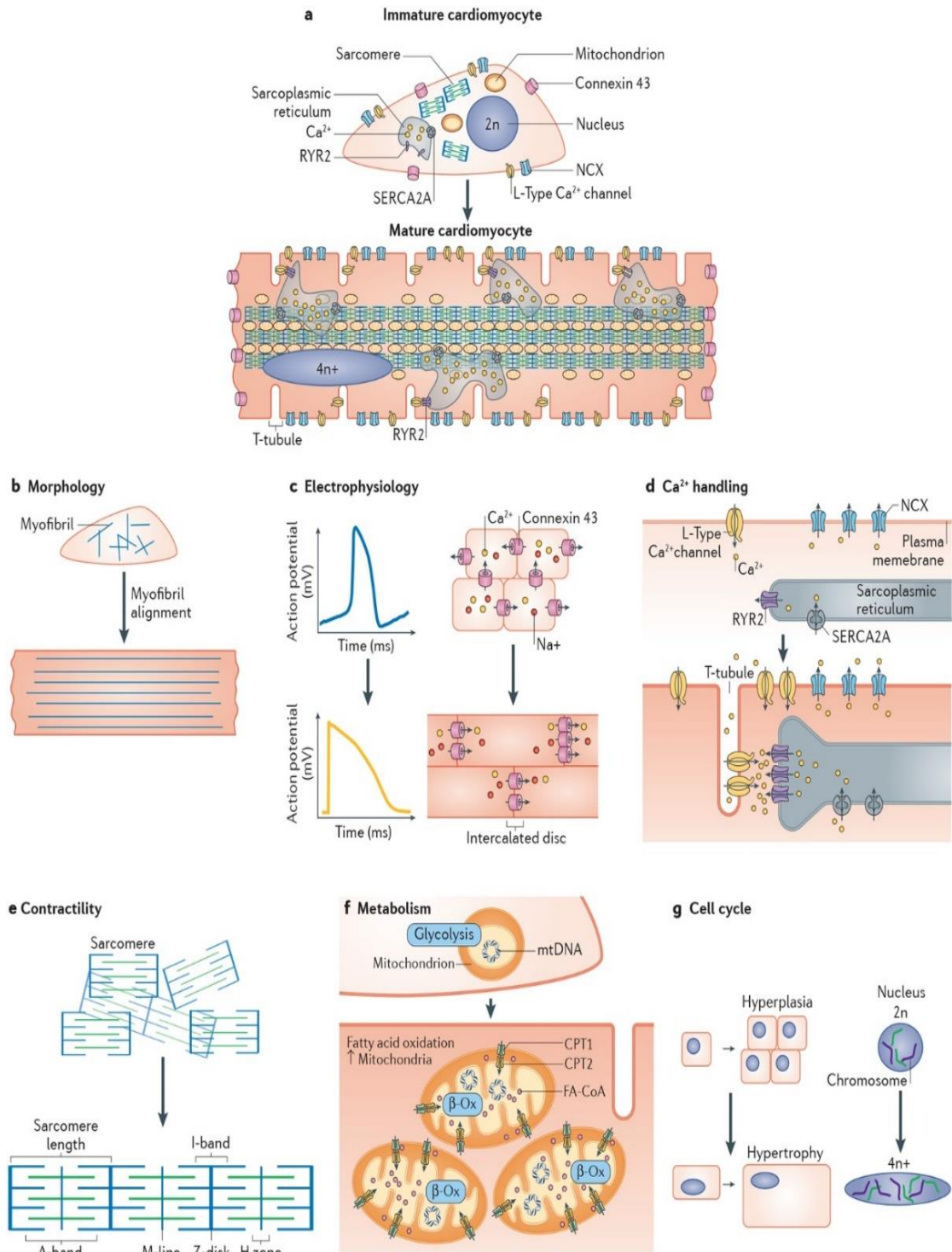


Figura 1: Características da maturação dos CMs. A maturação dos CMs ocorre como resultado de um conjunto de mudanças estruturais e dinâmicas. CPT: carnitina O- palmitoil transferase; FA-CoA: éster acil-CoA graxo; mTDNA: DNA mitocondrial; n: conteúdo haploide de cromossomos; NCX: trocador sódio-cálcio; RYR2: receptor de rianodina 2; SERCA2A: cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático. Esquema retirado de: Karbassi et al., (2020).

2.2 Fatores que influenciam no processo de maturação:

Diversos fatores já foram descritos como importantes para a maturação cardíaca. Citaremos aqui os mais importantes. Chattergoon *et al.* (2012) mostraram em experimentos com ovelhas que o hormônio tireoidiano T3 parece ser um importante fator pró-maturacional a nível fetal, tanto no processo de binucleação dos miócitos (importante marco maturacional no último terço da gestação de ovinos, uma vez que ~80% dos CMs desses animais são binucleados) juntamente com a supressão da atividade mitótica e aumento do volume celular. Embora, não houve alteração no comprimento do CM, o diâmetro celular aumentou em animais que recebiam o hormônio tireoidiano T3. Estimou-se, portanto, que animais tratados com T3, amadureceram duas semanas antes do previsto quando comparado com o grupo controle, indicando que este hormônio tireoidiano possui influência positiva sobre o processo maturacional durante o período fetal. Esse resultado corrobora os achados de Yang *et al.* (2014) que mostraram que CMs tratados *in vitro* com T3 apresentaram maturação mais rápida, com aumento do tamanho da célula e do comprimento do sarcômero, além de aumento da força contrátil, da cinética do Ca²⁺, da biogênese mitocondrial, e da capacidade respiratória mitocondrial. O tratamento com T3 induz no animal um aumento do peptídeo natriurético, um peptídeo que é produzido em mamíferos adultos pelas células atriais em resposta a um alongamento. Porém durante o desenvolvimento fetal, tanto átrios quanto ventrículos são capazes de produzir esse peptídeo. O'Tierney *et al.* (2010) concluíram que este peptídeo inibia a proliferação dos CM induzida por angiotensina II (Ang II), ainda durante o período fetal, podendo desempenhar um papel anti-proliferativo. Alexander *et al.* (2003) e O'Tierney *et al.* (2010) demonstraram que o peptídeo natriurético atrial (NPA) está relacionado com um mecanismo de proteção durante o desenvolvimento dos CM, que se relaciona com a regulação do crescimento celular, impedindo que os cardiomiócitos sofram uma hipertrofia exacerbada. Hansson, Kjorell e Forsgren (2001), mostraram uma relação interessante entre o NPA e a inervação simpática. Foi demonstrado que a medida que a inervação simpática cardíaca cresce nos ventrículos, ocorre, concomitantemente, a diminuição expressiva dos níveis de NPA e quando o oposto era realizado com a desnervação simpática, aumentava-se expressivamente os níveis de NPA, sugerindo que a inervação simpática faz parte de um mecanismo que regula os níveis de NPA cardíaco.

Segundo Mahmoud *et al.* (2013) a capacidade proliferativa cardíaca pós-natal em mamíferos, é preservada até o 7º dia. O mesmo estudo demonstrou que a deleção do gene *Meis1* que codifica a proteína Meis1 foi capaz de aumentar a janela proliferativa pós-natal de CMs e reativar a mitose dessas células sem nenhum efeito deletério. Em contraste, a superexpressão de Meis1 diminuiu a proliferação de CMs neonatais e inibiu a regeneração cardíaca neonatal. Outro gene capaz de controlar a proliferação foi o *Casz1*. Dorr *et al.* (2015) mostrou que em corações de animais que possuíam a deleção do gene *Casz1* que codifica a proteína CASZ1 ocorria uma diminuição da capacidade proliferativa, além do coração apresentar uma diminuição do número de CMs quando comparados ao grupo controle. Esse fenômeno ocorre porque a ausência do gene *Casz1* impede a progressão do ciclo celular da fase G1 para S.

Outro hormônio que vem sendo bastante estudado há vários anos, é o cortisol. Magyar, *et al.* (1979) observou em um estudo clássico que o nível de hidrocortisona fetal aumentava consideravelmente nas últimas semanas de gestação de ovelhas, partindo de 10 ng/ml para 70 ng/ml e no momento do parto, atingia aproximadamente 145 ng/ml. Giraud *et al.* (2006), ao tratar corações de ovinos durante o desenvolvimento fetal com cortisol na dose de 0,5 ug/kg durante 7 dias, notou que estes CMs em fase de desenvolvimento não apresentavam hipertrofia, mas o peso do coração aumentava e as células apresentavam fatores mitóticos, indicando que o cortisol pode influenciar positivamente a proliferação de CM em desenvolvimento fetal. Esse resultado mostra que a concentração do hormônio, é crucial para induzir vias proliferativas ou anti-proliferativas, uma vez que estudos como o de Lumbers *et al.* (2006) concluíram que altas doses de cortisol (72,1 mg/dia por 2,5 dias) induziam hipertrofia de CMs do ventrículo direito, mas não do esquerdo. Esse resultado pode estar associado ao aumento da pressão arterial sistólica causada pela alta dose de cortisol. Ao administrar dexametasona na concentração de 0,2 ou 0,8 mg/kg em ratas grávidas nos dias 17, 18 e 19 de gestação, Slotkin *et al.* (1990) observaram que o coração da prole apresentava uma diminuição da capacidade proliferativa e uma hipertrofia celular. Nesta linha, Parikh *et al.* (2017) demonstrou ainda que dexametasona e hormônio tireoidianoT3 isolados não são capazes de induzir a formação de túbulo-t, mas ao serem associados, conseguiram induzir, em CM-hiPSCM, a formação de um tipo de túbulo-t mais desorganizado, mas que era capaz de melhorar a dinâmica do Ca²⁺ intracelular, inclusive otimizando a organização estrutural dos receptores de rianodina.

Além das funções fisiológicas descritas para Ang II, que é capaz de induzir o crescimento do CM, observou-se que em momentos específicos da maturação, ela era capaz de favorecer a hiperplasia sem contribuir de forma significativa para a hipertrofia. Em um estudo com cultura de células tronco, Wu *et al.* (2013) demonstrou que a Ang II, através do receptor AT1 favorece a maturação cardíaca promovendo a hipertrofia celular, aumentando a expressão dos genes que codificam as proteínas sarcoméricas e melhorando a organização dos sarcômeros. Em um estudo clássico, Sadoshima *et al.* (1992) demonstrou que em CM maduros, a Ang II é capaz de induzir hipertrofia, porém, não é capaz de induzir hiperplasia. Ao estudar células ainda em desenvolvimento fetal, Kagiya *et al.* (2002) concluíram que durante o amadurecimento fetal, a Ang II era capaz de induzir a proliferação via receptores AT1 através da cascata de sinalização da ERK1/2, não influenciando o processo de hipertrofia nessa fase do desenvolvimento. O mesmo estudo descreve a Ang II pode atuar também como fator de crescimento durante o desenvolvimento fetal promovendo a hiperplasia de células cardíacas não miocíticas, que possuem por si só um papel parácrino importante sobre a maturação.

Outro dado interessante foi obtido por Ieda *et al.* (2009) que demonstraram que os fibroblastos cardíacos possuem importante papel na maturação cardíaca em diferentes fases. Os fibroblastos embrionários promovem a proliferação de CMs através da secreção de fatores de matriz extracelular como fibronectina, colágeno e fator de crescimento semelhante ao EGF. Essa ação parácrina ocorreu também nos fibroblastos adultos, que induzem a organização dos sarcômeros através da secreção de citocinas de crescimento como interleucina-6 e interleucina-1 α e hipertrofia dos CM. Diversos outros fatores podem induzir hipertrofia. Diversos mecanismos moleculares podem induzir a hipertrofia. No caso da hipertrofia fisiológica, destacam-se o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) e neuroregulina 1 β (NRG1). Alguns estudos que utilizaram IGF1 e NRG1 para tratar CM *in vitro*, concluíram que houve um melhor desenvolvimento dessas células quando comparadas com o controle, sendo que IGF1 induziu aumento de proliferação e NRG1 promoveu a maturação metabólica e contrátil no tecido cardíaco (RUPERT e COULOMBE, 2017). Além do IGF1 e NRG1, o fator de resposta sérica demonstrou possuir importantes funções durante a maturação. Guo *et al.* (2018) observaram que o Fator de resposta Sérica regula a formação de túbulos T, os espaços entre os sarcômeros, a hipertrofia e biogênese mitocondrial.

Um outro componente importante para a maturação, tem relação com a região na qual o CM irá amadurecer. Puente *et al.* (2014), demonstraram que após o nascimento, o metabolismo passa a ser oxidativo e capacidade de proliferação é perdida. Durante o nascimento, o ambiente rico em oxigênio aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio no coração, durante a primeira semana pós-natal, fator este que segundo os autores contribui para a interrupção do ciclo celular. Em contrapartida ao produzir artificialmente um ambiente hipóxico pós-natal, os autores observaram que a janela proliferativa era aumentada, sugerindo que o ambiente tecidual possa modular a amplitude da janela proliferativa. Na mesma linha, CMs-hiPSCM se desenvolvem melhor e muito mais rápido quando são alocadas próximo ao tecido original quando comparadas a células que se desenvolvem somente *in vitro*. O motivo pelo qual isso acontece ainda é desconhecido, acredita-se que seja pela interferência metabólica sistêmica, pela interação química com os outros CMs e com as demais células que compõem o tecido cardíaco, inclusive neurônios do SNA. Estes resultados demonstram que existem componentes intrínsecos no coração do organismo vivo que são essenciais para o amadurecimento completo dos CMs (KARBASSI *et al.*, 2020).

2.3 O sistema nervoso simpático e a maturação cardíaca

A inervação simpática cardíaca parte do segmento T1-T4 emergindo ramos que e inervam regiões específicas do coração como o nó sinusal, nó átrio ventricular e diretamente os miócitos ventriculares (Figura 2A). O controle do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) no coração, é predominantemente excitatório através da secreção de norepinefrina causando vasodilatação coronariana e modulação positiva de variáveis como: aumento da força de contração, do relaxamento celular, da frequência cardíaca e da velocidade de contração (efeito inotrópico, lusitrópico, cronotrópico e dromotrópico positivo respectivamente) (GUYTON e HALL, 2017). A noradrenalina, interage no tecido cardíaco principalmente com os receptores β -AR, que são divididos em β_1 , β_2 e β_3 -AR. Em condições normais, o coração possui os três subtipos, sendo β_1 o mais predominante (75-80% de todos os receptores β), em segundo o subtipo β_2 (15-18%) e o restante é compreendido por receptores β_3 que não apresenta função em condições fisiológicas (CAPOTE, PEREZ e LYMPEROPOULOS., 2015). A inervação simpática se projeta da base do coração

para o epicárdio e posteriormente se infunde pra dentro do miocárdio se desenvolvendo paralelamente aos vasos e aos capilares. Sem a presença de uma placa motora como na musculatura estriada esquelética, a secreção do neurotransmissor ocorre por varicosidades, locais onde o nervo se achata para acomodar uma maior quantidade de vesículas sinápticas carregadas de neurotransmissores (KIMURA, IEDA e FUKURA, 2011). O SNAS é antagonizado pelo Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático (SNAP) que é caracterizado por fibras nervosas oriundas no nervo Vago (10^o par de nervo craniano). As fibras vagais estão espalhadas em sua maior parte pelos átrios (Nó sinoatrial) e inerva muito pouco os ventrículos. Esta distribuição explica o porquê de a estimulação vagal induzir principalmente a redução da frequência cardíaca e não diminuir de modo acentuado a força de contração (Figura 2B) (GUYTON e HALL, 2017).

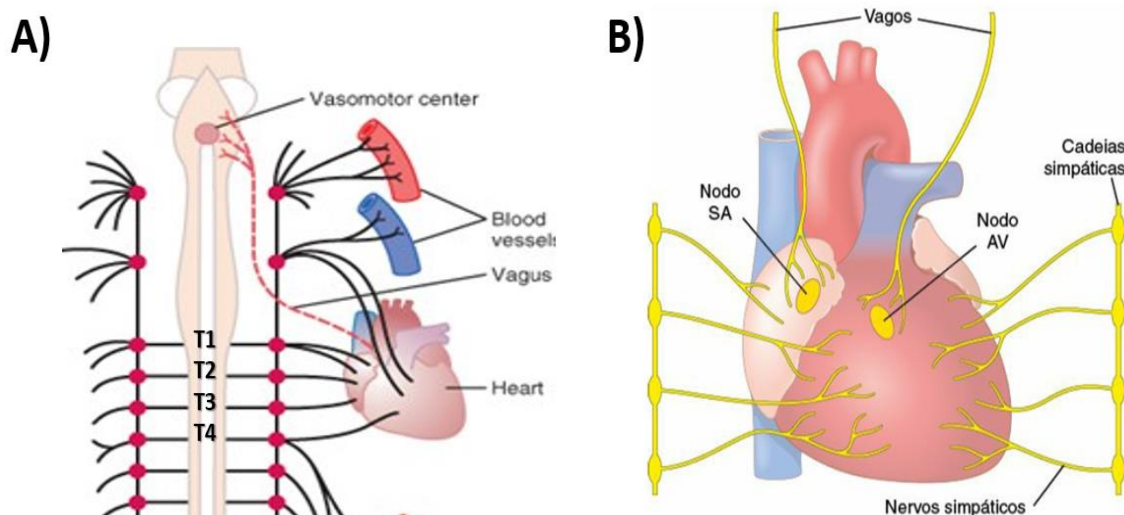


Figura 2: Origem e projeção da inervação simpática cardíaca **A)** Origem da inervação simpática cardíaca, com fibras emergindo do segmento vertebral torácico 1 a 4 (T1-T4). **B)** Local de chegada da inervação autônoma cardíaca, fibras simpáticas inervando predominantemente os ventrículos e fibras parassimpáticas inervando predominantemente os centros de marcapasso (nó-sinusal e no átrio-ventricular). Figura de: Guyton e Hall (2017).

Embora a ativação elétrica simpática seja considerada o principal regulador da função cardíaca, no que diz respeito a modulação da força de contração e velocidade de condução do potencial de ação, pouco se sabe sobre a importância da inervação simpática pós-natal para o amadurecimento cardíaco. A inervação do coração pelos neurônios simpáticos ocorre ainda no período pré-natal e no início do período pós-natal, momento que coincide com o período de amadurecimento funcional dos neurônios simpáticos (KREIPKE e BIRREN, 2015). Thomas, Matsumoto e Palmiter

(1995) mostraram que ratos geneticamente modificados que eram incapazes de produzir noradrenalina, morriam ainda durante o desenvolvimento uterino, e que dos poucos que sobreviviam, apenas 5% atingiam a idade adulta, ou seja, a ausência de noradrenalina sistêmica prejudicava fortemente o desenvolvimento embrionário a ponto desta ausência ser considerado incompatível com a vida. Estes dados sugerem uma participação importante do sistema nervoso simpático sobre o processo de amadurecimento pré-natal generalizado.

Tratando-se do coração, sabe-se que a inervação simpática contribui de forma muito mais abrangente para a homeostasia cardíaca do que unicamente com o controle inotrópico, cronotrópico e dromotrópico positivos. Zaglia *et al.* (2013) mostraram que o coração de animais adultos desnervados apresentavam uma diminuição significativa da massa e do tamanho celular (processo denominado de remodelação atrófica), efeito que era revertido com o Clenbuterol, um agonista seletivo para os receptores β 2-adrenérgicos (β 2-AR). Pianca *et al.* (2019) complementam o resultado anterior, mostrando que as junções neurocárdicas não apresentam um padrão organizacional linear em diversos mamíferos, inclusive humanos. Desta forma, CMs da camada externa, por possuírem maior contato com a inervação simpática eram maiores quando comparados com CMs da camada interna e que essa diferença deixa de existir quando é realizada a desnervação simpática.

Kreipke e Birren (2015) sugerem que sinalização simpática é parte de um sistema homeostático que atua para definir o número final de CMs no coração adulto. Isso porque no presente estudo, foi mostrado que após uma lesão neonatal do sistema nervoso simpático, os corações lesionados ficam menores e com menos CMs. A presença de neurônios simpáticos em culturas de CM retarda a retirada do ciclo de celular e limita transitoriamente a hipertrofia através da sinalização adrenérgica sobre os receptores β -adrenérgicos (β -AR). Esse resultado, sugere que a inervação simpática prolonga o período de proliferação e regula o número de CMs durante o período pós-natal.

Ficou demonstrado por Lindsey, Butcher e Yalcin (2014) e Nunes *et al.* (2013) que a tensão mecânica do coração contribui para o processo de maturação, regula a organização sarcomérica e otimiza a ação contrátil. Como forma de tentar simular essa tensão mecânica *in vitro*, cardiomiócitos em cultura foram estimulados eletricamente e vários parâmetros maturacionais foram avaliados. Neste caso o resultado foi interessante, as células estimuladas eletricamente apresentavam

sarcômeros mais alinhados e definidos. Partindo desse resultado, Godier-Furnémont *et al.* (2016) demonstraram que ao estimular as células várias vezes ao dia com diferentes frequências, contribuía significativamente para maior maturação das células, do que estímulos realizados em uma frequência fixa. Alternar a frequência basal (evento semelhante as descargas simpáticas durante o dia), melhora a contratilidade, o manuseamento do Ca^{2+} , velocidade de condução, reduz as taxas de proliferação, induz um potencial de membrana de repouso mais negativo e aumenta a amplitude do potencial de ação, indicando que pode haver uma forte influência do sistema nervoso simpático sobre o processo maturacional.

Karamlou *et al.* (2013), por sua vez, demonstraram que a indução experimental de hipertensão sistólica durante a vida fetal, estimula a hipertrofia, hiperplasia e a binucleação dos CM ventriculares, ou seja, em tese, um aumento da atividade do sistema nervoso simpático, ainda durante o estágio intrauterino, é capaz de contribuir positivamente para a maturação. Existem evidências da indução da função pró-proliferativa da inervação simpática sobre os CM neonatais. White *et al.*, (2015) mostraram que ao induzir a desnervação simpática farmacológica, os CMs neonatais perdiam a capacidade de proliferação. Ainda tratando-se de janela proliferativa, Liu *et al.*, (2019) demonstraram, em um belíssimo estudo, que corações de animais nocautes para os receptores β -AR ou animais selvagens tratados com β -bloqueador (atenolol) melhoravam a taxa de proliferação e reduzia a perda funcional e a remodelação adversa de CMs infartados, provavelmente pela influência dos receptores β -AR sobre um gene da citocinese, o gene ECT2. Esses resultados dão indícios de que a inervação simpática parece contribuir efetivamente para a maturação.

3. JUSTIFICATIVA

A viabilização da regeneração cardíaca, está intimamente ligada ao entendimento do processo maturacional do coração. Autores como Guo *et al.* (2020) classificam a escassez de conhecimento acerca da regulação da maturação cardíaca como o principal fator que inviabiliza o desenvolvimento de técnicas mais eficazes para a regeneração cardíaca. Nesta linha, diversas perguntas precisam ser respondidas para que se possa entender melhor a relação entre inervação simpática e a maturação cardíaca, como por exemplo: 1 - como se comportam os componentes da sinalização adrenérgica no coração durante o amadurecimento pós-natal?; 2 - qual a influência e a importância desta sinalização para a hipertrofia que ocorre durante o período maturacional?; 3 - Se existe uma relação entre o amadurecimento cardíaco e a inervação simpática, qual a cascata de sinalização responsável pela regulação deste fenômeno? e 4 - Quais variáveis maturacionais são influenciadas pela inervação simpática? Neste projeto nosso objetivo é responder estas perguntas, vislumbrando avançar no conhecimento acerca dos fatores que contribuem para a maturação pós-natal do coração.

Embora a medicina regenerativa tenha avançado nos últimos anos e a tecnologia já nos permita induzir a diferenciação de células tronco em CMs com uma considerável homogeneidade celular, ainda é inviável induzir o amadurecimento completo dos miócitos *in vitro*. Em outras palavras, até o momento não foi possível elevar a maturação cardíaca *in vitro* a um nível compatível com o da maturação fisiológica, o que reduz em muito a taxa de sucesso de terapias que possam substituir um tecido cardíaco lesado por um tecido cardíaco produzido *in vitro* (transplante de CM) (KARBASSI *et al.*, 2020; e TU, CHO e WU, 2019). As células desenvolvidas *in vitro* se assemelham muito mais as células imaturas do que as células maduras (Figura 3). Por exemplo, cardiomiócitos provenientes de um coração adulto possuem aproximadamente 150 μm de comprimento, 20 μm de largura e 15 μm de altura. Já os CMs- hiPSCM possuem um formato mais circular com 30 μm de comprimento, 10 μm de largura e 5–10 μm de altura. Além disso, a organização intracelular das células produzidas *in vitro*, apresenta um padrão mais desorganizado em todos os aspectos (SNIR *et al.*, 2013; KARBASSI *et al.*, 2020). Desta forma, caracterizar os mecanismos que contribuem para a maturação cardíaca, se essa contribuição ocorre de forma positiva ou negativa para o desenvolvimento e em que fase da maturação esse

processo ocorre são de grande relevância para o avanço científico e sua aplicação na clínica.

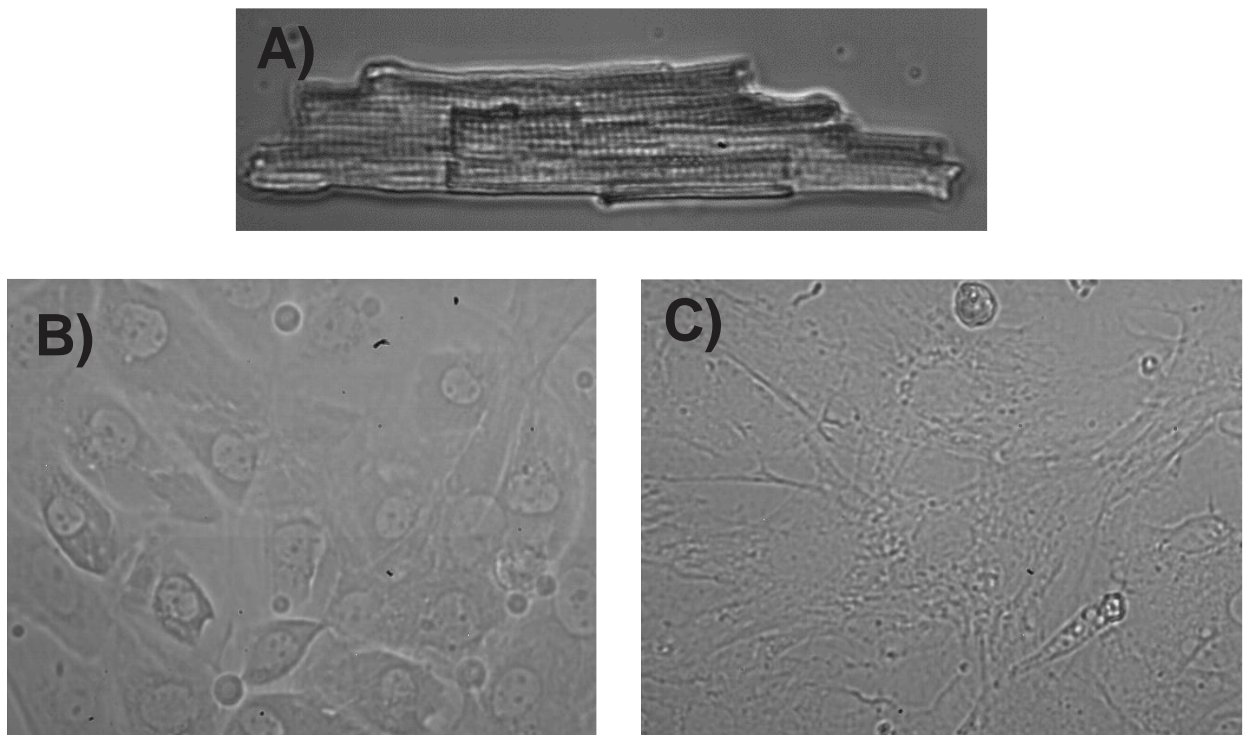


Figura 3: Comparativo morfoestrutural entre diferentes CM isolados A) adulto~12 semanas; B) Neonatal 1-3 dias e C) hiPSCM. Imagens retiradas de Scalzo et.al., (2021)

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Traçar o perfil da sinalização adrenérgica no coração durante o desenvolvimento pós-natal e investigar o papel desta sinalização na hipertrofia cardíaca que ocorre neste período.

4.2 Objetivos específicos:

- I) Caracterizar o perfil maturacional dos componentes da sinalização adrenérgica como TH, MAO, neurotrofinas e noradrenalina.
- II) Caracterizar o perfil maturacional dos componentes do acoplamento excitação contração: Serca, Calsequestrina, Junctofilina, Caveolina 3.
- III) Investigar se a desnervação simpática influencia o aumento do tamanho do coração e do CM.
- IV) Avaliar se a desnervação cardíaca influencia o processo de maturação cardíaca, por meio da avaliação de marcadores maturacionais, como presença de túbulos T, contratilidade, alteração na expressão de genes fetais, polinucleação e proliferação dos CMs;
- V) Avaliar o efeito do tratamento com β -bloqueador no crescimento pós-natal do coração e dos CMs.
- VI) Avaliar a participação dos receptores β_1 e β_2 -adrenérgicos no crescimento pós-natal do coração e dos CMs.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados neste estudo 40 camundongos de ambos os sexos, com idades entre 1 e 45 dias. Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Comitê de Ética para o uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA 29/2021). Foram utilizados nesse estudo, camundongos das seguintes linhagens: I) camundongos selvagens da linhagem C57BL/6J (WT), II) Camundongos com deleção genética dos receptores β 2-AR (B2-KO) FVB.129-Adrb2tm1Bkk/J Strain #031496 e III) Camundongo repórter β -MHC (Myh7-YFP) Myh7^{tm1Unc} (MGI:3776012). Os animais foram alojados em condição padrão; sala com temperatura (22-24 °C) e umidade controlada, mantida em horário claro-escuro 12:12-h, com alimento e água *ad libitum*.

5.2 Tratamento Farmacológico

5.2.1 Simpatectomia por 6-OHDA

A metodologia da simpatectomia farmacológica é representada na figura 4. A 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich 162957) foi aplicada duas vezes na dosagem de 100 mg/kg, em animais C57BL/6J (WT), ambas por via subcutânea, sendo a primeira em animais com 1 dia de vida (P1) e a segunda 10 dias após a primeira dose (P11). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no 21° e 45° dia (P21 e P45 respectivamente), os corações foram coletados, congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer -80 e posteriormente direcionados para os respectivos experimentos. A efetividade da desnervação foi comprovada avaliando a expressão da tirosina hidroxilase (TH) pela técnica de Western Blot.

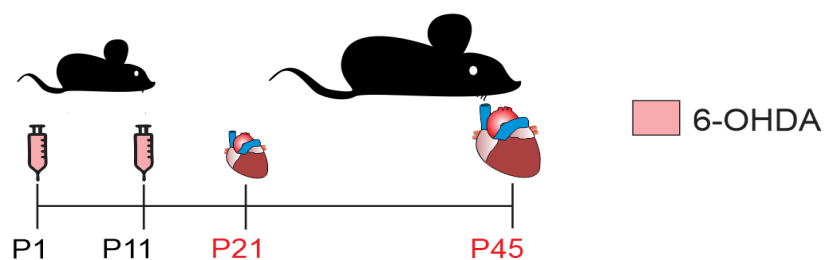


Figura 4. Esquema experimental: Esquema de tratamento farmacológico com a 6-OHDA.

5.2.2 Tratamento com Propranolol

Para induzir o bloqueio não seletivo dos receptores β -AR, utilizamos o propranolol (Sigma-Aldrich P0884). Foram administradas 10 injeções (P11 a P20) na dosagem de 5 mg/Kg/dia, em animais C57BL/6J (WT) todas por via subcutânea. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no P21. Os corações foram coletados, congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer -80 e posteriormente direcionados para os respectivos experimentos. A metodologia do tratamento com propranolol é representada na figura 5.

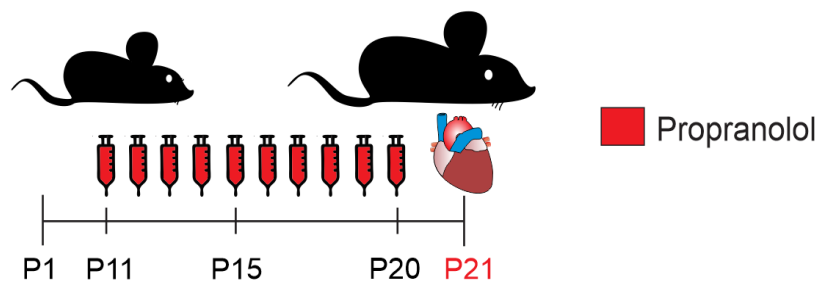


Figura 5. Esquema experimental: Esquema de tratamento farmacológico com o propranolol.

5.2.3 Tratamento com Atenolol

Para induzir o bloqueio seletivo dos receptores β_1 adrenérgicos (β_1 -AR) utilizamos o Atenolol (Sigma-Aldrich A7655). Foram administradas 10 injeções (P11 a P20) na dosagem de 5 mg/Kg/dia, em animais C57BL/6J (WT), todas por via subcutânea. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no P21. Os corações foram coletados, congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer -80 e posteriormente direcionados para os respectivos experimentos. A metodologia do tratamento com Atenolol é representada na figura 6.

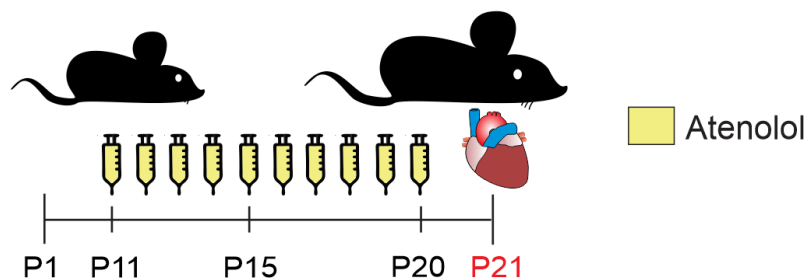


Figura 6. Esquema experimental: Esquema de tratamento farmacológico com o Atenolol.

5.2.4 Tratamento com Isoproterenol

Para reestimar os receptores β -AR dos animais previamente desnervados com a 6-OHDA, utilizamos o Isoproterenol (ISO) (Sigma-Aldrich I5627) um agonista β -AR não seletivo. Foram administradas 6 injeções (P15 a P20) na dosagem de 5mg/kg/dia, em animais C57BL/6J (WT), todas por via subcutânea. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no P21. Os corações foram coletados, congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer -80 e posteriormente direcionados para os respectivos experimentos. A metodologia do tratamento com Isoproterenol é representada na figura 7.

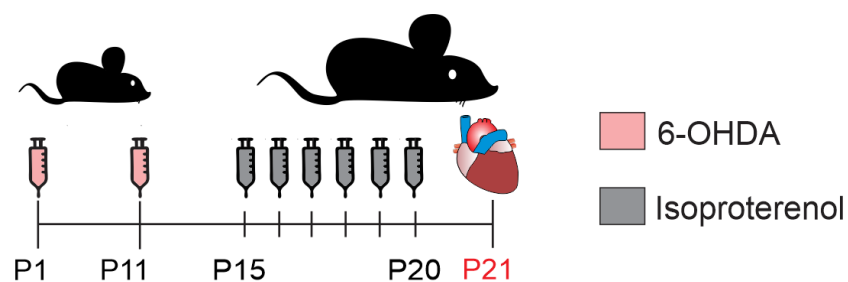


Figura 7. Esquema experimental: Esquema de tratamento farmacológico com 6-OHDA + ISO.

5.2.5 Tratamento com Formoterol

Para reestimar os receptores β 2-AR dos animais previamente desnervados com a 6-OHDA, utilizamos o Formoterol (Sigma-Aldrich F9552) um agonista seletivo para os receptores β -2AR. Foram administradas 6 injeções (P15 a P20) na dosagem de 5 mg/kg/dia, em animais C57BL/6J (WT), todas por via subcutânea. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no P21. Os corações foram coletados, congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer -80 e posteriormente direcionados para os respectivos experimentos. A metodologia do tratamento com Formoterol é representada na figura 8.

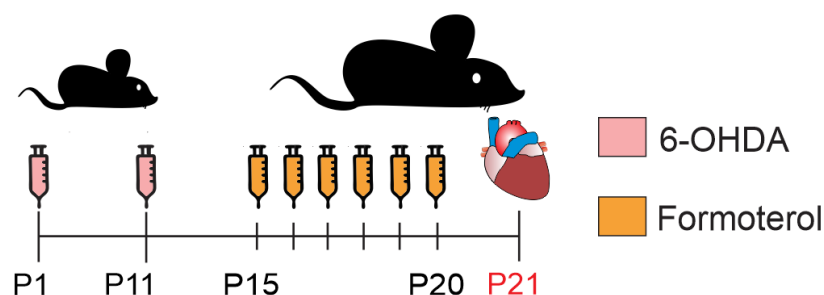


Figura 8. Esquema experimental: Esquema de tratamento farmacológico com 6OHDA + Formoterol.

5.2.6 Tratamento com Dobutamina

Para reestimar os receptores β 1-AR dos animais previamente desnervados com a 6-OHDA, utilizamos a Dobutamina (Sigma-Aldrich D0676) um agonista seletivo para os receptores β -2AR. Foram administradas 6 injeções (P15 a P20) na dosagem de 5 mg/kg/dia, em animais C57BL/6J (WT), todas por via subcutânea. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical no P21. Os corações foram coletados, congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer -80 e posteriormente direcionados para os respectivos experimentos. A metodologia do tratamento com Dobutamina é representada na figura 9.

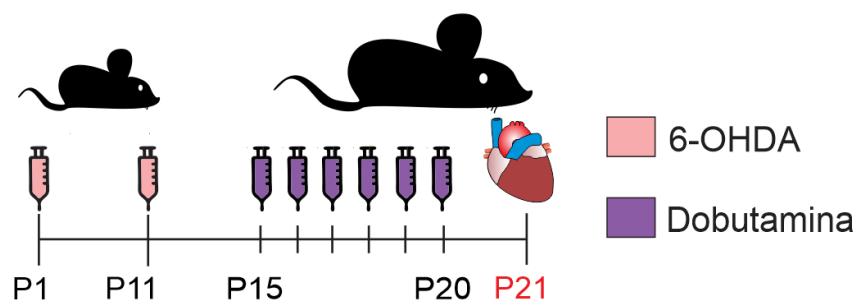


Figura 9. Esquema experimental: Esquema de tratamento farmacológico com 6OHDA + Dobutamina

5.3 Western Blot

Os corações de camundongos previamente extraídos e congelados no freezer -80, foram homogeneizados por 40 minutos em solução de lise (em mM: NaCl, 100; Tris-base, 50; EDTA-2Na, 5; Na₄P₂O₇·10H₂O, 50; MgCl₂, 1; pH 8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0,3% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15,7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (em mM: NaF, 20; Na₃VO₄, 1). Após o processo de homogeneização, o material seguiu para a uma centrifuga refrigerada onde foi centrifugado por 12 minutos, 8000 rpm, 4°C. Após a centrifugação o pellet foi descartado e o sobrenadante aliqotado e armazenado ao -80°C. A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de descrito por Bradford, 1976. 40-50 µg de proteínas foram separadas num gel de poliacrilamida cuja concentração varia entre 8 e 12% dependendo da massa molecular da proteína-alvo. As amostras foram então aquecidas a 95°C por 5 minutos quando o alvo não era uma proteína de membrana ou a 37°C por 10 minutos quando o alvo era uma proteína de membrana.

As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120V e tempo máximo de 2 horas. A transferência foi realizada utilizando-se o aparato de transferência semi-dry (BioRad), com voltagem fixa em 20V tempo de transferência variando entre 30 e 40 minutos. Todas as membranas foram então coradas em solução de Ponceau para monitorar a qualidade da transferência. Logo após, as membranas foram lavadas em solução de TBS-T (do inglês, Tris-Buffered Saline; em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20, pH 8,0). O bloqueio foi realizado em solução de TBS-T com leite a 5% por 1 hora a temperatura ambiente em agitação permanente. As membranas então foram incubadas *overnight* por 16 a 20 horas, a 4°C, com anticorpos primários diluídos em solução de leite 1% com TBS-T. A tabela 1 resume os anticorpos primários e secundários que foram utilizados para os experimentos de Western Blotting:

Tabela 1: Lista de anticorpos utilizados nos experimentos de Western Blotting

ANTICORPO	MARCA	DILUIÇÃO
anti-TH	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-MAO-A	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-β1-AR	Thermo Fisher Scientific	1:1000
anti-β2-AR	Thermo Fisher Scientific	1:1000
anti-β arrestina 1	Thermo Fisher Scientific	1:1000
anti-β arrestina 2	Thermo Fisher Scientific	1:1000
anti-SERCA2	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
anti-PLN	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
anti-CSQ	ABCAM	1:1000
anti-JPH2	Thermo Fisher Scientific	1:1000
anti-CAV-3	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-HSP90α/β	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
anti-Akt fosforilada (Ser473)	Cell Signaling	1:0000
anti-Akt fosforilada (Thr308)	Cell Signaling	1:1000
anti-GSK3β fosforilada (Ser9)	Cell Signaling	1:1000
Anti-ERK 1/2 Fosforilada	Cell Signaling	1:1000
anti-NGF	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anti-BDNF	Santa Cruz Biotechnology	1:1000

ANTICORPOS SECUNDARIOS	MARCA	DILUIÇÃO
anti-Goat	Sigma-Aldrich	1:15000
anti-Rabbit	Sigma-Aldrich	1:15000
anti-Mouse	Sigma-Aldrich	1:15000

Após a incubação overnight com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (trocado a cada 5 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário adequado conjugado a peroxidase (HRP) por 1 hora. Após este período, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 30 minutos novamente trocado a cada 5 minutos. As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus® e analisadas no Image Quant Las 4000®. O HSP90 α/β ou a expressão da proteína total foram utilizadas como normalizadores da expressão proteica.

5.4 Histologia

Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, e rapidamente submetidos a uma toracotomia com perfusão intracárdica de 1ml de KCl 10% com a agulha posicionada dentro do ventrículo esquerdo para que ocorra a hiperpolarização das células e o coração pare em diástole. Logo após o coração foi coletado, os átrios foram desprezados e os ventrículos foram embebidos no meio OCT Tissue Tek® (#4583, Sakura Finetek) e congelado a 20°C. Após o congelamento o tecido foi cortado em um criostato na espessura de 8 μm , adicionado a lâmina e armazenado a -20°C.

As lâminas contendo os cortes do coração foram fixados com solução 4% de paraformaldeído (PFA) diluído em PBS 1x, por 30 minutos à temperatura ambiente. Logo após, o tecido foi lavado para remoção do excesso de PFA, 3 lavagens com PBS 1x.

5.4.1 Área Celular (tecido)

Para análise morfometria da área celular, o tecido foi incubado por 15 minutos, a temperatura ambiente com Wheat germ agglutinin (WGA) (ab178444 1:200 em PBS), visível no comprimento de onda 555. Esta sonda delimita o contorno celular através da sua ligação a glicoproteínas de membrana. Posteriormente o tecido foi novamente

lavado por 3 vezes com PBS 1x e incubado com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1:500 em PBS) por 5 minutos a temperatura ambiente. O DAPI cora o núcleo celular devido a sua afinidade às regiões AT do DNA. As lâminas foram finalmente lavadas novamente por 3 vezes com PBS 1x e selada com glicerol 60%.

5.4.2 Imunofluorescência (Tecido)

Para marcação de alvos específicos através da técnica de imunofluorescência, após a etapa de fixação, o tecido foi permeabilizado utilizando solução de PBS/Triton 0,3%. Após o bloqueio por 1 hora os tecidos foram lavados com PBS 1x por 3 vezes. Em seguida os tecidos foram incubados overnight a 4°C com anti-TH (Santa Cruz Biotechnology, 1:100, PBS/Triton 0,3%), anti-BDNF (Santa Cruz Biotechnology, 1:100, PBS/Triton 0,3%), anti-NGF (Santa Cruz Biotechnology, 1:100, PBS/Triton 0,3%) ou anti-Ki-67 (Invitrogen, 1:50 PBS/Triton 0,3%). Após este tempo, os tecidos foram novamente lavados com PBS 1x por 3 vezes e foi incubado com anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor 633 (1:500, Invitrogen) por 1 hora a temperatura ambiente. A marcação nuclear foi obtida incubando os tecidos com DAPI (1:500 em PBS).

5.4.3 Morfometria celular e análise de polinucleação (célula)

Os CM previamente isolados foram fixados com solução 4% de PFA diluído em PBS 1x, por 15 minutos à temperatura ambiente. Logo após, procedeu-se à lavagem para remoção do PFA e permeabilização da membrana celular utilizando solução de PBS/Triton 0,3%. Após o bloqueio por 1 hora, os CM foram incubados overnight a 4°C com o anticorpo anti- α -actina (Sigma Aldrich, 1:150 SAB4503474). As células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor 633 (1:500, Invitrogen) por 1 hora a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário e após a incubação com o secundário, as células foram lavadas por 30 minutos com PBS 1x (6 vezes de 5 minutos). A marcação nuclear foi obtida incubando os tecidos com DAPI (1:500 em PBS).

As células citadas nos protocolos acima, foram observadas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 880 Meta (CAPI, ICB, UFMG). As medidas das células foram realizadas usando o software Zen 3.4 Blue edition ou ImageJ e a medida da área celular foi avaliada utilizando o software LSM Image Browser da Zeiss.

5.4 Isolamento de Cardiomiócitos Ventriculares

Os CV dos camundongos adultos foram isolados de acordo com a metodologia previamente descrita por Jesus. *et al.*, 2020. Para este protocolo, o coração foi rapidamente removido e retro-perfundido via método de Langendorff com solução de Tyrode modificada livre de Ca^{2+} (em mmol/L: NaCl, 130; KCl, 5,4; HEPES, 25; MgCl_2 , 0,5; NaH_2PO_4 , 0,33; glicose, 22 e insulina 100U/mL; pH=7,40). Posteriormente, o coração foi perfundido com solução de Tyrode contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de CaCl_2 e colagenase (tipo 2 – 1,2 mg/mL). Após a etapa de digestão química, o órgão foi submetido à digestão mecânica e filtrado para remoção do tecido não digerido. A concentração extracelular de Ca^{2+} foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a 500 $\mu\text{mol/L}$ ao final do processo. Logo após, as células foram novamente centrifugadas e mantidas em solução de Tyrode até os respectivos experimentos.

5.5 Análise de Túbulo-T (célula)

Foi separado 1ml de tyrode com CMs recém isolados (metodologia 5.5), que foram incubados com a sonda di-8-ANNEPS (Thermo Fisher Scientific) concentração de 10 μM , por 30 minutos a temperatura ambiente sobre um agitador orbital. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1x para retirada do excesso da sonda. Finalmente as células, foram observadas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 880 Meta (CAPI, ICB, UFMG). A análise dos túbulos-T foram realizadas usando o software ImageJ.

5.6 Contratilidade Celular

A contratilidade de cardiomiócitos ventriculares foi avaliada como descrito por Jesus. *et al.*, (2020). As células isoladas foram colocadas em uma câmara com base de lâmina de vidro montada sobre a plataforma de um microscópio invertido base de lamínula de vidro montada na platina de um microscópio invertido (TCM 400). No estado estacionário, contrações de 1 Hz foram realizadas através de eletrodos de platina (Myopacer, Campo estimulador, Ionoptix, EUA) com pulsos de voltagem de

duração de 5 ms e uma intensidade de 50V. As células foram visualizadas em um monitor de computador com uma câmera NTSC (Myocam, Ionoptix, EUA), no modo varredura parcial. Esta imagem foi usada para medir o encurtamento celular (índice de contratilidade), em resposta à estimulação elétrica usando um detector de borda de movimento de vídeo (IonWizard, Ionoptix, EUA). Encurtamento das células foi calculado a partir da saída do detector de arestas usando um IonWizard conversor A/D (Ionoptix, Milton, MA, EUA).

5.7 HPLC

Para a dosagem cardíaca de noradrenalina, foi utilizada a técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Resumidamente, os corações foram homogeneizados em 1000 μ L de ácido perclórico (PCA) 0,15 M contendo 0,1 mM de EDTA e 56,857 nM de 3,4-diidroxibenzilamina (DHBA; Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), utilizado como padrão interno. Todas as amostras de um mesmo experimento foram dosadas na mesma análise e a mesma solução de PCA / EDTA / DHBA diluição foi utilizada para Performance Liquid Chromatography todas elas. As amostras em solução foram homogeneizadas e posteriormente centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min, 4 °C. O pellet foi direcionado à dosagem proteica por Bradford, e ao sobrenadante foi acrescentado 600 μ L de Tampão Tris-HCl 1,5 M (pH = 8,5; ajustado com HCl 10 M), EDTA 20 mM, + 10mg de alumina, a qual é a responsável por reter as catecolaminas; e então as amostras permaneceram 30 minutos em agitação orbital. Após esse período, foi realizada a centrifugação (spin) das amostras, retirada do sobrenadante, e a ressuspensão da alumina em 500 μ L de PCA 0,15M; EDTA 0,1mM. As amostras então, foram homogeneizadas por 1 minuto e depois centrifugadas a 12.000 rpm por 20 min, 4 °C e por fim, a sobrenadante foi retirado e injetado no equipamento. A fase móvel do sistema foi constituída de NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,38 mM, em água MiliQ e metanol 6%; pH 3,5 ajustado com H₃PO₄. O fluxo da bomba do HPLC foi ajustado para 1,0 mL/min e o potencial do detector eletroquímico 0,4 V (Decade II, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden). Vinte microlitros de amostra foram injetadas no HPLC com o auxílio de um auto injetor (SIL-10A autosampler, Shimadzu Corporation). As catecolaminas foram separadas em coluna de fase reversa (Purospher Star, 5 μ m, 250 x 4 mm; Merck) precedida de pré-coluna C18 (Lichrospher 5 μ m, 4 x 4 mm; Merck). A

temperatura do forno foi mantida constante a 40 °C. Os dados cromatográficos foram analisados utilizando-se o software Class-VP (Shimadzu, Kyoto, Japão). A noradrenalina foi identificada de acordo com seu tempo de eluição e quantificados utilizando-se curvas de calibração pelo método do padrão interno (DHBA)

5.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. Quando apropriado o teste t-Student foi aplicado. Os resultados foram apresentados com média \pm erro padrão, sendo considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas no programa estatístico Graph Pad Prism versão 8.

6. RESULTADOS

6.1 Desenvolvimento pós-natalde camundongos:

Inicialmente, decidimos avaliar as etapas que são importantes durante o processo de maturação cardíaca, a saber: (i) hipertrofia, (ii) expressão de proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração e (iii) expressão de proteínas envolvidas na gênese e manutenção dos túbulos-T de forma a traçar um panorama amplo do processo maturacional. Para isto, camundongos C57BL/6J de ambos os sexos foram eutanasiados no primeiro de vida (P1), P11, P21 e P45. Neste intervalo de tempo, como esperado, observamos um aumento gradual e significativo no peso do coração, que passou de uma média de $13,5 \pm 1,13$ mg em P1 para $112,7 \pm 6,95$ mg em P45 (aumento percentual de 685.55%) (Figura 10).

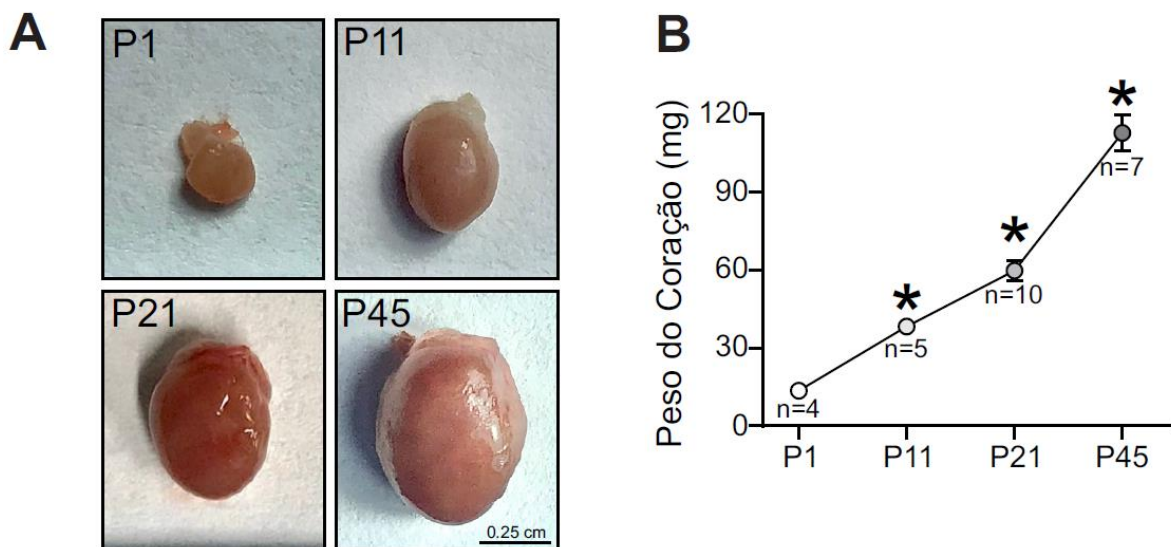


Figura 10: Desenvolvimento pós-natal do coração. A) Imagem representativa de corações coletados em P1 (1 dia de vida pós-natal), P11, P21 e P45. **B)** Gráfico temporal mostrando o peso do coração de camundongos. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ versus os demais grupos. ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. n=número de animais por grupo.

6.2 Desenvolvimento pós-natal de componentes envolvidos no acoplamento excitação-contração, desenvolvimento e manutenção dos túbulos-T

Avaliamos posteriormente como se comportava alguns componentes envolvidos no acoplamento excitação-contração cardíaco e no desenvolvimento de túbulos-T. Os alvos escolhidos foram: SERCA2, junctofilina 2 (JPH2), caveolina-3 (Cav-3) e

calsequestrina. É possível observar na figura 11, que SERCA2, calsequestrina e JPH2 passam por um importante aumento de expressão durante o período pós-natal no tecido cardíaco. Apesar de não apresentar um aumento significativamente diferente, a expressão da Cav-3 também seguiu o mesmo padrão dos alvos anteriores (figura 11D).

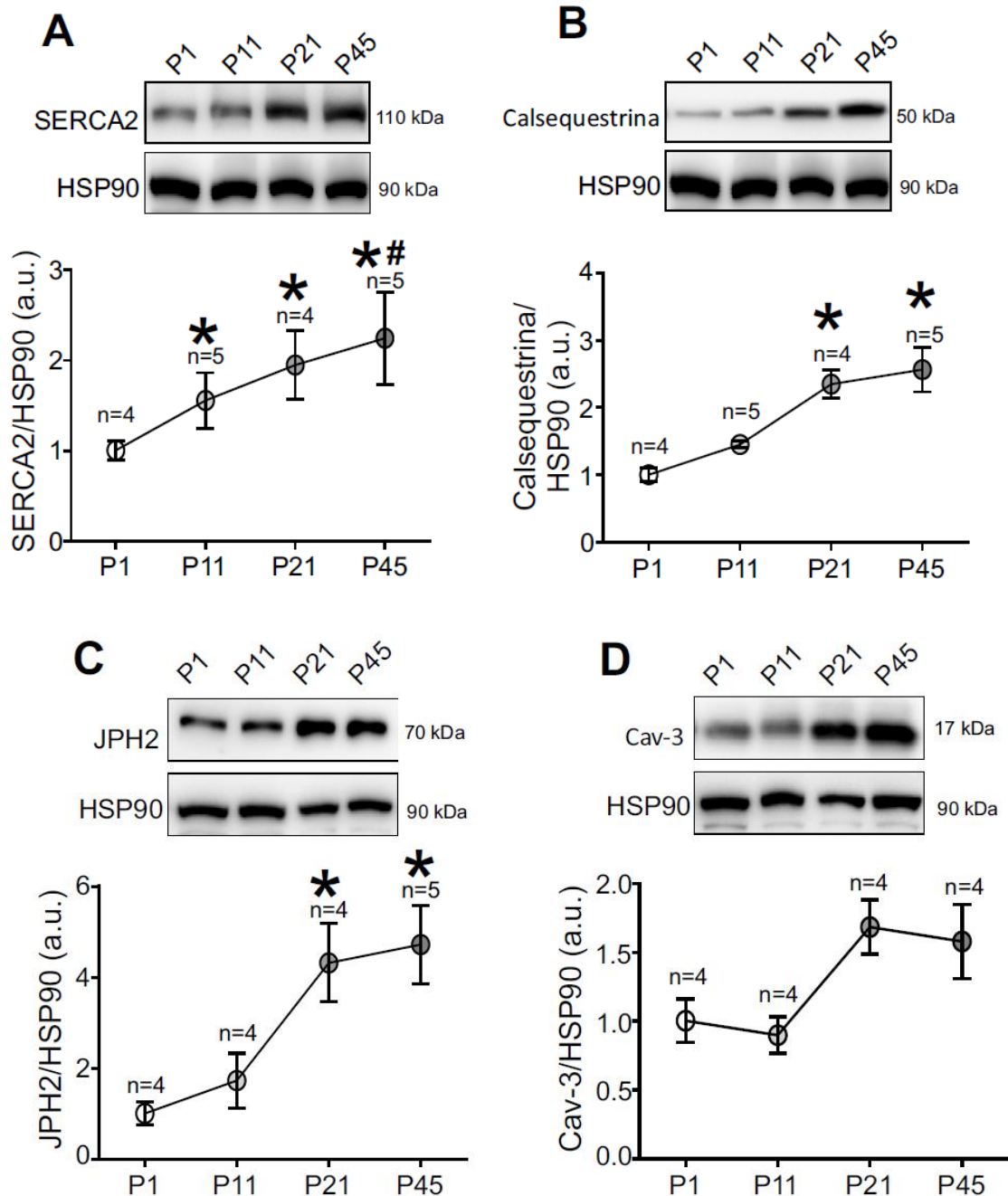
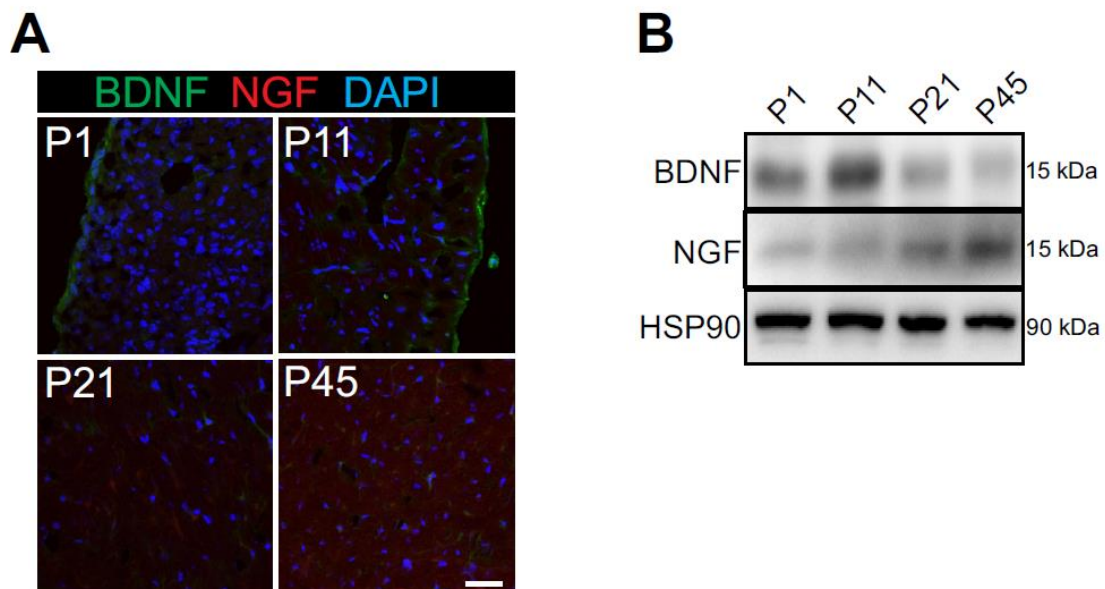


Figura 11: Desenvolvimento dos componentes envolvidos no acoplamento excitação-contração e na formação e manutenção dos túbulos-T. **A)** Superior: Western-blot representativo para SERCA2 normalizada por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão da proteína SERCA2. * $p < 0,05$ versus P1 # $p < 0,05$ versus P11. **B)** Superior: Western-blot representativo para Calsequestrina normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão da proteína Calsequestrina. * $p < 0,05$ versus P1 e P11.

C) Superior: Western-blot representativo para JPH2 normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão da proteína JPH2. * $p < 0,05$ versus P1 e P11. **D)** Superior: Western-blot representativo para Cav-3 normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão da proteína Cav-3. P1 = 1 dia de vida pós-natal, P11 = 11 dias de vida pós-natal, P21 = 21 dias de vida pós-natal e P45 = 45 dias de vida pós-natal. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. n=número de animais.

6.3 Expressão cardíaca das neurotrofinas BDNF e NGF:

Em seguida, seguimos para caracterizar as alterações temporais em vários componentes da sinalização adrenérgica no intervalo entre P1-P45 no coração. Nosso primeiro alvo foram as neurotrofinas *Nerve Growth Factor* (NGF) e *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), que são conhecidas por estarem envolvidas na neogênese, manutenção e integridade da inervação cardíaca (SADOWSKA e MACHALIŃSKI, 2017). De forma interessante, observamos um padrão distinto na expressão de BDNF e NGF no coração (Figura 12). Enquanto BDNF apresenta uma maior expressão proteica nos primeiros dias de vida (P1 e P11), o NGF apresentou um perfil de expressão oposto, com um baixo nível de expressão logo após o nascimento e um aumento progressivo com o decorrer do amadurecimento do animal, atingindo o seu maior nível em P45 (Figura 12).



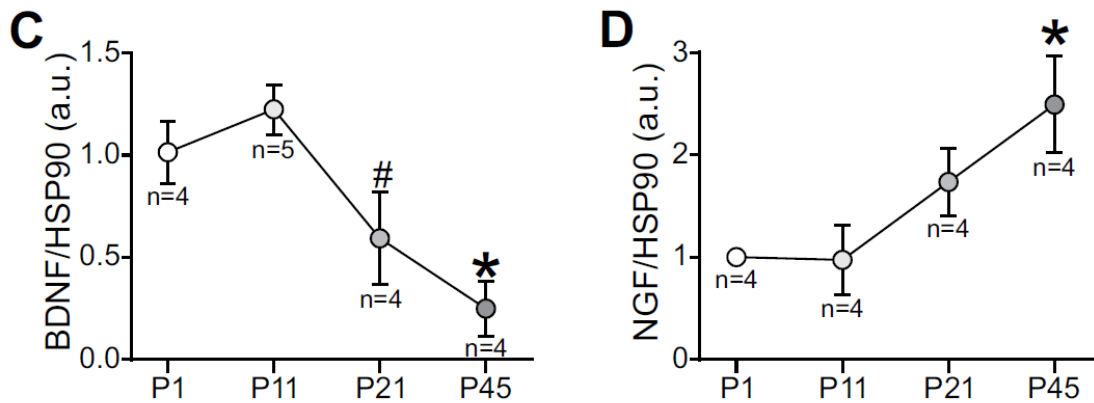


Figura 12: Expressão temporal das neurotrofinas BDNF e NGF no coração. A) Imagem representativa de imunofluorescência realizada em criocortes de corações marcados com NGF em verde, BDNF em vermelho e o núcleo em azul. Barra: 20 μ m. B) Western-blot representativo para BDNF e NGF normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. C e D) Gráfico temporal mostrando a expressão de BDNF e NGF no coração de animais P1 (1 dia de vida pós-natal), P11, P21 e P45. O HSP90 foi utilizado como normalizador. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ versus P1 e P11. # $p < 0,05$ versus P11. ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. n=número de animais.

6.4 Desenvolvimento pós-natal da maquinaria de síntese e degradação de noradrenalina no coração:

Para avaliar o desenvolvimento dos componentes de síntese e degradação de noradrenalina no coração durante o período pós-natal, realizamos imunofluorescência (IF) e Western Blot para: (i) Tirosina Hidroxilase (TH), enzima envolvida na síntese de noradrenalina; e (ii) para Monamina Oxidase A (MAO-A), enzima envolvida na degradação de noradrenalina. Como apresentado na Figura 13A-C, observamos um perfil maturacional semelhante entre a TH e a MAO-A, que se encontram em baixa expressão nos primeiros dias de vida e aumentam de forma progressiva à medida que o animal amadurece. De forma semelhante, o conteúdo de noradrenalina cardíaco, avaliado por meio da técnica de HPLC, apresenta um aumento progressivo entre P1 e P21, estabilizando neste último e permanecendo constante até P45 (Figura 13D).

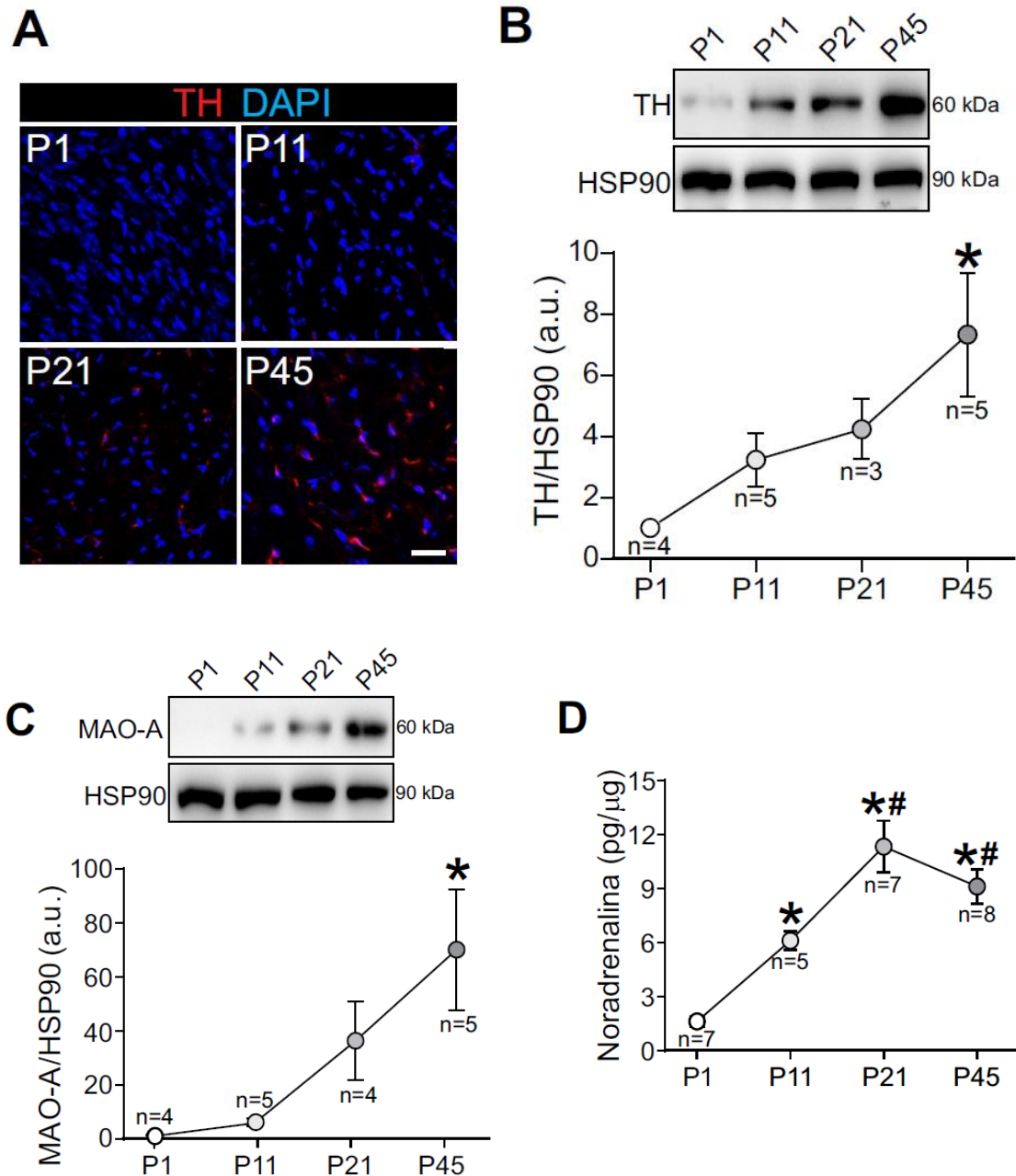
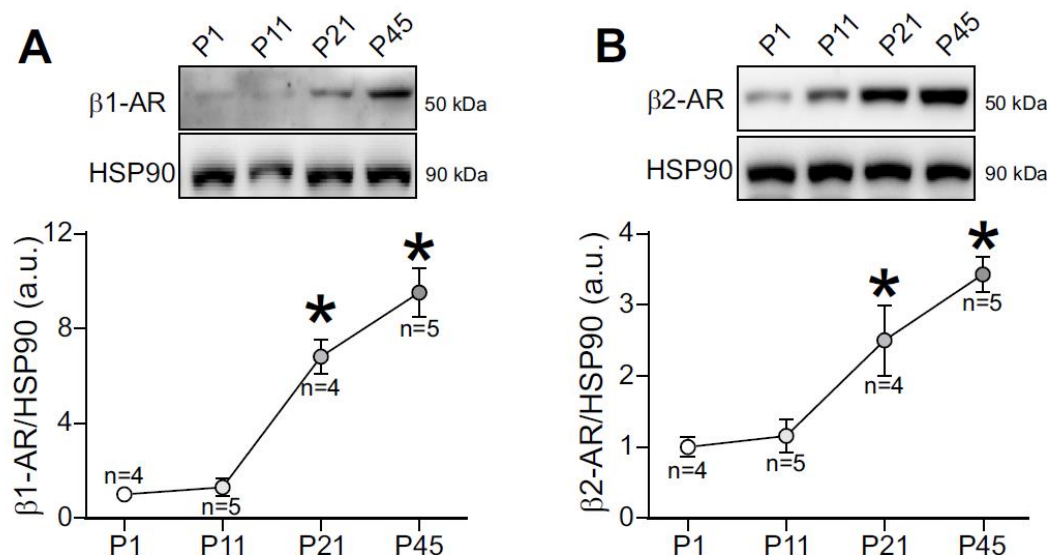


Figura 13: Desenvolvimento pós-natal da maquinaria de síntese e degradação de noradrenalina no coração. **A)** Imagem representativa de imunofluorescência realizada em criocortes de corações marcados com TH em vermelho e o núcleo em azul. Barra: 20 μ m. **B)** Superior: Western-blot representativo para TH normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão relativa de TH. * $p < 0,05$ versus P1. **C)** Superior: Western-blot representativo para MAO-A normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão relativa de MAO-A. * $p < 0,05$ versus P1 e P11. **D)** Gráfico temporal mostrando o conteúdo cardíaco de noradrenalina dosado através de HPLC. * $p < 0,05$ versus P1. # $p < 0,05$ versus P11. P1 = 1 dia de vida pós-natal, P11 = 11 dias de vida pós-natal, P21 = 21 dias de vida pós-natal e P45 = 45 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. n=número de amostras ou animais.

6.5 Desenvolvimento pós-natal de componentes celulares da sinalização β -adrenérgica.

Os receptores β -AR são uma peça fundamental na sinalização adrenérgica cardíaca (GUYTON e HALL, 2017). Sendo assim, avaliamos de forma temporal durante o período pós-natal, a expressão dos dois principais subtipos de receptores β -AR (β 1-AR e β 2-AR) presentes no coração. É possível verificar na Figura 14A e 14B, que tanto os receptores β 1-AR como os β 2-AR, aumentam subitamente sua expressão no tecido cardíaco em P21 quando comparado com níveis observados em P11.

A expressão dos receptores β -AR é regulada, em grande parte pelas proteínas β -arrestinas que se ligam ao domínio intracelular do receptor e obstruem fisicamente o acoplamento da proteína G ao receptor, podendo posteriormente induzir internalização e degradação do mesmo (JEAN-CHARLES, KAUR e SHENOY, 2017). Enquanto a expressão da β -Arrestina2, acompanha o padrão de expressão temporal geral dos receptores β -AR (Figura 14C-D), o mesmo não é observado com relação a expressão da β -Arrestina1, provavelmente por este subtipo interagir de forma menos intensa com os receptores de classe A, como os receptores β -AR (OAKLEY et al., 2000).



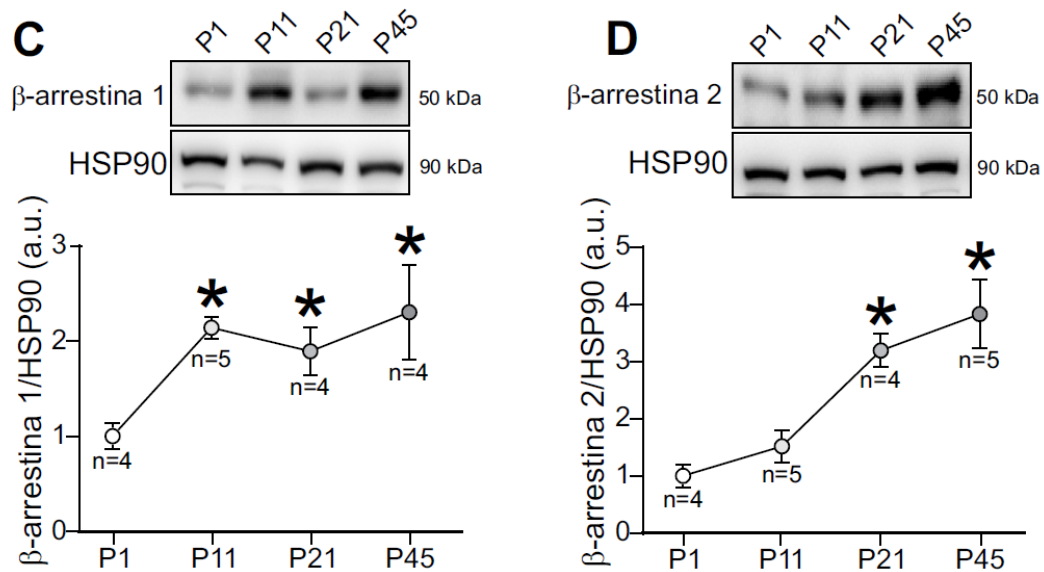


Figura 14: Desenvolvimento de componentes celulares da sinalização β -adrenérgica no tecido cardíaco. **A)** Superior: Western-blot representativo para receptores β 1-AR normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão do receptor β 1-AR. * $p < 0,05$ versus os demais grupos. **B)** Western-blot representativo para receptores β 2-AR normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão relativa do receptor β 2-AR. * $p < 0,05$ versus os demais grupos. **C)** Western-blot representativo para β -arrestina 1 normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Inferior: Gráfico temporal mostrando a expressão relativa da β -arrestina 1. * $p < 0,05$ versus P1. **D)** Western-blot representativo para β -arrestina 2 normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração. Gráfico temporal mostrando a expressão relativa da β -arrestina 2. * $p < 0,05$ versus P1 e P11. P1 = 1 dia de vida pós-natal, P11 = 11 dias de vida pós-natal, P21 = 21 dias de vida pós-natal e P45 = 45 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. n=número de animais.

6.6 O tratamento com 6-OHDA abole a expressão de TH

Considerando os dados obtidos até o momento que mostram a maturação da maquinaria de sinalização adrenérgica no estágio P21, em que todos os seus componentes já se encontram presentes e com o objetivo de avaliar o impacto da desnervação simpática sobre processos-chaves da maturação cardíaca, avançamos para o tratamento de camundongos com a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a fim de promover uma simpatectomia química. Os animais receberam a primeira dose da 6-OHDA em P1 (100 mg/kg, subcutâneo) e segunda dose em P11 (100 mg/kg, subcutâneo), sendo posteriormente eutanasiados em P21 e P45. Para confirmar a efetividade do tratamento, avaliamos por western blotting a expressão da TH, um marcador da presença de neurônios catecolaminérgicos. Na figura 15, é possível observar que a 6-OHDA reduziu em 97% e 95% a expressão da TH nos corações coletados em P21 e P45, respectivamente.

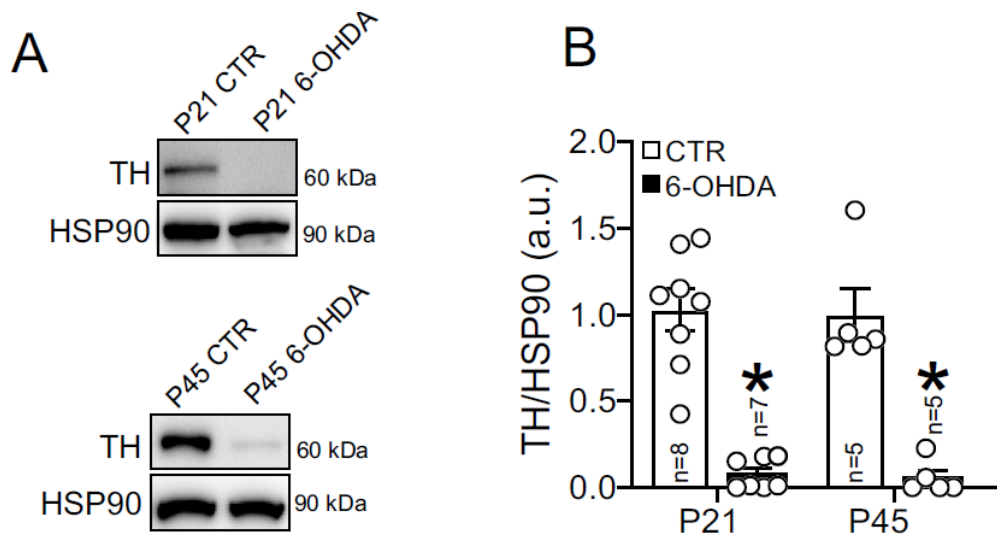


Figura 15: O tratamento com 6-OHDA reduz a expressão da TH no tecido cardíaco. A) Superior: Western-blot representativo para TH normalizado por HSP90, realizado em homogenatos de coração em P21 (imagem superior) e P45 (imagem inferior). **B)** Gráfico de barras mostrando a expressão de TH em animais P21 e P45 controles (CTR) e tratados com 6-OHDA. * $p < 0,05$ versus CTR da mesma idade. P21 = 21 dias de vida pós-natal e P45 = 45 dias de vida pós-natal. Resultados: expressos em média \pm erro padrão da média. Teste-t Student. n=número de animais.

Após a confirmação da efetividade da simpatectomia farmacológica (figura 15) avaliamos a expressão dos receptores β 1-AR e β 2-AR no coração de animais tratados com 6-OHDA. A Figura 16 mostra que a desnervação simpática não alterou a expressão destes receptores no coração.

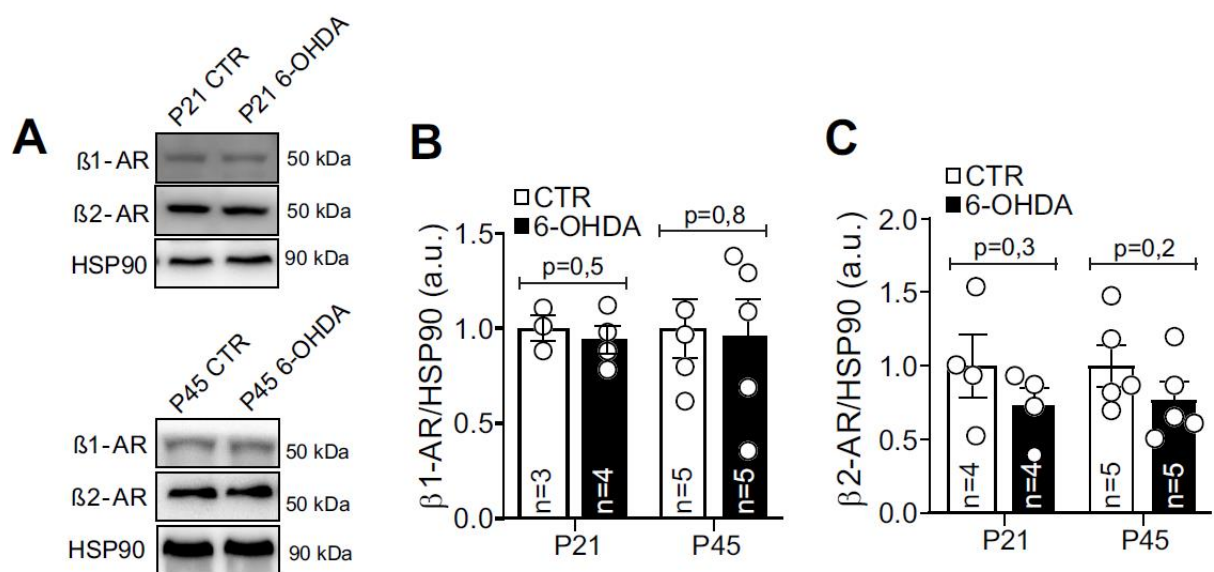


Figura 16: A desnervação simpática não altera a expressão dos receptores β 1 e β 2 adrenérgicos no coração. A) Superior: Western-blot representativo para os receptores β 1-AR e β 2-AR normalizados

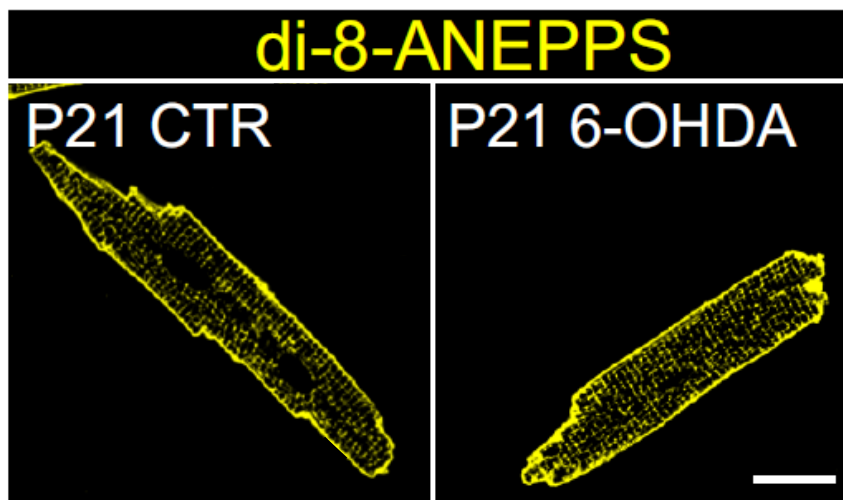
por HSP90 realizado em homogenatos de coração de animais P21 controle (CTR) ou tratados com 6-OHDA. Inferior: Western-blot representativo para os receptores β 1-AR e β 2-AR normalizado por HSP90 realizado em homogenatos de coração de animais P45 controle (CTR) ou tratados com 6-OHDA. **B)** Gráfico de barras mostrando a expressão dos receptores β 1-AR em P21 e P45 CTR ou 6-OHDA. **C)** Gráfico de barras mostrando a expressão relativa dos receptores β 2-AR em P21 e P45 CTR ou 6-OHDA. P21 = 21 dias de vida pós-natal e P45 = 45 dias de vida pós-natal. Resultados: expressos em média \pm erro padrão da média. Teste-t Student. n=número de animais.

Tendo em vista os resultados anteriores que mostraram que a 6-OHDA foi efetiva em promover a desnervação simpática no coração, sem causar alteração na expressão dos receptores β -AR neste tecido, decidimos investigar neste modelo vários parâmetros que estão envolvidos com a maturação cardíaca: i) presença de túbulos-T; ii) função contrátil dos cardiomiócitos e iii) hipertrofia de cardiomiócitos.

6.7 A desnervação simpática não altera a presença dos de Túbulos-T no cardiomiócito ventricular

Para avaliar a influência da desnervação simpática sobre a presença de túbulos-T, cardiomiócitos ventriculares de animais P21 controle (CTR) ou tratados com 6-OHDA foram isolados e marcados com uma sonda fluorescente específica para túbulos-t, o di-8-ANEPPS. Ao analisarmos a densidade de elementos transversos e longitudinais, densidade total e integridade dos túbulos-T em células de animais controles e desnervados, observamos que todos estes parâmetros se encontram inalterados (Figura 17A-E), sugerindo que a desnervação simpática não impacta de forma significativa no aparecimento e manutenção de túbulos-T nos cardiomiócitos ventriculares. Corroborando este dado, não observamos diferença na expressão da Cav-3 e JPH2 entre os animais P21 CTR e P21 6-OHDA (17F-H).

A



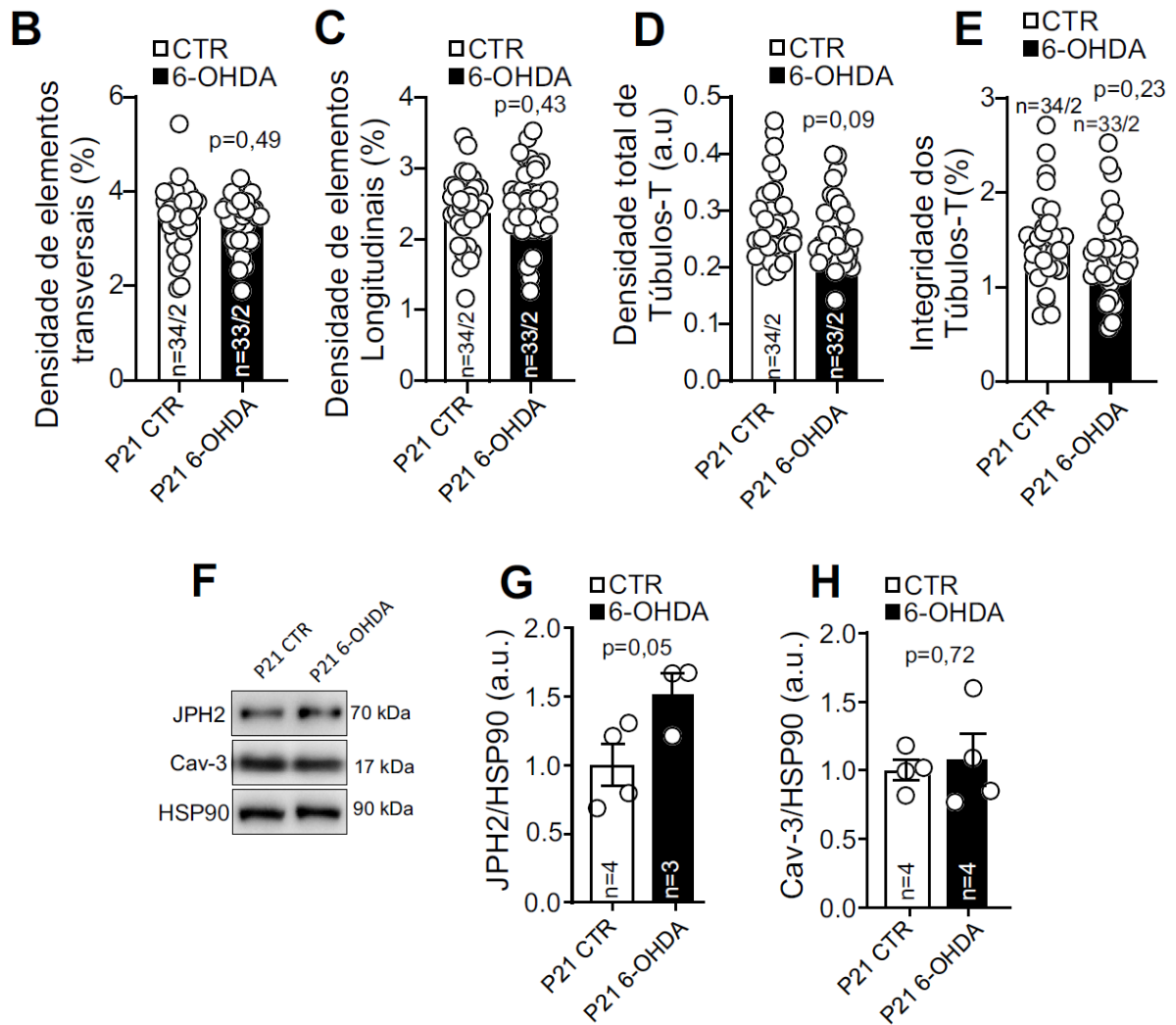


Figura 17: A desnervação simpática não altera a ocorrência e distribuição de túbulos-t no cardiomiócito ventricular. A) Imagem representativa obtida por microscopia confocal de cardiomiócitos ventriculares marcados com di-8-ANEPPS, isolados de animais P21 controles (CTR) ou tratados com 6-OHDA. Barra = 20 μ m. **B-E)** Gráfico de barras mostrando a densidade de elementos transversais (B), densidade de elementos longitudinais (C), densidade total de túbulos-T (D) e integridade dos túbulos-T (E) de cardiomiócitos ventriculares P21 CTR ou P21 6-OHDA. $P > 0,05$ versus grupo P21 CTR em todos os grupos. P21 = 21 dias de vida pós-natal. Teste-t Student. n= número de células analisadas/número de animais. **F-H)** Western-blot representativo para Junctofilina (JPH2) e Caveolina-3 (CAV-3) normalizado por HSP90 realizado em homogenatos de coração (F), Gráfico de barras mostrando a expressão de JPH2 e CAV-3 respectivamente.

6.8 A desnervação simpática não altera a função contrátil de cardiomiócitos ventriculares:

Com o intuito de avaliar qual a implicação funcional da desnervação simpática no cardiomiócito ventricular, comparamos a fração de encurtamento de células isoladas de animais P21 CTR e 6-OHDA. Como podemos observar na Figura 18, a ausência da inervação simpática não comprometeu a fração de encurtamento de células estimuladas a 1Hz.

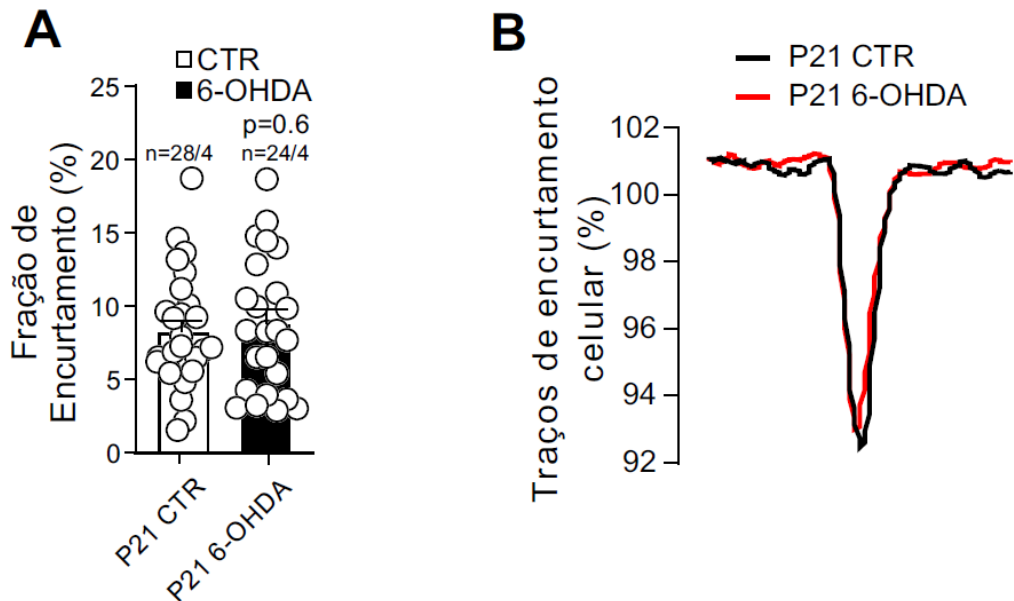


Figura 18: A desnervação simpática não altera a fração de encurtamento de cardiomiócitos ventriculares. **A)** Gráfico de barras mostrando a fração de encurtamento de cardiomiócitos ventriculares de animais P21 controle (CTR) ou tratados com 6-OHDA **B)** Traços representativos do encurtamento de cardiomiócitos de camundongos P21 controle (CTR) e tratados com 6-OHDA sobrepostos. P21 = 21 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão. Teste-t Student. n=número de células/número de animais

6.9 A desnervação simpática não altera expressão de células YFP+ em animais repórter para MYH7

Uma das características da maturação cardíaca, é o silenciamento de diversos genes fetais. Em especial, podemos citar o gene *Myh7*. Este gene em questão, é silenciado pois a proteína que o mesmo codifica, a cadeia pesada de miosina do subtipo β (β -MHC) deixa de ser expressa à medida que o animal vai amadurecendo, sendo substituída pelo subtipo α -MHC. A transição do fenótipo β -MHC para o fenótipo α -MHC é um indicativo maturacional. Avaliamos no animal repórter *Myh7*-YFP, a porcentagem de células YFP+, que nos indica a presença do subtipo β -MHC. Não foi observada diferença significativa entre os animais WT e tratados com 6-OHDA. Este resultado indica que o processo de silenciamento do gene fetal *Myh7* ocorreu de forma satisfatória.

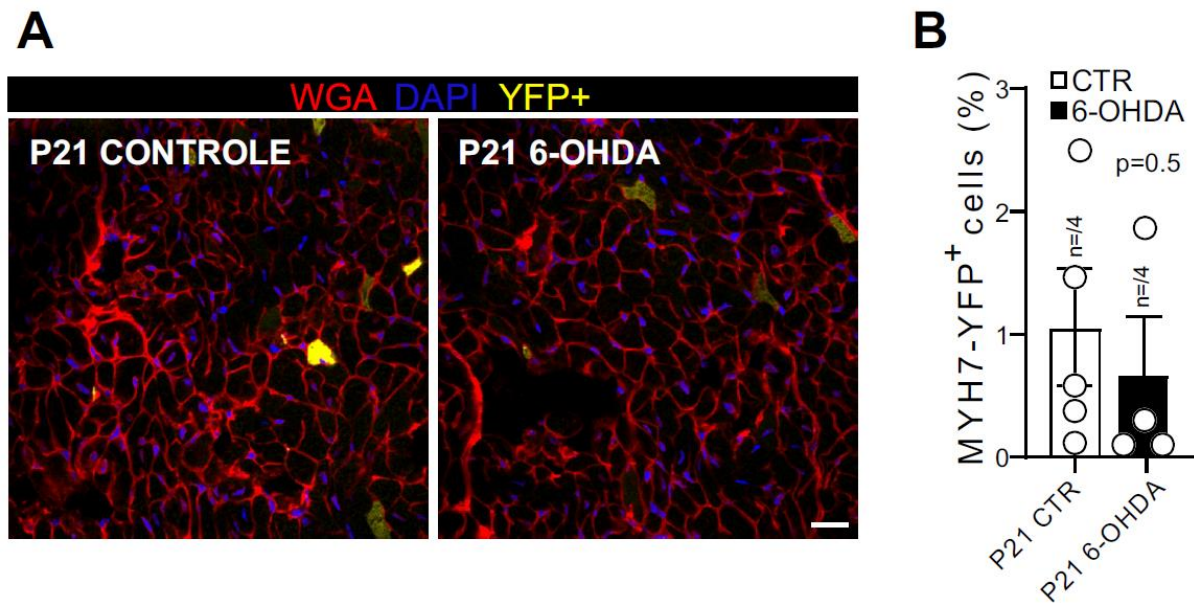


Figura 19: A desnervação simpática não altera expressão de células YFP+ em animais repórter MYH7-YFP **A)** Imagem representativa de imunofluorescência realizada em criocortes de corações marcando a membrana plasmática com WGA (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). Células amarelas representam cardiomiócitos que expressam β -MHC. Barra= 20 μ m. **B)** Gráfico de barras mostrando a porcentagem de células YFP+ em relação ao número total de células de animais P21 (CTR) e tratados com 6-OHDA. * $p<0,05$ versus P21 CTR. P21= 21 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste-t Student: n=número de animais.

6.10 A desnervação simpática desacelera o crescimento cardíaco pós-natal

Em sequência, avaliamos se a inervação simpática contribui para o crescimento cardíaco pós-natal. Tanto nos animais P21 como nos P45, observamos uma redução na relação do peso do coração normalizado pelo tamanho da tíbia nos animais 6-OHDA, quando comparados aos seus respectivos controles da mesma idade (figura 20A). Corroborando este dado, a desnervação simpática reduziu de forma significativa a área de secção transversa dos CM em P21 e P45 quando comparado aos seus controles (Figura 20B).

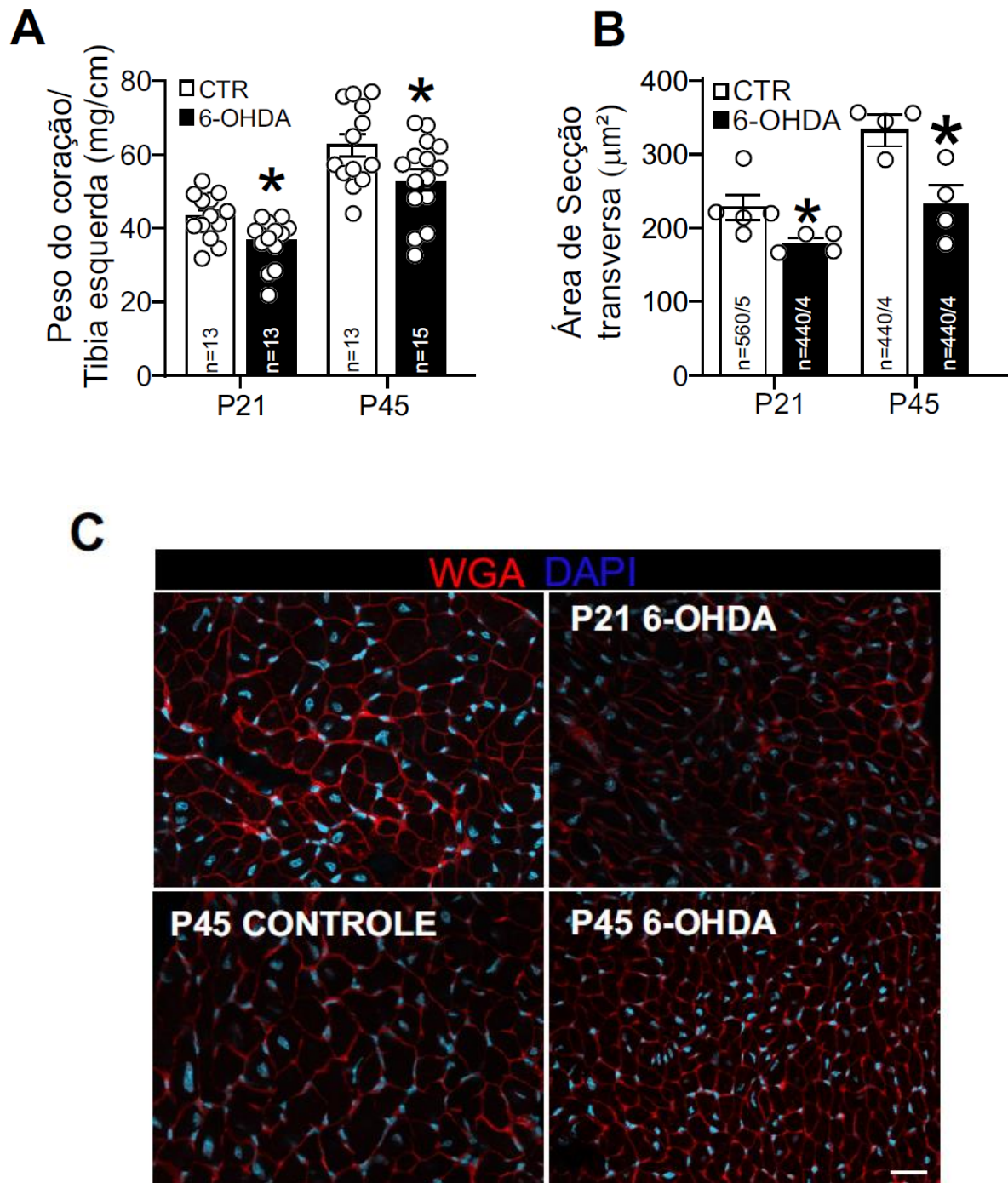


Figura 20: A desnervação simpática desacelera o crescimento cardíaco pós-natal **A)** Gráfico de barras mostrando a relação do peso do coração normalizado pelo tamanho da tíbia esquerda de animais P21 e P45 controles (CTR) ou tratados com a 6-OHDA. * $p < 0,05$ versus CTR da mesma idade. **B)** Gráfico de barras mostrando o tamanho da área de secção transversa dos cardiomiócitos de animais P21 e P45 controles (CTR) ou tratados com a 6-OHDA. * $p < 0,05$ versus CTR da mesma idade. **C)** Imagem representativa de imunofluorescência realizado em criocortes de corações marcando a membrana plasmática com WGA (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). Barra 20 µm. P21= 21 dias de vida pós-natal e P45= 45 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste-t Student Em A: n=número de animais. Em B: número de células analisadas/número de animais.

Com o intuito de afunilar nossos resultados, decidimos isolar cardiomiócitos ventriculares de camundongos P21 controles e tratados com 6-OHDA. Nestas células, medimos o comprimento, largura e área celular. Na Figura 21A são apresentadas imagens representativas obtidas em microscópio confocal de cardiomiócitos ventriculares marcados com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul) de animais P21 controles ou 6-OHDA. Na análise destas células, observamos redução no comprimento e na área das células dos animais P21 6-OHDA, porém, esta diferença não foi observada na largura celular (Figura 21B).

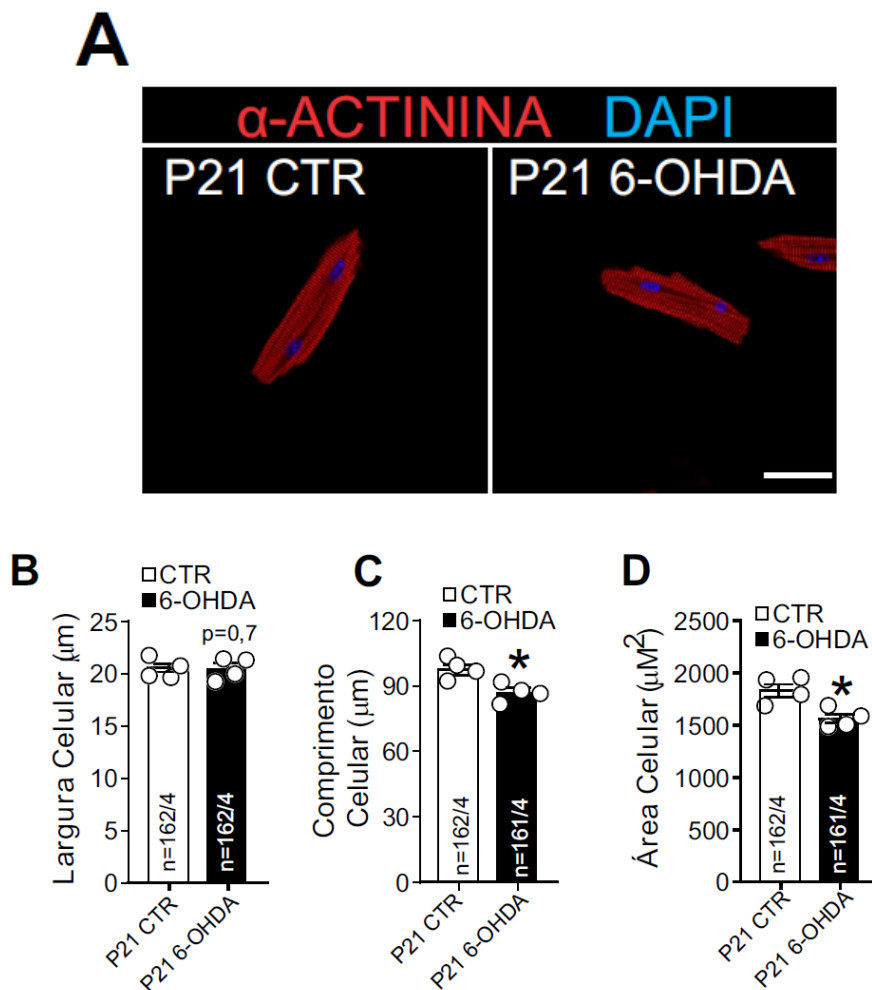


Figura 21: A desnervação simpática prejudica o crescimento de cardiomiócitos ventriculares. A) Imagem representativa de microscopia confocal de cardiomiócitos isolados de camundongos P21 controle (CTR) ou tratados com 6-OHDA. Estas células foram marcadas com α -actinina (vermelho) e DAPI (azul). Barra 20 μm . **B-D)** Gráfico de barras com a análise da largura (B), comprimento (C) e área celular (D) de cardiomiócitos ventriculares P21 CTR ou P21 6-OHDA. * $p < 0,05$ versus grupo P21 CTR. P21 = 21 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste-t Student. n= número de células analisadas/número de animais.

Baseado nos achados supracitados mostrando que a desnervação simpática desacelera o crescimento cardíaco pós-natal, sem impacto pronunciado na função contrátil ou na ocorrência de túbulos-T, buscamos investigar a nível molecular como essa inervação simpática contribui para hipertrofia cardíaca pós-natal.

6.11 A desnervação simpática atenua a fosforilação de proteínas pró-hipertróficas

O crescimento cardíaco é um processo complexo que envolve o recrutamento de diversas vias intracelulares. Uma vez observado que a desnervação simpática reduz o tamanho do coração, nos perguntamos como estaria o nível de fosforilação de proteínas classicamente envolvidas na resposta hipertrófica cardíaca, como as vias PI3K/AKT e ERK1/2. Constatamos uma atenuação na fosforilação de AKT (sítios Ser473 e Thr 308), GSK3 β e ERK1/2 (Figura 22A, B, C e D respectivamente), sugerindo uma possível participação dessas vias na desaceleração do crescimento hipertrófico cardíaco pós-natal promovida pela desnervação simpática.

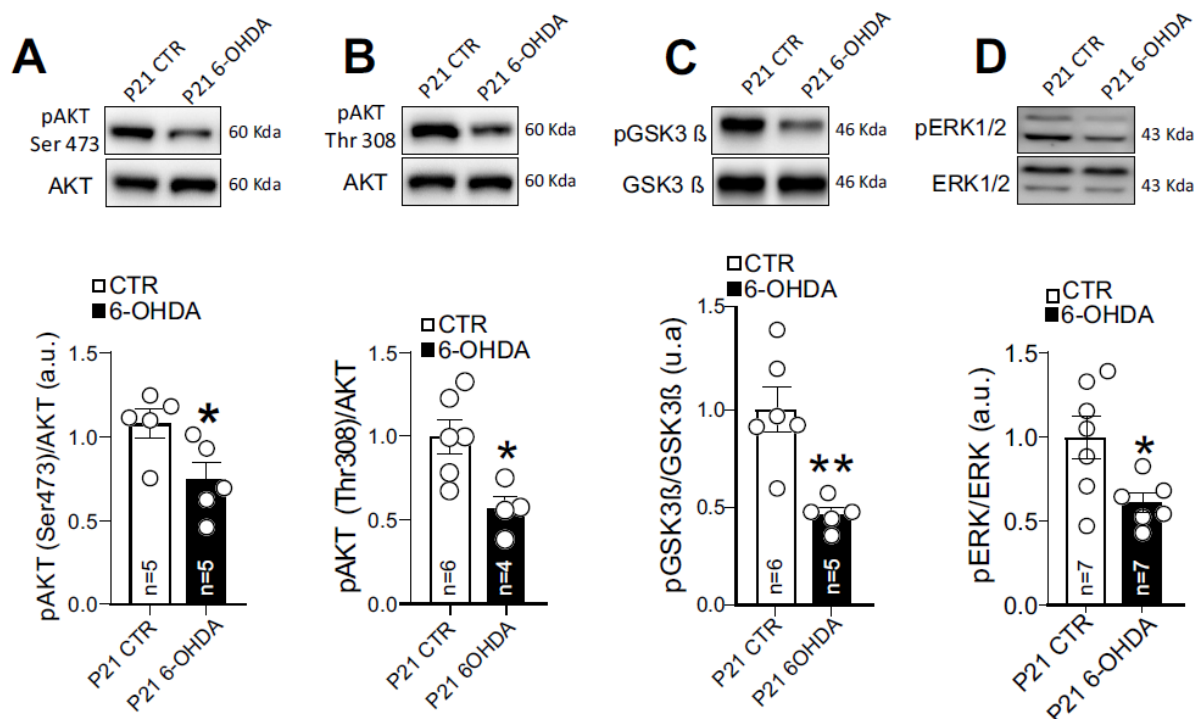


Figura 22. A desnervação simpática prejudica a fosforilação de proteínas pró-hipertróficas. Superior: Western-blot representativo para as proteínas pAKT(Ser473 e Thr308)/AKT (A-B), pGSK3 β /GSK3 β (C) e pERK/ERK (D). Inferior: Gráfico de barras mostrando o nível de fosforilação das proteínas pAKT(Ser473 e Thr308) (A-B), pGSK3 β (C) e pERK (D) em camundongos P21 controle (CTR) ou tratados com 6-OHDA. O western blots foram normalizados pelas respectivas proteínas totais.

* $p < 0,05$ versus grupo P21 CTR. P21 = 21 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão. Teste-t Student. n=número de animais.

6.12 O antagonismo dos receptores β -AR prejudica o crescimento cardíaco pós-natal

Para investigar a participação dos receptores β -AR no crescimento cardíaco pós-natal, intervenções farmacológicas e o uso de animais geneticamente modificados foram utilizados. Inicialmente, camundongos P11 foram tratados durante 10 dias com propranolol (5 mg/kg, i.p.), um antagonista não seletivo dos receptores β -AR. Neste protocolo experimental, observamos que o propranolol reduziu a área de seção transversa dos cardiomiócitos (Figura 23).

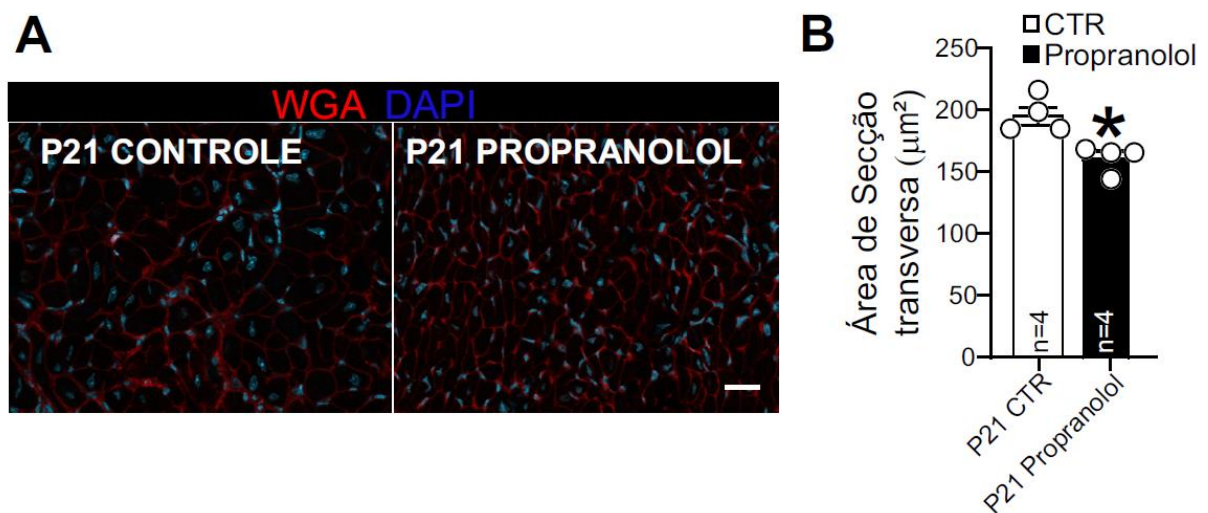


Figura 23: antagonismo dos receptores β -AR desacelera o crescimento cardíaco pós-natal **A)** Imagem representativa de imunofluorescência realizada em criocortes de corações marcados na membrana plasmática com WGA (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). Barra=20 μ m. **B)** Gráfico de barras mostrando o tamanho da área de seção transversa dos cardiomiócitos de animais P21 (CTR) ou tratados com propranolol. * $p < 0,05$ versus P21 CTR. P21= 21 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste-t Student: n=número de animais.

Com o objetivo de distinguir separadamente a participação dos dois principais receptores β -AR presentes no coração no processo de hipertrofia cardíaca pós-natal, utilizamos: (i) o atenolol como antagonista seletivo dos receptores β 1-AR, seguindo o mesmo regime de tratamento realizado com o propranolol e (ii) o camundongo nocaute global para o receptor β 2-AR (β 2-KO). Camundongos β 2-KO e WT foram sacrificados em P21. Tanto os animais tratados com atenolol quanto os animais β 2-KO apresentaram diminuição na área de seção transversa dos cardiomiócitos, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 24A-D)

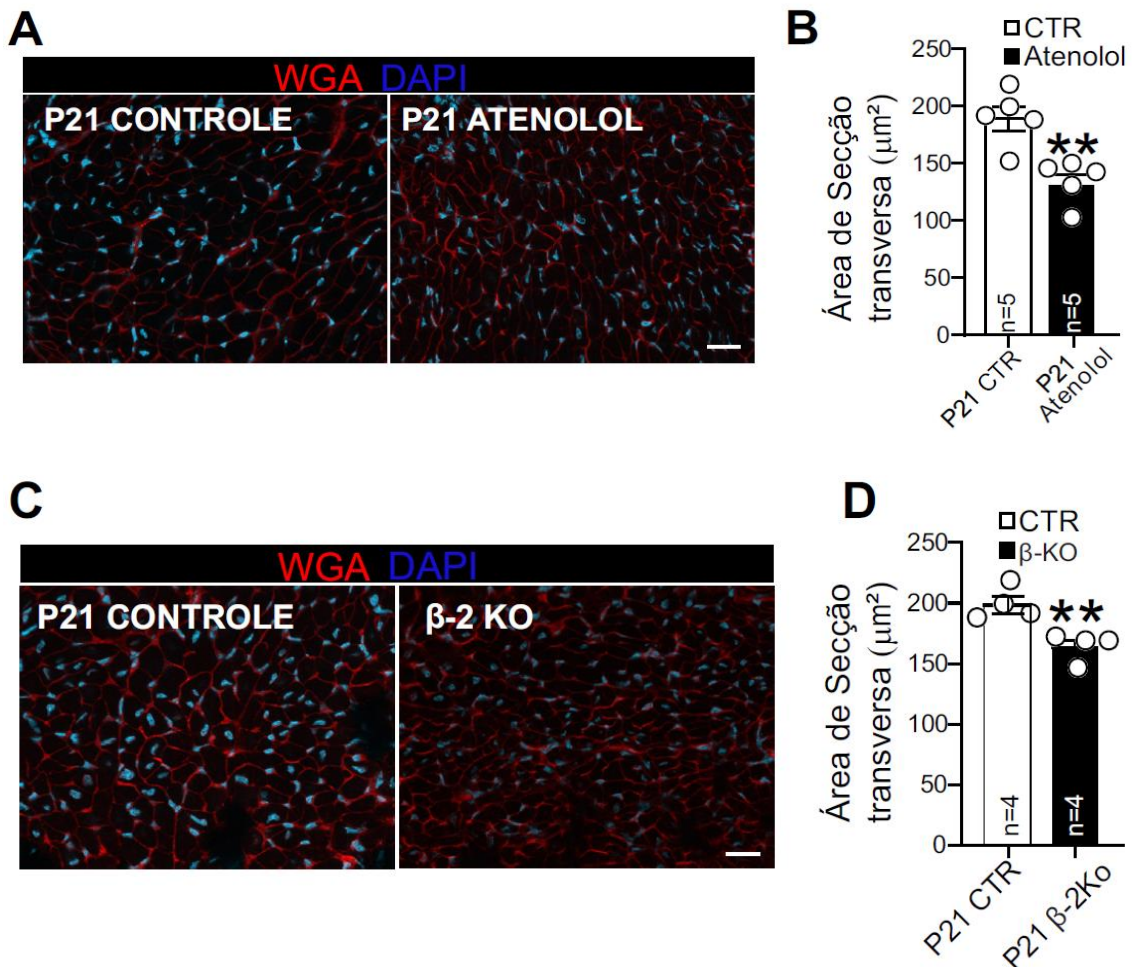


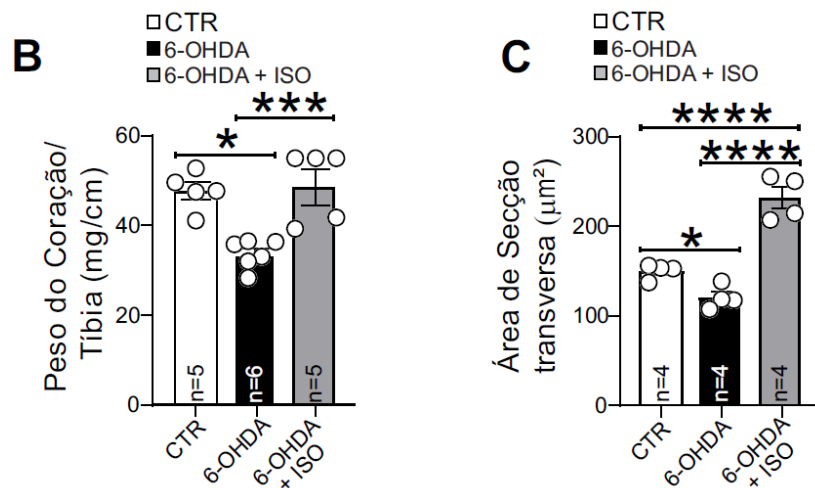
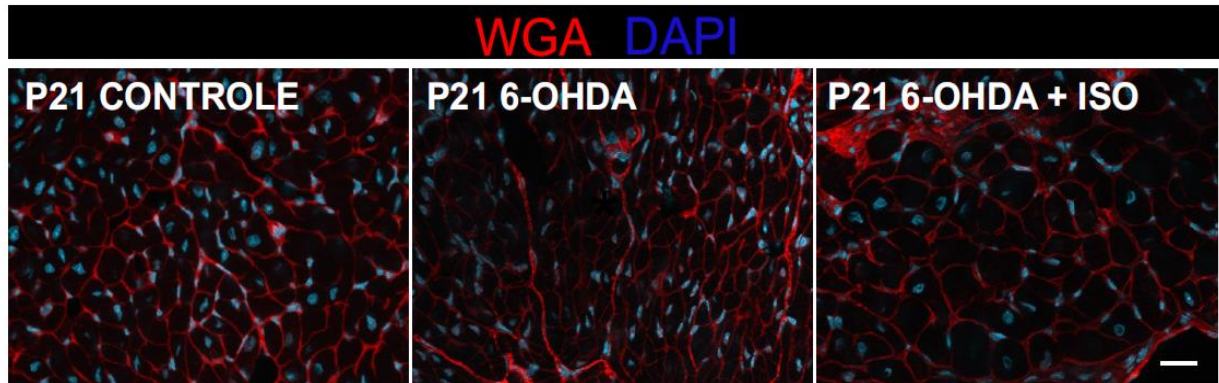
Figura 24. O antagonismo dos receptores β_1 -AR e animais transgênicos β_2 -KO apresentam prejuízo no crescimento cardíaco pós-natal. A e C) Imagem representativa de imunofluorescência realizada em criocortes de corações marcando a membrana plasmática com WGA (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). Barra=20 μm . **B e D)** Gráfico de barras mostrando o tamanho da área de secção transversa dos cardiomiócitos de animais P21 (CTR) e tratados com Atenolol ou P21 (CTR) e β_2 -KO. * $p < 0,05$ versus P21 CTR. P21= 21 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste-t Student: n=número de animais.

6.13 A estimulação β -adrenérgica reverte o fenótipo induzido pela 6-OHDA

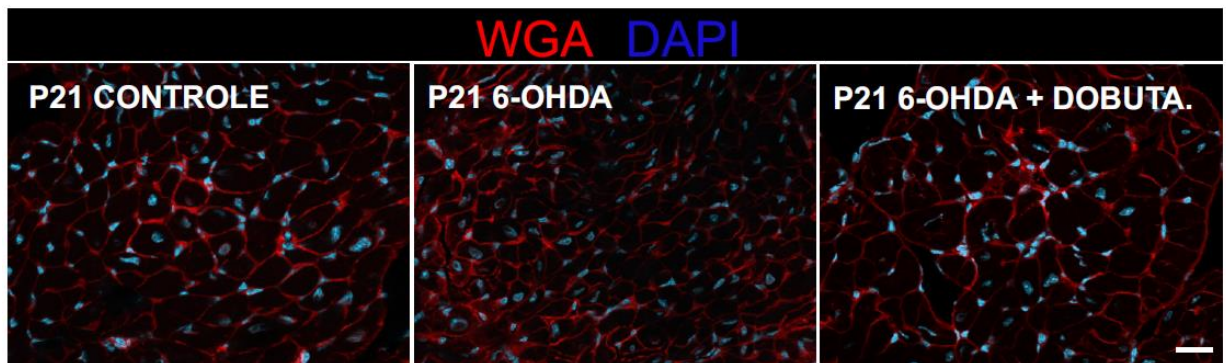
Para reforçar os resultados acima, optamos por estimular os receptores β -AR de animais previamente desnervados, dentro da janela de maturação cardíaca pós-natal (P1-P21). Para isto, tratamos camundongos 6-OHDA com isoproterenol (agonista não seletivo dos receptores β -AR, 5 mg/kg, i.p.), dobutamina (agonista seletivo dos receptores β_1 -AR, 5 mg/kg, i.p.) ou com formoterol (agonista seletivo dos receptores β_2 -AR, 5 mg/kg, i.p.). É possível observar na figura 25, que todos os 3 regimes de tratamento, reverteram o perfil de crescimento promovido pela

desnervação simpática, observado tanto na relação do peso do coração normalizado pelo tamanho da tíbia (Figura 25 B, E e H) quanto na área de secção transversa da fibra cardíaca (Figura 25 C, F e I). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem fortemente a participação de ambos os receptores β -AR no processo de indução do crescimento hipertrófico de cardiomiócitos no estágio pós-natal.

A



D



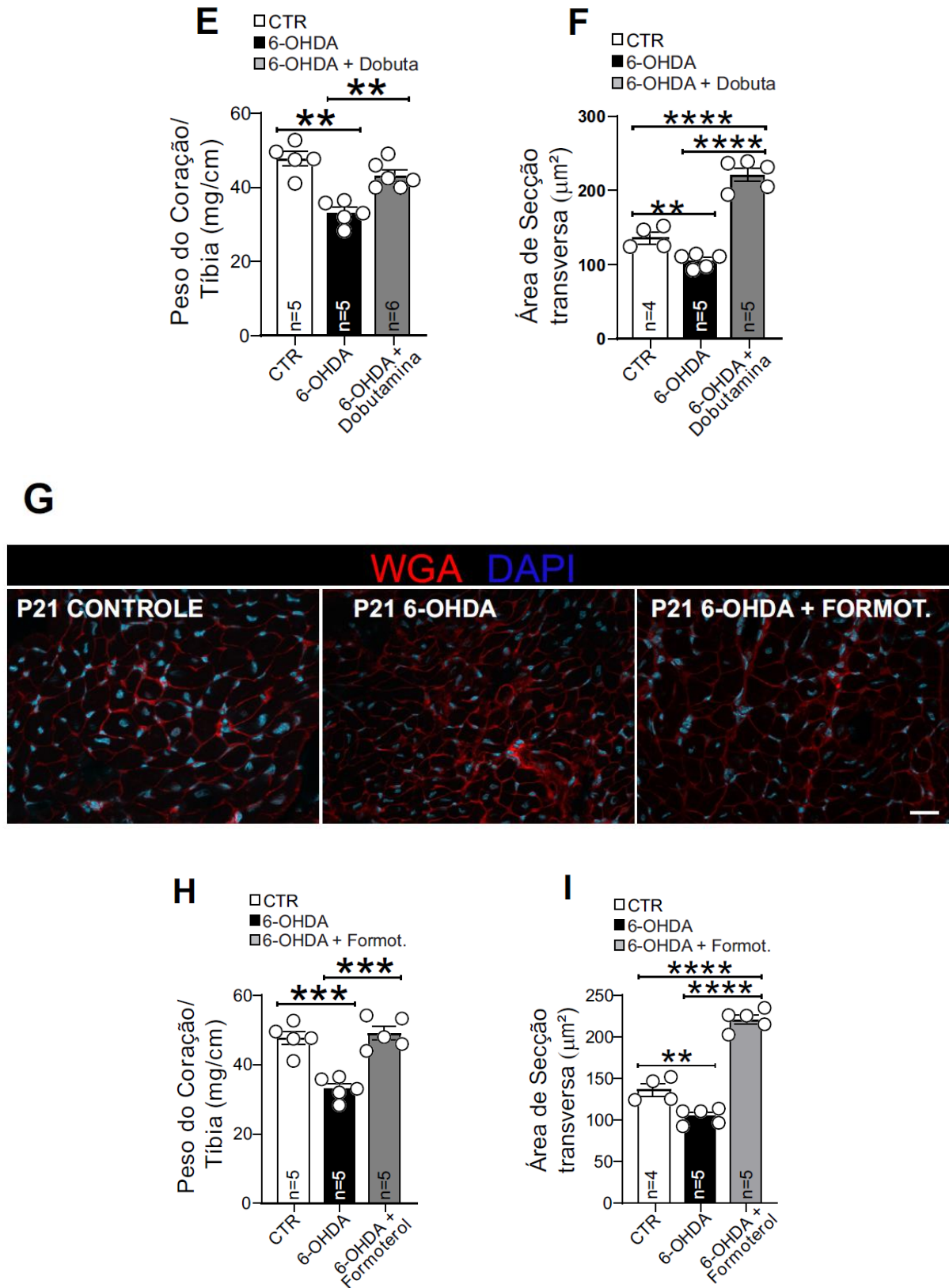
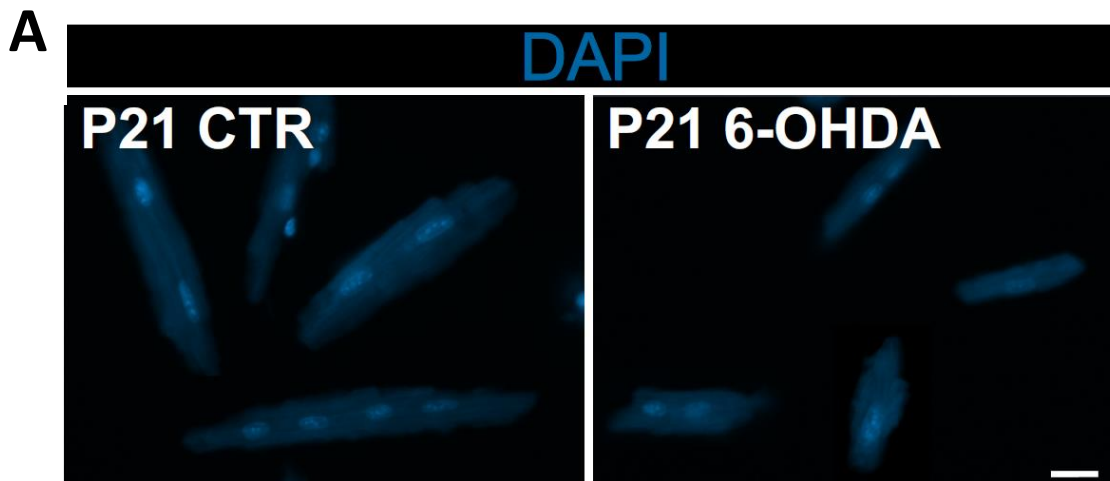


Figura 25. A estimulação β -adrenérgica reverte o remodelamento atrófico induzido pela 6-OHDA. A, D e G) Imagem representativa de imunofluorescência realizado em criocortes de corações marcando a membrana plasmática com WGA (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul). Barra 20 μm . B, E e H) Gráfico de barras mostrando o peso do coração normalizado pelo tamanho da tíbia em P21 (CTR), tratados com dobutamina ou formoterol respectivamente. C, F e I) Gráfico de barras mostrando o tamanho da área de secção transversa dos cardiomiócitos de animais P21 (CTR), tratados com 6-

OHDA e tratados com 6-OHDA + dobutamina ou formoterol respectivamente. * $p < 0,05$ versus P21 CTR. P21= 21 dias de vida pós-natal. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média. ANOVA One-way seguido de Newman-Keuls. n=número de animais.

6.14 A deservação simpática prejudica o processo de polinucleação dos cardiomiócitos ventriculares:

Uma fase importante do processo de diferenciação final dos CMs, é o processo de polinucleação dos cardiomiócitos. A binucleação está presente em aproximadamente 80% das células maduras de roedores (GUO e PU, 2020). Para observar a influência da inervação simpática sobre este marcador, isolamos cardiomiócitos ventriculares de camundongos controle e desnervados no 21^o dia de vida pós-natal e coramos estas células com DAPI (Fig.26A). Observamos que o processo de binucleação celular não foi prejudicado, visto que aproximadamente 80% dos cardiomiócitos de ambos os grupos se tornaram binucleados, corroborando os achados de Guo e Pu (2020). Porém, nossos dados apontaram para uma redução na população de cardiomiócitos com tetranucleação no grupo 6-OHDA, quando comparado com o controle, processo este que se inverte em animais desnervados, com o aumento na % de células mononucleadas. Mais estudos são necessários para comprovar este fenótipo.



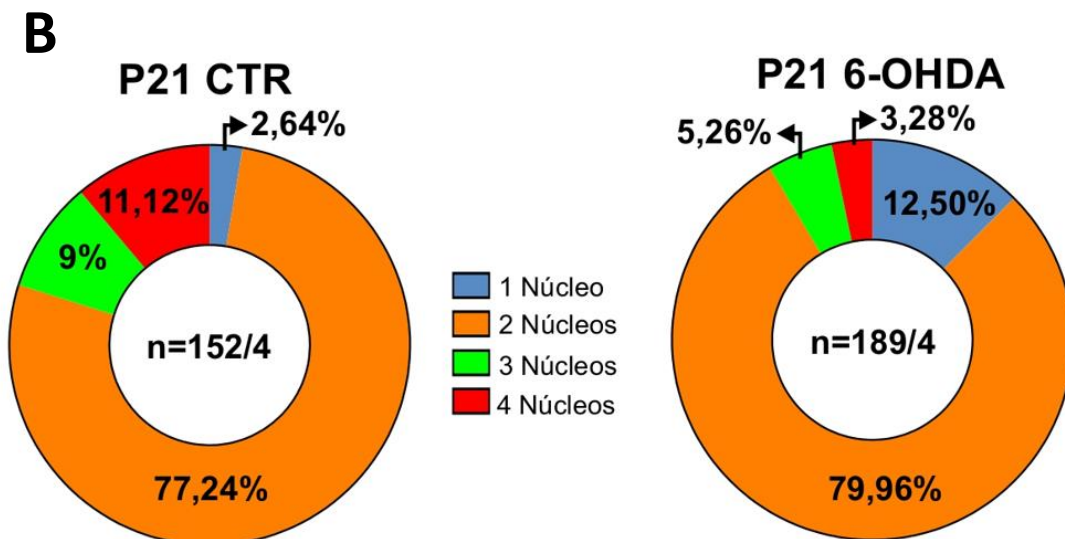
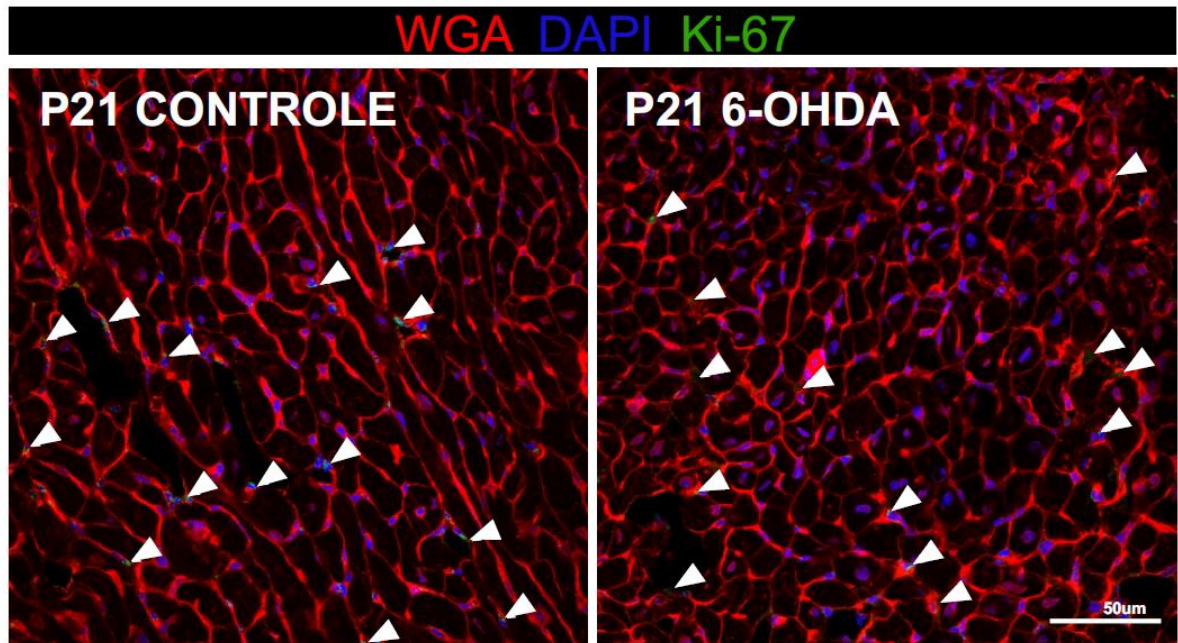


Figura 26: A desnervação simpática afeta o processo de tetranucleação dos cardiomiócitos ventriculares: **A)** Imagem representativa de microscopia confocal de cardiomiócitos isolados de camundongos P21 controle (CTR) ou tratados com 6-OHDA. Estas células foram marcadas com DAPI (azul). Barra 20 μ m. **B)** Gráfico de pizza demonstrando o perfil nuclear de cardiomiócitos ventriculares P21 CTR ou P21 6-OHDA. P21 = 21 dias de vida pós-natal. n= número de células analisadas/número de animais.

6.15 A desnervação simpática não altera o perfil proliferativo dos cardiomiócitos no 21º dia de vida pós-natal

Ao observarmos a redução no crescimento hipertrófico induzido pela 6-OHDA, decidimos avaliar se os CMs desnervados migravam para um fenótipo de maior capacidade proliferativa, quando comparado ao grupo controle. Para isso, realizamos imunofluorescência para um marcador conhecido de proliferação, a proteína nuclear ki-67. Observamos que a localização da fluorescência para Ki67, se encontravam em núcleos celulares localizados na interseção de cardiomiócitos (cabeça de seta branca na Figura 27A), indicando que a maior parte da proliferação estava ocorrendo em não-cardiomiócitos. Não constatamos diferenças significativas na porcentagem de cardiomiócitos Ki67+ de animais P21 controle ou P21-OHDA (Figura 27B).

A



B

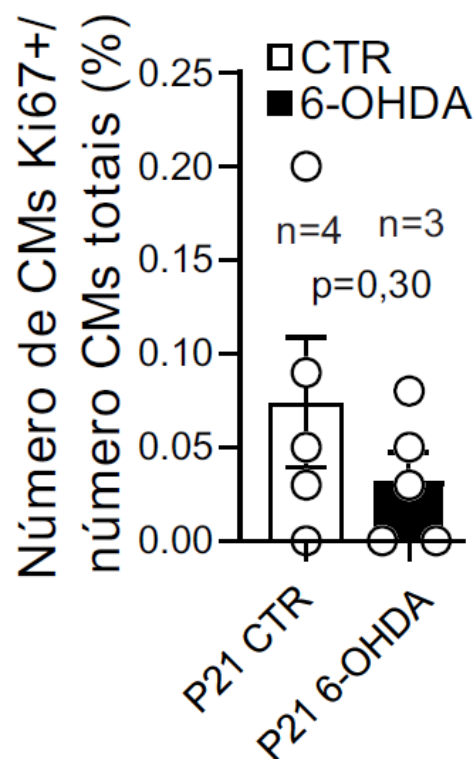


Figura 27. A deservação simpática não altera o perfil proliferativo dos cardiomiócitos no 21º dia de vida pós-natal. A) Imagem representativa de imunofluorescência realizado em criocortes de corações marcando a membrana plasmática com WGA (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul) e a proteína Ki67 em verde. Barra 50 µm **B)** Gráfico de barras mostrando a proporção de cardiomiócitos Ki67+ em relação ao número total de cardiomiócitos de animais P21 (CTR) ou tratados com 6-OHDA. $p > 0,05$ versus P21 CTR.

7. DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho foram: i) a maturação da maquinaria adrenérgica ocorre de forma gradual no coração ao longo do período pós-natal, com a identificação de todos os componentes no P21; ii) a ausência da inervação simpática retarda o crescimento hipertrófico do cardiomiócito pós-natal, possivelmente por atenuar a fosforilação de proteínas pró hipertróficas; iii) os receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ -adrenérgicos contribuem para o processo de hipertrofia pós-natal e iv) a ausência da inervação simpática não afeta outros parâmetros maturacionais dos cardiomiócitos como proliferação, fração de encurtamento, presença de túbulo-T e reexpressão do gene fetal MYH7. Em conjunto, esses dados demonstram a contribuição da sinalização adrenérgica para o crescimento cardíaco pós-natal. Tendo em vista que ainda são pouco conhecidos os sinais neuroendócrinos envolvidos no processo de maturação cardíaca, o conhecimento acerca da participação da sinalização adrenérgica num ponto chave do desenvolvimento cardíaco, poderá contribuir para otimização de abordagens que visam induzir a maturação de cardiomiócitos provenientes de células troncos.

O processo de maturação da sinalização adrenérgica cardíaca

O coração apresenta uma rica inervação simpática. Esta inervação é amplamente conhecida por estar envolvida no controle fisiológico das funções cardíacas. Para investigarmos o processo de maturação dessa inervação no período pós-natal, abordamos 3 aspectos biológicos da inervação simpática que incluem: (i) as neurotrofinas envolvidas no desenvolvimento desta inervação, (ii) expressão de proteínas envolvidas na síntese e degradação da noradrenalina, além do seu próprio conteúdo cardíaco e (iii) a expressão de componentes celulares da sinalização β -adrenérgica no coração. Quanto a gênese e amadurecimento da inervação simpática cardíaca, avaliamos a expressão das neurotrofinas BDNF e NGF no coração. As neurotrofinas são importantes polipeptídeos envolvidos no crescimento axonal, na plasticidade sináptica, sobrevivência neuronal, mielinização e diferenciação neuronal (PIUS-SADOWSKA e MACHALIŃSKI, 2017). As neurotrofinas apresentam um papel essencial na formação do coração e de componentes regulatórios do desenvolvimento vascular (CAPORALI e EMANUELI, 2009). Em linhas gerais, as neurotrofinas controlam a sobrevivência de diversas células que compõem o tecido cardíaco, como

as células do músculo liso vascular, células endoteliais e cardiomiócitos. Isso ocorre através de mecanismos autócrinos e parácrinos que contribuem para regulação da angiogênese, vasculogênese, e estabilização da inervação simpática cardíaca. (PIUS-SADOWSKA e MACHALIŃSKI, 2017; CAPORALI e EMANUELI, 2009). No presente trabalho, observamos uma maior expressão de BDNF no coração dos animais P1 e P11, quando comparado aos animais P21- P45. Este achado corrobora os resultados de Donovan et al., (2000), que demonstraram um papel essencial de BDNF nos primeiros dias de vida na formação do coração e da vasculatura miocárdica. Segundo este mesmo estudo, a deficiência de BDNF reduz o contato entre as células endoteliais do coração embrionário de camundongos, levando a hemorragia da parede intracelular e prejuízo contrátil.

Ao avaliarmos NGF um polipeptídeo, que possui alta afinidade por receptores de tropomiosina kinase (Trk) e baixa afinidade pelos receptores p75NTR, constatamos um aumento em sua expressão detectado no P21 e pico no P45. Este resultado indica a importância de NGF para a manutenção desta inervação simpática. Alguns autores já evidenciaram esta relação entre manutenção da inervação simpática e NGF, e atribuem a esta neurotrofina um papel anti-apoptótico em neurônios simpáticos. Crowley et. al., (1994) constataram que ao deletar o gene que codifica NGF, houve uma redução de 80% no gânglio simpático no 3º dia de vida pós-natal. Fagan et al., (1996) mostraram que ao deletar o principal receptor de NFG, o receptor TrkA, não ocorria prejuízo na neurogênese, porém, no 9º dia de vida pós-natal, nenhum neurônio simpático era encontrado no gânglio cervical superior, ponto que antecede a inervação simpática cardíaca. Corroborando estes dados, Hassankhani et al., (1995) observaram que a superexpressão de NGF, causa um aumento substancial na inervação simpática no coração durante o desenvolvimento, fazendo com que este animal geneticamente modificado evolua para hipertrofia cardíaca. Em linha com este achado, nós observamos em paralelo ao aumento na expressão do NGF no tecido cardíaco, um aumento percentual de 685.55% no peso do coração no período entre P1-P45. Essa observação sugere que há uma correlação positiva entre presença de NGF e o nível de hipertrofia cardíaca. Vale ressaltar que mais estudos são necessários para investigar a que nível o NGF contribui para hipertrofia cardíaca pós-natal: (i) indiretamente, através do efeito maturacional sobre a inervação simpática ou (ii) diretamente, através de ativação de vias pró-hipertróficas no cardiomiócitos.

A síntese de noradrenalina se inicia no citoplasma dos axônios e termina nas vesículas secretoras, sendo a TH uma das principais enzimas envolvidas na síntese deste neurotransmissor (GUYTON e HALL, 2017). Quando secretado na fenda sináptica, a noradrenalina pode ser: 1 - recaptada (50-80%), 2 - se perder no fluido corporal e posteriormente atingir a corrente sanguínea ou 3 - ser degradada por enzimas específicas, sendo a mais importante a MAO-A (GUYTON e HALL, 2017). Observamos um aumento crescente tanto da TH quanto da MAO-A no coração durante o processo maturacional, com identificação desses componentes no 21º dia de vida pós-natal, e aumento considerável entre o 21º e 45º dia de vida pós-natal. Este resultado alinha-se com a identificação da noradrenalina no coração, que atinge níveis mais altos a partir do 21º dia. Segundo Hasan (2013), o processo de desenvolvimento da inervação simpática cardíaca, pode ser dividido em 4 fases. 1- Migração das células da crista neural; 2- Diferenciação destas células em neurônios; 3- agregação destes neurônios para a formação de cadeias nervosas simpáticas e 4- Extensão do axônio destes neurônios e diferenciação terminal. Lipp e Rudolph., (1972) num estudo clássico que caracterizou o aparecimento da inervação simpática cardíaca nos períodos pré e pós-natal, não constatou a presença da inervação simpática durante o desenvolvimento fetal, sendo a mesma detectada a partir do primeiro dia de vida pós-natal. Curiosamente, Tucker et al., (1985) demonstraram que em ratos, a inervação simpática já exerce influência sobre a frequência cardíaca no 2º dia de vida pós-natal, porém, devido a sua alta plasticidade, a inervação simpática diminui sua atividade e mantém o seu tônus em baixos níveis até o desenvolvimento completo do sistema parassimpático, que acontece, em ratos, próximo ao P24. Estes achados podem justificar o grande salto na expressão de TH e MAO-A entre P21 e P45.

A noradrenalina, possui como principal alvo cardíaco, os receptores β -adrenérgicos (β -AR). Basicamente, estes receptores dividem-se em 3 subtipos: β 1-AR, β 2-AR e β 3-AR, sendo as duas primeiras as mais expressas no tecido cardíaco (PFLEGER, GRESHAM E KOCH., 2019). Os receptores β -AR são receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (predominantemente a proteína Gs) que modula parâmetros cardíacos como aumento da força de contração, velocidade de relaxamento, excitabilidade e velocidade de contração (GUYTON E HALL, 2017). Avaliamos a expressão temporal dos receptores β 1-AR e β 2-AR cardíacos entre P1 e P45. Observamos um aumento progressivo na expressão de ambos os receptores,

com um padrão interessante, uma vez que ambos apresentam um salto em sua expressão entre P11 e P21, atingindo o pico em P45. Curiosamente alguns achados indicam a presença destes receptores ainda nos primeiros dias de desenvolvimento intrauterino. Liu et al., (1999), demonstraram que a estimulação de cardiomiócitos isolados com isoproterenol 1 dia após o início da atividade cardíaca (~9 dias após a fecundação), foi suficiente para aumentar a taxa de batimentos espontâneos em corações inteiros e cardiomiócitos ventriculares isolados. Aránguiz-Urroz et al., (2011) mostraram que os receptores β -AR são expressos em outras células durante o desenvolvimento cardíaco. Este estudo constatou a presença de receptores β -AR, (principalmente β 2-AR) em fibroblastos cardíacos neonatais isolados. Han et al., (2020), ao tratar cardiomiócitos isolados no primeiro dia de vida pós-natal com isoproterenol, constatou em resposta uma hipertrofia celular, indicando uma atividade dos receptores β -AR no P1. Vale ressaltar, que neste trabalho avaliamos a expressão dos receptores β -adrenérgicos em homogenatos de coração, o que não nos permite definir os tipos celulares nos quais estes são expressos, sendo esta uma limitação do nosso trabalho.

A expressão dos β -ARs, é modulada predominantemente pelas proteínas β -arrestinas e GRKs (do inglês G protein-coupled receptor kinase). Estas proteínas citosólicas foram originalmente descobertas por seu papel inibitório na sinalização do receptor acoplado à proteína G (JEAN-CHARLES, KAUR e SHENOY, 2017). As β -arrestinas bloqueiam os GPCRs ativados por um longo período e posteriormente desencadeiam a endocitose e a ativação da quinases como a β ARK (quinase dos receptores β -AR), levando a vias de sinalização específicas de degradação através dos endossomos (JEAN-CHARLES, KAUR e SHENOY, 2017). No presente trabalho observamos no coração que durante o período pós-natal, o perfil de expressão das β -arrestinas 1 e 2 é diferente. De forma interessante, verificamos que já nos primeiros de vida pós-natal (P1-P11), há um salto de expressão da β -arrestina 1, enquanto que para β -arrestina 2 este fenômeno só ocorrerá no P21, neste último caso com um padrão bem similar ao observado com os β -AR1 e 2. Segundo Oakley et al., (2000), a β -arrestina 2, possui alta afinidade pelos receptores de classe A, como é o caso dos receptores β -AR. A partir desta observação, acreditamos que possa haver uma predominância funcional da β -arrestina 1 nos primeiros dias de vida no coração. Tendo isso em vista, outros estudos são necessários para decifrar em diferentes

pontos da vida, a contribuição funcional de cada β -arrestina para a sinalização adrenérgica cardíaca.

Em conjunto, na primeira parte deste trabalho, observamos de forma clara que a inervação simpática e a sinalização adrenérgica cardíaca passam por um processo maturacional no período pós-natal. Desta forma, levantamos a hipótese que essa sinalização poderia estar envolvida na maturação cardíaca. Sendo assim, para estabelecer uma relação causal entre sinalização adrenérgica e a maturação cardíaca, investigamos o impacto da desnervação simpática sobre diferentes marcadores maturacionais. Para isto, camundongos foram tratados com a 6-OHDA.

A desnervação simpática retarda o crescimento cardíaco pós-natal

A 6-OHDA é uma neurotoxina capaz de destruir neurônios catecolaminérgicos devido a sua similaridade com a dopamina. Após ser captada pelos receptores de dopamina e noradrenalina, a 6-OHDA atinge o interior do neurônio e promove o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil. Além disto, a 6-OHDA inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial diminuindo drasticamente a produção de ATP. Em conjunto, estes efeitos desencadeados pela 6-OHDA induzem apoptose celular de neurônios catecolaminérgicos (BLUM et al., 2001). De fato, diversos trabalhos têm mostrado que a administração da 6-OHDA em diferentes mamíferos, como macacos, cachorro e roedores é um modelo reprodutível de simpatectomia química (JOERS et al., 2014).

Neste trabalho, confirmamos que a 6-OHDA promoveu a destruição da inervação simpática cardíaca, ao observamos em homogenatos de corações P21 e P45, uma redução de cerca de 93% e 95% respectivamente, na expressão da TH, proteína que é um marcador da presença de neurônios catecolaminérgicos. Este resultado vai de encontro a dados prévios do nosso grupo que mostra, redução no conteúdo de noradrenalina utilizando o mesmo protocolo experimental (JESUS et al., 2021) Nesta condição, de redução da atividade simpática cardíaca no período pós-natal, verificamos que não houve alteração na expressão cardíaca nos receptores β_1 e β_2 -AR. Este resultado é curioso, uma vez que já é bem descrito que a atividade simpática é capaz de alterar a expressão dos receptores β -AR no coração, e assim esperávamos que em camundongos tratados com 6-OHDA ocorreria redução na expressão dos β -AR, o que não foi observado. Por exemplo, Zhao e Muntz., (1992)

mostraram em seu estudo que a desnervação simpática com 6-OHDA aumentava a expressão de receptores β -AR. Vallete et al., (1995) constataram que ao causar a desnervação simpática em cães utilizando a 6-OHDA, os níveis de receptores β -AR cardíacos aumentavam em 191% no 9º após a desnervação. Para reforçar estes dados, os mesmos autores causaram a desnervação simpática cirúrgica, e observaram que entre 2-7 semanas após a cirurgia, há um aumento de 219% na expressão de receptores β -AR cardíacos. Alinhado a estes resultados, Lurie, Bristow e Reitz (1983) demonstraram que a simpatectomia química por 6-OHDA em coelhos, aumentava a expressão de receptores β -AR cardíacos, aumentando assim a responsividade do coração a ligantes como o isoproterenol. Em contrapartida, a exposição crônica ao isoproterenol não altera a expressão do β 1-AR, mas diminui a expressão dos receptores β 2-AR (LURIE, BRISTOW e REITZ., 1983). Diversos autores já evidenciaram um aumento da atividade adrenérgica em corações que sofrem de insuficiência cardíaca. Este aumento da atividade catecolaminérgica faz com que os receptores β -AR cardíacos sofram regulação negativa compensatória para atenuar o excesso da atividade simpática (WALLUKAT., 2002). Especulamos que a ausência da inervação simpática regulou positivamente a expressão dos receptores β -AR de forma aguda, e com o passar dos dias, proteínas regulatórias normalizaram os níveis dos receptores para próximo do basal.

Um dos marcadores chaves da maturação cardíaca é a presença do túbulos-T. Setterberg et al., (2021) estimaram que os túbulos-T apareçam no cardiomiócito de camundongos entre o 4º e 9º dia de vida pós-natal. Os mecanismos moleculares e os sinais que regem o surgimento e a manutenção dos túbulos-T na célula muscular cardíaca, ainda são pouco conhecidos. Neste sentido, ao avaliarmos a presença de túbulos-T em cardiomiócitos ventriculares, constatamos que a desnervação simpática não prejudicou o aparecimento dos mesmos. Corroborando este dado, observamos que a 6-OHDA não alterou a expressão da Cav-3 e JPH2 no coração.

A hipertrofia cardíaca pós-natal é fruto de um aumento progressivo da carga de trabalho e é considerada o principal marco do desenvolvimento neste período. Esta hipertrofia, que classifica-se como fisiológica e é alcançada em apenas 3 estágios do desenvolvimento: 1 -após exposição ao exercício físico, 2 - durante a gravidez e 3 - durante o processo maturacional, sendo a última das três, a única considerada irreversível (CATALUCCI et al., 2008 e NAKAMURA E SADOSHIMA, 2018). Segundo Nakamura e Sadoshima, (2018), a hipertrofia fisiológica é aquela em que o coração

têm função contrátil preservada ou aumentada, boa organização sarcomérica, angiogênese suficiente e a ausência de fibrose intersticial e morte celular. Um dos principais achados deste trabalho, foi que a desnervação simpática desacelera o crescimento cardíaco no período pós-natal. Este achado é amparado em 4 observações: (i) a 6-OHDA reduziu a relação do peso do coração normalizado pelo tamanho da tíbia esquerda, (ii) a desnervação simpática diminuiu a área de secção transversa dos cardiomiócitos P21 e P45, quando comparados aos seus respectivos controles, (iii) diminuição no comprimento dos cardiomiócitos P21 tratados com 6-OHDA e (iv) redução na população de cardiomiócitos com tetranucleação no grupo 6-OHDA. Além disto, em um segundo modelo de redução de atividade simpática, camundongos tratados com propranolol, atenolol ou nocautes para o receptor β 2-AR, foi também observada redução da área de secção transversa dos cardiomiócitos. Kreipke e Birren et al., (2015), corroboram os nossos dados ao observarem que uma dose de 6-OHDA induzia uma diminuição no tamanho do coração em ratos durante o período de desenvolvimento pós-natal, sinalizando para uma influência desta inervação no trofismo cardíaco. Em contrapartida, os mesmos autores observaram que *in vitro* que cardiomiócitos mantidos em co-cultura com neurônios simpáticos, hipertrofiavam menos e se mantinham em um perfil proliferativo por mais tempo, saindo do ciclo celular de forma mais lenta, provavelmente porque a inervação simpática aumenta a expressão de Meis1, um gene relacionado com a retirada das células do ciclo celular. Este resultado indica a versatilidade da inervação simpática em diferentes estágios de desenvolvimento e que a atividade simpática pode influenciar a saída do perfil proliferativo para hipertrófico em cardiomiócitos, sendo um importante regulador nesta transição. Pianca et al., (2019), mostraram em seu estudo, que as junções neurocárdicas (encontro entre cardiomiócitos e neurônios simpáticos) apresentavam um padrão não linear, em que os cardiomiócitos da camada externa do coração, que se encontrava em maior contato com a inervação simpática, apresentavam maior área de secção transversa e que a área de secção transversa dos cardiomiócitos diminuía a medida que estas células se distanciavam da inervação simpática. Para comprovar este dado, os mesmos autores induziram a desnervação simpática com a 6-OHDA em camundongos adultos (3 meses) e constataram que esta diferença de área celular era igualada. Os autores sugerem que este controle acontece por meio de um aumento da proteólise celular. Este resultado sugere que a inervação simpática parece controlar o trofismo fisiológico dos cardiomiócitos.

Sabe-se que a hipertrofia cardíaca é modulada por diversas cascatas de sinalização intracelulares que variam de acordo com o tipo de hipertrofia (fisiológica ou patológica) NAKAMURA E SADOSHIMA, 2018. Proteínas como AKT e ERK 1/2 são consideradas pivôs neste processo. No presente trabalho, observamos que estas duas proteínas apresentaram redução de fosforilação após o tratamento com a 6-OHDA, sugerindo uma possível participação destas duas vias na desaceleração na hipertrofia cardíaca pós-natal causada pela desnervação simpática. A AKT, presente no eixo PI3K/AKT/mTOR também chamada de proteína kinase B ou simplesmente PKB, geralmente está envolvida na hipertrofia induzida por exercício. No coração, os subtipos AKT1 e AKT2 são os mais expressos, embora exista também o subtipo AKT3. Enquanto AKT1 está relacionado com a hipertrofia celular, AKT2 está relacionado com a regulação metabólica e sobrevivência dos cardiomiócitos (YAO, HAN e HAN., 2014). Além da atividade pró-hipertrófica, a via AKT/mTOR participa de diversos processos no desenvolvimento dos cardiomiócitos, podemos citar a proliferação, diferenciação, metabolismo, organização do citoesqueleto e apoptose (CHEN et al., 2017). A ativação da AKT, não só induz a hipertrofia fisiológica como inibe a hipertrofia patológica. Ficou evidenciado por DeBosch et al., (2006), que animais nocautes para a AKT1, apresentam redução de cerca de 20% no tamanho do coração quando comparado a animais controle. Além disto, estes animais apresentaram uma menor hipertrofia fisiológica em resposta ao exercício físico e mal adaptação após um insulto isquêmico.

Uma outra via que observamos alteração nos corações dos animais desnervados foi a via da MAPK/ERK1/2. Esta via é reconhecidamente ativada pela sinalização adrenérgica (Gs) (DORN et al., 1999) e seu papel na progressão da hipertrofia cardíaca, amplamente investigada. Ficou demonstrado por Purcell et al., (2007) que embora a via da ERK1/2 atue na regulação do crescimento e a adaptação do coração a estímulos fisiológicos e patológicos, sendo uma das principais vias pro-hipertróficas induzidas por estresse ou por ligante, ela não é essencial para a hipertrofia do coração, visto que animais com a deleção da ERK 1/2 não apresentavam prejuízo na hipertrófica cardíaca, porém, eram mais susceptíveis a insuficiência cardíaca induzida por estímulos patológicos, indicando uma ação protetora da ERK1/2. Já segundo Kehat et al., (2011), a ERK1/2 está envolvida no crescimento concêntrico e excêntrico do coração. De forma interessante, ao realizarmos medidas de comprimento e largura de cardiomiócitos isolados de animais P21 controles e P21

tratados com a 6-OHDA, observamos um prejuízo no comprimento das células dos animais desnervados quando comparados aos seus respectivos controles, e preservação da largura celular. Este resultado nos indica que o prejuízo hipertrófico sofrido pelos animais desnervados, é predominante excêntrico, não afetando de forma significativa a adição de sarcômeros em paralelo durante o processo hipertrófico. Tendo em vista que observamos redução na fosforilação da ERK1/2 no coração dos animais tratados com a 6-OHDA e que esta quinase está envolvida no processo de hipertrofia excêntrica, é intuitivo pressupor um possível papel dessa via no processo de desaceleração do crescimento hipertrófico causado pela desnervação simpática no período pós-natal. No entanto, experimentos adicionais são necessários para mostrar um papel direto da ERK1/2 neste processo.

Por fim, decidimos avaliar a participação dos receptores β -adrenérgicos no processo de hipertrofia cardíaca pós-natal. Anteriormente já foi descrito que tanto os receptores β 1-AR quanto os β 2-AR, estão envolvidos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Já está bem estabelecido que o aumento da atividade simpática via receptores β -AR, induz a hipertrofia cardíaca devido a hiperestimulação da via Gs a qual os receptores β -AR estão acoplados, demonstrando assim de forma consistente a participação dos receptores β -AR na hipertrofia cardíaca. Keys et al., (2003) demonstraram que animais transgênicos que superexpressavam os receptores β 1-AR, sofriam hipertrofia cardíaca espontânea que poderia ser revertida através do tratamento com antagonista β -AR. Estes resultados sugerem a participação dos receptores β 1 para o processo de hipertrofia cardíaca patológica. Zaglia et al., (2013) demonstraram que a inervação simpática via receptores β 2-AR, controlava o trofismo dos cardiomiócitos, visto que a diminuição no tamanho dos cardiomiócitos adultos induzidos pela simpatectomia farmacológica (6-OHDA) era revertida pelo tratamento com um agonista β 2 seletivo, o Clenbuterol. Os autores sugerem que os receptores β 2-AR regulam a proteólise cardíaca e conseqüentemente o tamanho fisiológico dos cardiomiócitos.

Em nossos experimentos, utilizando uma estratégia farmacológica para bloquear os receptores β 1-AR e o uso de um animal geneticamente modificado com deleção dos receptores β 2-AR, nós confirmamos e expandimos este conhecimento, ao mostrar que os dois subtipos de receptores estão envolvidos no crescimento hipertrófico pós-natal, uma vez que em ambas estratégias observamos redução na área dos cardiomiócitos quando comparado aos seus respectivos controles.

Reforçando este dado, ao estimularmos especificamente os receptores β 1-AR ou β 2-AR com dobutamina ou formoterol, respectivamente, verificamos que ambos agonistas preveniram a redução da área celular promovida pela desnervação simpática, estabelecendo dessa forma, uma relação causa-efeito entre a sinalização adrenérgica e a hipertrofia cardíaca pós-natal.

Por fim, avaliamos dois marcadores importantes para a fase final da diferenciação dos CMs, que são a proliferação e a polinucleação. Os CMs, são exemplos raros de células que conseguem alterar seu fenótipo mononuclear para polinuclear, sendo que este processo se dá por alguns fatores, tais como o desacoplamento da citocinese da cariocinese e a saída final do ciclo celular (LI et. Al., 1996). Li et al. (1996) constataram que os CMs iniciam um processo de polinucleação a partir do 4^o dia de vida pós-natal, que ocorre em paralelo a uma hipertrofia celular importante, em que as células aumentavam seu tamanho em ~2,5X. Ao amadurecer, os CMs binucleados correspondem a ~80-90% do número total de CMs (LI et al., 1996 e GUO e PU., 2020), este resultado corrobora com os nossos achados, no qual encontramos 77,24% e 79,96% de CMs binucleados nos grupos controle e 6-OHDA respectivamente. O aumento na quantidade de núcleos ocorre principalmente para que a síntese proteica, que ocorre de forma intensa nos CMs devido a seu alto perfil metabólico, ocorra de forma mais rápida. Acreditamos que o prejuízo no processo de poliploidia e o alto índice de CMs mononucleados em animais desnervados, com consequente redução da população de cardiomiócitos tetranucleados, está intimamente ligado ao prejuízo hipertrófico cardíaco em animais 6-OHDA, fazendo com que estas células menores não apresentem demanda suficiente para que o processo de polinucleação seja induzido. Outro ponto importante a ser considerado é se a população de cardiomiócitos tetranucleados acompanharia regiões de maior inervação simpática. Considerando a regionalização da inervação simpática no coração este seria ponto importante a ser avaliado.

Segundo Paradis, Gay E Zhang, (2013), células mononucleadas são mais proliferativas, enquanto as células polinucleadas são em sua maior parte, células que já saíram do ciclo celular e não proliferam mais. Visto que o crescimento hipertrófico pós-natal, ocorre predominantemente após a saída dos CMs do ciclo celular, cogitávamos que CMs desnervados, por apresentarem uma atenuação no crescimento e também um maior número de células mononucleadas, quando comparados ao grupo controle, poderiam migrar de um perfil hipertrófico pós-natal

para um perfil proliferativo compensatório. Para avaliar a proliferação, analisamos a expressão da proteína nuclear ki-67, que é expressa em núcleo de células em proliferação. É uma proteína não-histona de meia vida curta que está presente em todos os estágios do ciclo celular, exceto na fase G0. (JONKER, LOUEY e ROSELLI, 2018). Não observamos diferenças significativas no perfil proliferativo de células que sofreram desnervação, indicando que a inervação simpática exerce pouca influência sobre ambos os marcadores.

A figura 28 ilustra um modelo esquemático dos principais achados deste trabalho.

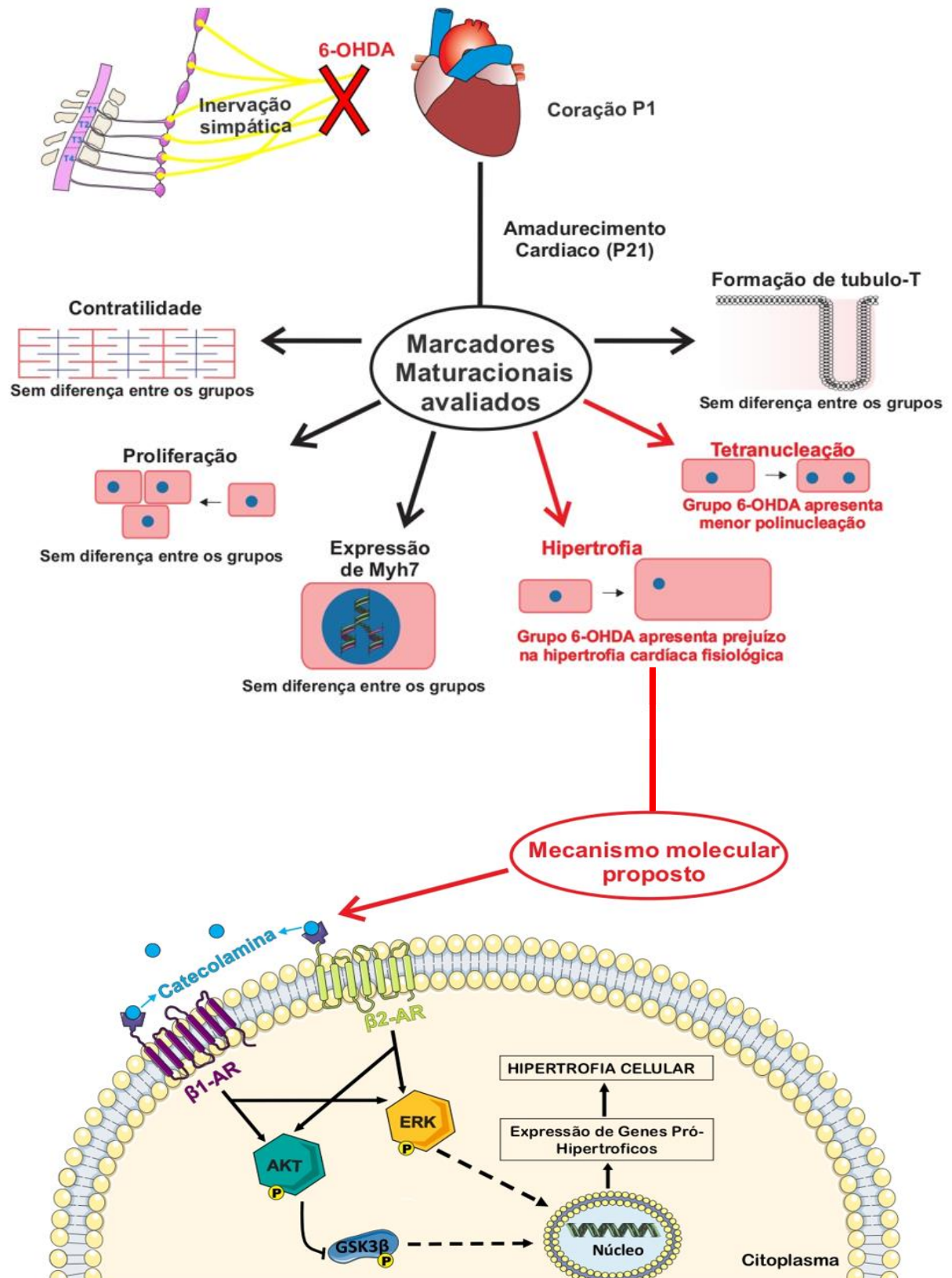


Figura 28: Mecanismo fenotípico e molecular sugerido por nossos achados: A) A desnervação simpática prejudica o crescimento celular e cardíaco pós-natal, que como mecanismos secundários prejudica a polinucleação. Marcadores maturacionais como contratilidade, proliferação, formação de túbulo-T e silenciamento do Gene Myh7 não foram alteradas. B) Provável mecanismo molecular envolvido no prejuízo hipertrofico que ocorre possivelmente através da atenuação na fosforilação de proteínas pró-hipertrofic como AKT e ERK1/2.

8. CONCLUSÃO

As informações obtidas neste trabalho nos permitem concluir que a inervação simpática cardíaca passa por um processo maturacional no período pós-natal com a identificação da noradrenalina e seus receptores no P21. Esta maturação acontece em paralelo com o desenvolvimento cardíaco pós-natal e sua ativação tem um papel importante no crescimento hipertrófico do cardiomiócito e conseqüentemente cardíaco. Este processo envolve a participação dos receptores β_1 e β_2 -AR, e ocorre em paralelo a redução na atividade de várias vias de sinalização pró-hipertróficas no coração. Dentre os vários parâmetros maturacionais avaliados, apenas o tamanho do cardiomiócito foi afetado de forma significativa pela redução da atividade simpática, dado esse que está alinhado com a redução na ocorrência da tetranucleação. Em conjunto, os achados deste estudo reforçam a importância da inervação simpática para a maturação cardíaca pós-natal, principalmente no quesito hipertrofia.

9. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, Matthew R. *et al.* Increased atherosclerosis and smooth muscle cell hypertrophy in natriuretic peptide receptor a^{-/-} apolipoprotein e^{-/-} mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, Dallas, v. 23, n. 6, p. 1077-1082, jun. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4321898/>. Acesso em: 22 mar. 2021.
- ARÁNGUIZ-URROZ, Pablo *et al.* Beta2-adrenergic receptor regulates cardiac fibroblast autophagy and collagen degradation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, Amsterdã, v. 1812, n. 1, p. 23-31, jan 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20637865/>. Acesso em: 07 fev 2022.
- BLUM, D *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 135-172, oct 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11403877/>. Acesso em 23 jan 2022.
- BRYANT, Simon M *et al.* Caveolin-3 KO disrupts t-tubule structure and decreases t-tubular I Ca density in mouse ventricular myocytes. **The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 315, n. 5, p. H1101-H1111, nov 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30028203/>. Acesso em 23 jan 2022.
- CAPORALI, Andrea *et al.* Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. **Cell Death & Differentiation**, London, v. 15, n. 2, p. 299-311, feb 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17992191/>. Acesso em: 22 jan 2022.
- CAPORALI, Andrea; COSTANZA, Emanuela. Cardiovascular Actions of Neurotrophins. **Physiological Reviews**, Bristol, v. 89, n.1 p 279–308, jan 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19126759/>. Acesso em: 22 jan 2022.
- CATALUCCI, Daniele *et al.* Physiological myocardial hypertrophy: how and why?. **Frontiers in Bioscience**, Singapore, v. 13, n. 13, p. 312-324, jan 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17981549/>. Acesso em: 27 jan 2022.
- CHATTERGOON, Natasha N. *et al.* Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation. **Faseb journal: official publication of the federation of american societies for experimental biology**, Bethesda, v. 26, n. 1, p. 397-408. jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21974928/>. Acesso em: 20 mar. 2021.
- CHEN, Lvyi *et al.* Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI 3K/Akt/mTOR pathway in vitro and in vivo. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Hoboken, v. 21, n. 12, p. 3178-3189, dec 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28905500/>. Acesso em: 07 fev 2022.
- CROWLEY, Craig *et al.* Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. **Cell**, Cambridg, v. 76, n. 6, p. 1001-1011, mar 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8137419/>. Acesso em: 07 fev 2022.
- DONOVAN, M J *et al.* Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. **Development**, Cambridge, v.

127, n. 21, p. 4531-4540, nov 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11023857/>. Acesso em: 22 jan 2022.

DORN, Gerald W. *et al.* Low-and high-level transgenic expression of β 2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Gαq-overexpressing mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 11, p. 6400-6405, may 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10339599/>. Acesso em: 27 jan 2022.

DORR, Kerry M. *et al.* Casz1 is required for cardiomyocyte g1-to-s phase progression during mammalian cardiac development. **Development**, Cambridge, v. 142, n. 11, p. 2037-2047, jun. 2015. Disponível em: <https://dev.biologists.org/content/142/11/2037.short>. Acesso em: 30 mar. 2021.

FAGAN, Anne M. *et al.* TrkA, but not TrkC, receptors are essential for survival of sympathetic neurons in vivo. **Journal of Neuroscience**, Washington, D.C, v. 16, n. 19, p. 6208-6218, oct 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8815902/>. Acesso em: 07 fev 2022.

FRANGOIANNIS, Nikolaos G. Pathophysiology of myocardial infarction. **Comprehensive Physiology**, Bethesda, v. 5, n. 4, p. 1841-1875, oct. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26426469/>. Acesso em: 01 mar. 2021.

GIRAUD, G. D. *et al.* Cortisol stimulates cell cycle activity in the cardiomyocyte of the sheep fetus. **Endocrinology**, Baltimore, v. 147, n. 8, p. 3643-3649, aug. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16690807/>. Acesso em: 02 abr. 2021.

GODIER-FURNÉMONT, Amandine F. G. *et al.* Physiologic force-frequency in engineered heart muscle by electromechanical stimulation. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 60, p. 82-91, aug. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25985155/>. Acesso em: 26 mar. 2021.

GÓMEZ, A. M.; GUATIMOSIM, S.; DILLY, K. W.; VASSORT, G.; LEDERER, W. J. Heart failure after myocardial infarction altered excitation-contraction coupling. **Circulation**, Dallas, v. 104, n. 6, p. 688-693, 2001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11489776/>. Acesso em: 20 mar. 2021

GUO, Y. *et al.* Hierarchical and stage-specific regulation of murine cardiomyocyte maturation by serum response factor. **Nature communications**, London, v. 9, n. 1, p. 1-16, sep. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6155060/>. Acesso em: 26 mar. 2021.

GUO, Yuxuan *et al.* Sarcomeres regulate murine cardiomyocyte maturation through mrtf-srf signaling. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 118, n. 2, p. 1-11, jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33361330/>. Acesso em: 30 dez. 2020.

GUO, Yuxuan; PU, William T. Cardiomyocyte maturation: new phase in development. **Circulation research**, Dallas, v. 126, n. 8, p. 1086-1106, apr. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32271675/>. Acesso em: 18 mar. 2021.

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. Tratado de fisiologia médica. 13. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2017. 1145 p.

HAN, Jung Woo *et al.* Isoproterenol-induced hypertrophy of neonatal cardiac myocytes and H9c2 cell is dependent on TRPC3-regulated CaV1. 2 expression. **Cell Calcium**, Amsterdã, v. 92, p. 102305, dec 2020. Disponível em: pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33069962/. Acesso em: 07 fev 2022.

HANSSON, M; KJÖRELL, U; FORSGREN, S. Ingrowth of sympathetic innervation occurs concomitantly with a decrease of ANP in the growing rat cardiac ventricles. **Anatomy and embryology**, Berlim, v. 203, n. 1, p. 35-44, jan 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11195087/>. Acesso em 27 jan 2022.

HASAN, Wohaib. Autonomic cardiac innervation: development and adult plasticity. **Organogenesis**, London, v. 9, n. 3, p. 176-193, jul 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3896589/>. Acesso em: 07 fev 2022.

HASSANKHANI, A *et al.* Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells. **Developmental Biology**, Amsterdam, v. 169, n. 1, p. 309-321, may 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7750647/>. Acesso em: 22 jan 2022.

IEDA, Masaki *et al.* Cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through $\beta 1$ integrin signaling. **Developmental cell**, Cambridge, v. 16, n. 2, p. 233-244, feb. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19217425/>. Acesso em: 01 mar. 2021.

JEAN-CHARLES, Pierre-Yves; KAUR, Suneet; K SHENOY, Sudha. G Protein-Coupled Receptor Signaling Through β -Arrestin-Dependent Mechanisms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, Manchester, v. 70, n. 3, p. 142-158, sep 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28328745/>. Acesso em : 22 jan 2022

JESUS, Itamar *et al.* Alamandine enhances cardiomyocyte contractility in hypertensive rats through a nitric oxide-dependent activation of CaMKII. **Am J Physiol Cell Physiol**, Bethesda, v. 318. p. c740-c750, 8 jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31913703/>. Acesso em: 21 abr. 2021

JESUS, Itamar *et al.* Molecular basis of Period 1 regulation by adrenergic signaling in the heart. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 35, n. 10, oct 2021, Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34473369/>

JONKER, Sonnet S; LOUEY, Samantha; ROSELLI, Charles E. Cardiac myocyte proliferation and maturation near term is inhibited by early gestation maternal testosterone exposure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 315, n. 5, p. H1393-H1401, nov 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30095996/>. Acesso em: 27 jan 2022.

KAHALY, George J.; DILLMANN, Wolfgang H. Thyroid hormone action in the heart. **Endocrine reviews**, New York, v. 26, n. 5, p. 704-728, aug. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15632316/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

KANNAN, Suraj; KWON, Chulan. Regulation of cardiomyocyte maturation during critical perinatal window. **Journal of physiology**, London, v. 598, n. 14, p. 2941-2956, jul. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30571853/>. Acesso em: 01 abr. 2021.

KARAMLOU, Tara *et al.* Right ventricular remodeling in response to volume overload in fetal sheep. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**,

Bethesda, v. 316, n. 5, p. 985-991, may. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30707615/>. Acesso em: 02 fev. 2021.

KARBASSI, Elaheh *et al.* Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. **Nature reviews. Cardiology**, London, v. 17, n. 6, p. 341-359, jun. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015528/>. Acesso em: 19 jan. 2021.

KEHAT, Izhak *et al.* Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. **Circulation research**, Dallas, v. 108, n. 2, p. 176-183, jan 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21127295/>. Acesso em: 27 jan 2022.

KEYS, Janelle R. *et al.* Cardiac hypertrophy and altered β -adrenergic signaling in transgenic mice that express the amino terminus of β -ARK1. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 285, n. 5, p. H2201-H2211, nov 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12869383/>. Acesso em: 07 fev 2022.

KIMURA, Kensuke; IEDA, Masaki; FUKUDA, Keiichi. Development, maturation, and transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves. **Circulation research**, Dallas, v. 110, n. 2, p. 325-336, jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22267838/>. Acesso em: 02 fev. 2021.

KONG, Cherrie H T *et al.* Cardiac-specific overexpression of caveolin-3 preserves t-tubular I Ca during heart failure in mice. **Experimental Physiology**, London, v. 104, n. 5, p. 654-666, may 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30786093/>. Acesso em: 23 jan 2022.

KREIPKE, R. E.; BIRREN, S. J. Innervating sympathetic neurons regulate heart size and the timing of cardiomyocyte cell cycle withdrawal. **Journal of physiology**, London, v. 593, n. 23, p. 5057-5073, dec. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4667004/>. Acesso em: 20 dez. 2020.

LI, F *et al.* Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 28, n. 8, p. 1737-1746, aug 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8877783/>. Acesso em: 27 jan 2022.

LI, Faqian *et al.* Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. **Journal of molecular and cellular cardiology**, London, v. 28, n. 8, p. 1737-1746, aug. 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8877783/>. Acesso em: 30 mar. 2021.

LINDSEY, Stephanie E.; BUTCHER, Jonathan T.; YALCIN, Huseyin C. Mechanical regulation of cardiac development. **Frontiers in physiology**, Lausanne, v. 5, n. 318, p. 1-15, aug. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4140306/>. Acesso em: 18 fev. 2021.

LIPP, Jo Ann M.; RUDOLPH, A. M. Sympathetic nerve development in the rat and guinea-pig heart. *Biology of the Neonate*, Basileia, v. 21, n. 1-2, p. 76-82, Jul 1972. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4651153/>. Acesso em: 07 de fev 2022.

LIU, Honghai *et al.* Control of cytokinesis by β -adrenergic receptors indicates an approach for regulating cardiomyocyte endowment. **Science translational medicine**, Washington, D.C, v. 11, n. 513, oct 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31597755/>. Acesso em 27 jan 2022.

LIU, Weiran *et al.* β -Adrenergic modulation of L-type Ca^{2+} -channel currents in early-stage embryonic mouse heart. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 276, n. 2, p. H608-H613, feb 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9950862/>. Acesso em: 07 fev 2022.

LIU, Yen-Wen *et al.* Human embryonic stem cell–derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. **Nature biotechnology**, New York, v. 36, n. 7, p. 1-16, jul. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6329375/>. Acesso em: 26 mar. 2021.

LUMBERS, E. R. *et al.* Effects of cortisol on cardiac myocytes and on expression of cardiac genes in fetal sheep. **American journal of physiology: regulatory, integrative and comparative physiology**, Bethesda, v. 288, n. 3, p. 567-574, mar. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15576665/>. Acesso em: 02 abr. 2021.

Lurie,K; Bristow, M e Reitz, M., Increased β -adrenergic receptor density in an experimental model of cardiac transplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Amsterdã, v. 86, n. 2, p. 195-201, Ago1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6308358/>. Acesso em: 26 mar. 2021.

MAGYAR, D. M. *et al.* Time-trend analysis of plasma cortisol concentrations in the fetal sheep in relation to parturition. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 107, n. 1, p. 155-159, jul. 1980. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7379742/>. Acesso em: 30 mar 2021.

MAHMOUD, Ahmed I. *et al.* Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. **Nature**, London, v. 497, n. 7448, p. 249-253, may. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23594737/>. Acesso em: 28 fev. 2021.

MAROLI, Giovanni; BRAUN, Thomas. The long and winding road of cardiomyocyte maturation. **Cardiovascular research**, London, v. 117, n. 3, p. 712-726, feb. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32514522/>. Acesso em: 29 dez. 2020.

MOLLOVA, Mariya *et al.* Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 4, p. 1446-1451, jan 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23302686/>. Acesso em: 27 jan 2022.

.NAKAMURA, Michinari; SADOSHIMA, Junichi. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nature Reviews Cardiology**, London, v. 15, n. 7, p. 387-407, jul 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29674714/>. Acesso em: 27 jan 2022.

NUNES, Sara S. *et al.* Biowire: a new platform for maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. **Nature methods**, New York, v. 10, n. 8, p. 781-787, aug. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23793239/>. Acesso em: 26 fev. 2021.

OAKLEY, R H *et al.* Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 275, n. 22, p. 17201-17210, jun 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10748214/>. Acesso em: 22 jan 2022.

O'TIERNEY, P. F. *et al.* Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin II-stimulated proliferation in fetal cardiomyocytes. **Journal of physiology**, London, v. 588, n. 15, p. 2879–2889, aug. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20519318/>. Acesso em: 20 mar. 2021.

PAESSENS, R.; BORCHARD, F. Morphology of cardiac nerves in experimental infarction of rat hearts: I. fluorescence microscopical findings. **Virchows archive A: Pathological anatomy and histology**, Berlin, v. 386, n. 3, p. 265-278, 1980. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7445416/>. Acesso em: 22 mar. 2021.

PARADIS, Alexandra N; GAY, Maresha S; ZHANG, Lubo. Binucleation of cardiomyocytes: the transition from a proliferative to a terminally differentiated state. **Drug Discovery Today**, Loma Linda, v. 19, n. 5, p. 602-609, may 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24184431/>. Acesso em: 27 jan 2022.

PARIKH, Shan S. *et al.* Thyroid and glucocorticoid hormones promote functional t-tubule development in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. **Circulation research**, Baltimore, v. 121, n. 12, p. 1323-1330, dec. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28974554/>. Acesso em: 02 fev. 2021.

PFLEGER, Jessica; GRESHAM, Kenneth; KOCH, Walter J. G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets in the heart. **Nature Reviews Cardiology**, London, v. 16, n. 10, p. 612-622, oct 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31186538/>. Acesso em: 01 fev 2022.

PIANCA, Nicola *et al.* Cardiac sympathetic innervation network shapes the myocardium by locally controlling cardiomyocyte size through the cellular proteolytic machinery. **Journal of physiology**, London, v. 597, n. 14, p. 3639-3656, jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31116413/>. Acesso em: 15 fev. 2021.

PINTO, Alexander R. *et al.* Revisiting cardiac cellular composition. **Circulation research**, Baltimore, v. 118, n. 3, p. 400-409, feb. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26635390/>. Acesso em: 29 mar. 2021.

PIUS-SADOWSKA, Ewa; MACHALIŃSKI Bogusław. BDNF - a key player in cardiovascular system. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 72, p 70-111, jul 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28736262/>. Acesso em: 22 jan 2022.

PUENTE, Bao N. *et al.* The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through dna damage response. **Cell**, Cambridge, v. 157, n. 3, p. 565-579, apr. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24766806/>. Acesso em: 19 fev. 2021.

PURCELL, Nicole H. *et al.* Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 35, p. 14074-14079, aug 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17709754/>. Acesso em: 27 jan 2022.

RUPERT, Cassady E.; COULOMBE, Kareen L. K. Igf1 and nrg1 enhance proliferation, metabolic maturity, and the force-frequency response in hesc-derived engineered cardiac tissues. **Stem cells international**, New York, v. 2017, p. 1-14, aug. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5603111/>. Acesso em: 17 dez. 2020.

SADOSHIMA, J. I. *et al.* Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 20, p. 9905-9909, oct. 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1384064/>. Acesso em: 02 mar. 2021.

SCALZO, Sergio *et al.* Dense optical flow software to quantify cellular contractility. **Cell Reports Methods**, Cambridge, v.1, n. 4, Ago 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2667237521000898#!>

SETTERBERG *et al.* The physiology and pathophysiology of t-tubules in the heart. **Frontiers in Physiology**. Lausanne, v. 12, sep 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34566684/>. Acesso em 23 jan 2022.

SHIMIZU, Ippei; MINAMINO, Tohru. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Journal of molecular and cellular cardiology**, London, v. 97, p. 245-262, aug 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27262674/>. Acesso em 27 jan 2022.

SIQUEIRA, Alessandra de Sá Earp *et al.* Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 1, p. 39-46, jul 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28591251/>. Acesso em: 01 fev 2022.

SLOTKIN, T. A. *et al.* Fetal dexamethasone exposure impairs cellular development in neonatal rat heart and kidney: effects on dna and protein in whole tissues. **Teratology**, Philadelphia, v. 43, n. 4, p. 301-306, apr. 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2048038/>. Acesso em: 30 mar. 2021.

SMEYNE, R I. J *et al.* Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. **Nature**, London, v. 368, n. 6468, p. 246-249, mar 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8145823/>. Acesso em: 22 jan 2022.

SNIR, Mirit *et al.* Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **American journal of physiology: heart and circulation physiology**, Bethesda, v. 285, n. 6, p. 2355-2363, dec. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14613910/>. Acesso em: 02 mar. 2021.

THOMAS, Steven A.; MATSUMOTO, Alvin M.; PALMITER, Richard D. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. **Nature**, London, v. 374, n. 6523, p. 643-646, apr. 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7715704/>. Acesso em: 15 dez. 2020.

TU, Chengyi; CHAO, Benjamin S.; WU, Joseph C. Strategies for improving the maturity of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Circulation**

research, Baltimore, v. 123, n. 5, p. 512-514, aug. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30355143/>. Acesso em: 02 mar. 2021.

WHITE, Ian A et al. Sympathetic Reinnervation is Required for Mammalian Cardiac Regeneration. **Circulation Research**, Dallas, v. 117, n. 12, p. 990-994, dec 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26371181/>. Acesso em: 27 jan 2022.

WU, Liyuan *et al.* Angiotensin II promotes cardiac differentiation of embryonic stem cells via angiotensin type 1 receptor. **Differentiation**, London, v. 86, n. 1/2, p. 23-29, jul./sep. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23933399/>. Acesso em: 26 fev. 2021.

YANG, Xiulan *et al.* Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, London, v. 72, p. 296-304, jul. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24735830/>. Acesso em: 26 mar. 2021.

YAO, Hong; HAN, Xiangyang; HAN, Xiuzhen. The cardioprotection of the insulin-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, Auckland, v. 14, n. 6, p. 433-442, dec 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25160498/>. Acesso em: 07 fev 2022.

ZAGLIA, Tania *et al.* Cardiac sympathetic neurons provide trophic signal to the heart via β 2-adrenoceptor-dependent regulation of proteolysis. **Cardiovascular research**, London, v. 97, n. 2, p. 240-250, feb. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23090606/>. Acesso em: 02 fev. 2021.

ZAGLIA, Tania; MONGILLO, Marco. Cardiac sympathetic innervation, from a different point of (re)-view. **Journal of physiology**, London, v. 595. n. 12, p. 3919-3930, jun. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28240352/>. Acesso em: 15 dez. 2020.

ZHAO, Mingming; MUNTZ, Kathryn H. Differential downregulation of beta 2-adrenergic receptors in tissue compartments of rat heart is not altered by sympathetic denervation. **Circulation research**, Dallas, v. 73, n. 5, p. 943-951, nov 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8403264/>. Acesso em: 07 fev 2022.