

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Fernando Pedro de Souza Neto

**PI3Kgama REGULA gp91^{phox} (NOX-2) E INDUZ ALTERAÇÕES
CARDIODELETÉRIAS**

Belo Horizonte

2021

Fernando Pedro de Souza Neto

**PI3Kgama REGULA gp91^{phox} (NOX-2) e induz alterações
cardiodeletérias**

Tese de doutorado 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 do título de Doutor em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Guatimosim

Belo Horizonte

2021

043

Souza Neto, Fernando Pedro de.

PI3Kgama regula gp91^{phox} (NOX-2) e induz alterações cardiodeletérias [manuscrito] / Fernando Pedro de Souza Neto. – 2021.
104 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Silvia Guatimosim.

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

1. Fisiologia. 2. Coração. 3. Aldosterona. 4. Estresse Oxidativo. 5. Adrenérgicos. I. Fonseca, Silvia Carolina Guatimosim. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE N° 345 DE FERNANDO PEDRO DE SOUZA NETO

Às 09:00 horas do dia **30 do mês de agosto de 2021**, transmitida através da plataforma Zoom, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Fernando Pedro de Souza Neto**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Ivanita Stefanon**, CCS/Universidade Federal do Espírito Santo, **Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz**, ICB/Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**PI3K Gama Recruta gp91phox(NOX-2) e Induz Alterações Cardiodeletérias**". 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 Tese de Doutorado. 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, 30 de agosto de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Placoná Diniz, Usuário Externo**, em 31/08/2021, às 14:14, 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 **Stéfany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 31/08/2021, às 16:02, 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 **Ivanita Stefanon, Usuário Externo**, em 02/09/2021, às 08:53, 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 **Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 03/09/2021, às 16:40, 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 **Virginia Soares Lemos, Professora do Magistério Superior**, em 12/09/2021, às 09:31, 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 **0921020** e o código CRC **2FF56C83**.

Universidade Federal de Minas Gerais

Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitoria de Pós-Graduação

Pró-Reitor: Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

Instituto de Ciências Biológicas

Diretor: Prof. Carlos Augusto Rosa

Vice-Diretora: Prof^a. Élide Mara Rabelo

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Chefe: Prof^a. Grace Schenatto Pereira Moraes

Subchefe: Prof. Thiago Verano Braga

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Coordenadora: Prof^a. Silvia Guatimosim

Subcoordenador: Prof. Raphael Escorsim Szawka

Apoio Institucional e Financeiro

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização Cardíaca, situado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, e teve auxílio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) e da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

À minha mãe, Sandra, minha maior
inspiração na vida, e fonte inesgotável de alegria, força, coragem e amor.

Aos meus avós, Fernando, Edna, José e
Nara e meu Pai, Níger. De vocês se originam as profundas raízes do amor que me
envolve todos os dias.

À minha professora de literatura, Sandra
Rodrigues, por ter sido uma inspiração para a vida acadêmica.

Ao meu professor de Fisiologia Humana,
Iri Sandro Pampolha Lima, que despertou
em mim o amor pela Fisiologia Humana.

À minha orientadora, Professora Silvia
Guatimosim, por ser luz em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Sílvia Guatimosim, por todos os ensinamentos diários, pelas palavras de sabedoria e discernimento, pelas discussões ao final da aquisição de todos os resultados e por ter me inspirado a ser uma pessoa melhor. Eu serei sempre grato pela sua confiança em mim.

A Itamar Jesus, pela imensa contribuição na execução deste trabalho. Muito obrigado pela companhia diária na realização dos experimentos.

A todos que compõe o laboratório de Sinalização Cardíaca. Agradeço a todos em nome de Mário Morais, Anderson Santos e Marcos Eliezék, pela contribuição direta com este trabalho. Muito obrigado pelas discussões intermináveis sobre a ciência e sobre a vida.

À Professora Rafaela Fernandes e Maria Aparecida, por tudo que me ensinaram, pelas oportunidades de aprendizado proporcionadas e pela companhia no Laboratório de Fisiologia Renal.

Ao Prof. Robson Santos, pela confiança no meu trabalho, pelas oportunidades que me proporcionou e por tudo que me ensinou. Agradeço também aos Professores e colegas do Laboratório de Hipertensão, que foi tão importante para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos amados, que chegam junto comigo até aqui. Nossas conversas, nossos sorrisos (e lágrimas) foram fonte de força para que este ciclo fosse possível. Em nome do Bruno Sanches, companheiro minuto a minuto nesses últimos quatro anos, digo que esta jornada foi possível também por que vocês existem na minha vida.

À Professora Miriam Lopes e ao Professor Márcio Morais, pelas oportunidades de aprendizagem como representante discente, pelo exemplo de comprometimento com o trabalho e pelo encorajamento durante este doutorado.

Aos professores, técnico-administrativos e colegas da Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, por tudo que me ensinaram. Em especial, à Professora Maristela Poletini, Professora Daniella Bonaventura e o Professor Stêfany Cau, pelos aprendizados nas disciplinas, pela atenção, pelos sorrisos e pelas palavras de incentivo. Vão são inspiração para mim.

À Professora Virgínia Lemos, por sempre ter aberto as portas de seu laboratório para mim, pela confiança no meu trabalho e por sempre estar disposta a conversar sobre ideias e sobre a vida.

Aos professores que colaboraram com este trabalho, em especial a Professora Leda Quércia e o Professor Flávio Amaral, por terem cedido parte dos modelos animais para realização deste trabalho.

Aos técnicos do biotério, pelo trabalho e cuidado com os animais.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES, FAPEMIG, pelo apoio financeiro concedido.

“O conhecimento está a serviço da necessidade de viver.”

Miguel de Unamuno

“Você já pensou na semelhança que há entre os cientistas e os pescadores? O pescador está diante das águas do rio. E ele sabe que nas funduras daquelas águas nadam peixes que não são vistos. Mas ele quer pegar esses peixes. O que é que ele faz? Ele tece redes, lança-as no rio e pesca os peixes. Se as malhas forem largas, peixes grandes. Se forem apertadas, vêm também os peixes pequenos. O cientista está diante do mar chamado ‘realidade’. Ele também quer pescar peixes. Prepara então suas redes chamadas ‘teorias’, lança-as no mar e pesca seus peixes. O laboratório de um cientista são as redes que ele lança no mar da realidade para pescar conhecimento.”

Rubem Alves

RESUMO

O remodelamento cardíaco é o conjunto das alterações moleculares, celulares e teciduais que reflete as modificações estruturais e/ou funcionais do coração frente a diferentes estímulos, que podem ser fisiológicos ou patológicos. Diversos sistemas fisiológicos desempenham funções essenciais para o estabelecimento e progressão dessas alterações. Dentre eles, o sistema renina-angiotensina-aldosterona e o sistema nervoso autônomo, que são fundamentais nos ajustes fisiológicos da frequência, força e hemodinâmica cardíaca. Por outro lado, a ação excessiva dos efetores desses sistemas pode gerar modificações patológicas no músculo cardíaco, que, quando não resolvidas, estão associadas à instalação das doenças cardíacas. O remodelamento cardíaco patológico pode ser caracterizado por hipertrofia, fibrose e inflamação, que são, pelo menos em parte, mediados pelo desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes, o que é definido como estresse oxidativo. Neste contexto, a gp91^{phox} (NOX-2) é um agente fundamental, pois é a principal fonte de ROS para o tecido cardíaco. A atividade da gp91^{phox} pode ser modulada de diferentes formas, e sabe-se que as fosfoinositideo-3-quinases (PI3K), uma família de cinases que regulam funções como crescimento de cardiomiócitos, sobrevivência, inflamação e contratilidade cardíaca, também está associada à atividade de gp91^{phox} na produção de ROS. Embora haja evidências esparsas de que a gp91^{phox} medeia os efeitos cardíacos rápidos da aldosterona e de que tanto a PI3K quanto a gp91^{phox} estão envolvidas com os efeitos cardiodeletérios do estresse adrenérgico crônico, dados mecanicistas de como se dá a ativação desta via ainda não foram consolidados. Sendo assim, o intuito deste trabalho é entender o papel da gp91^{phox} nas alterações cardíacas agudas e crônicas que dependem do estresse oxidativo induzido por diferentes estímulos, e de definir o envolvimento da PI3K com a sua atividade. No presente estudo, nós avaliamos o papel da gp91^{phox} (i) nas alterações cardíacas agudas induzidas pela aldosterona, e (ii) no remodelamento cardíaco induzido pelo estresse adrenérgico crônico. No primeiro capítulo, nossos resultados mostram que a gp91^{phox} medeia os efeitos agudos da aldosterona: (a) na produção de ROS e carbonilação de proteínas no tecido cardíaco; (b) na oxidação da calmodulina quinase II (CaMKII) e no transiente de cálcio citoplasmático; e (c) em vias pró-inflamatórias celulares e teciduais no coração. Mostramos também que a PI3K γ participa do efeito oxidativo da aldosterona em cardiomiócitos ventriculares isolados. Já no segundo capítulo, mostramos que: (d) que a NADPH oxidase participa do efeito fibrótico e hipertrófico do estresse adrenérgico crônico; e que (e) estes efeitos dependem da via gp91^{phox}/PI3K γ /ROS. Juntas, estas evidências trazem um maior entendimento sobre o envolvimento da gp91^{phox} nas alterações cardíacas agudas e crônicas que dependem do estresse oxidativo, e do papel crucial da PI3K γ como seu mediador *upstream*, o que coloca a via de sinalização PI3K γ /gp91^{phox}/ROS como alvo importante no estudo dos mecanismos das doenças cardíacas caracterizadas por inflamação, hipertrofia e fibrose cardíaca.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; aldosterona; sinalização adrenérgica; remodelamento cardíaco.

ABSTRACT

Cardiac remodeling characterizes a group of molecular, cellular and tissue changes that reflect the structural and/or functional alterations of the heart in response to different stimuli, which can be physiological or pathological. Several physiological systems play essential roles for the establishment and progression of these changes. Among them, the renin-angiotensin-aldosterone and the autonomic nervous system are fundamental in the physiological adjustments of cardiac frequency, strength and hemodynamics. On the other hand, the excessive action of the effectors of these systems can generate pathological changes in the heart muscle, which, when unresolved, are associated with the onset of heart disease. Pathological cardiac remodeling can be characterized by hypertrophy, fibrosis, and inflammation, which are, at least in part, mediated by the imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defenses, which is defined as oxidative stress. In this context, gp91^{phox} (NOX-2) is a key agent, as it is the main source of ROS in the cardiac tissue. The activity of gp91^{phox} can be modulated by different stimuli, and phosphoinositide-3-kinases (PI3K), a family of kinase that regulate functions such as cardiomyocyte growth, survival, inflammation and cardiac contractility, are also known to be associated with the activity of gp91^{phox} in ROS production. Although there is sparse evidence that gp91^{phox} mediates the rapid cardiac effects of aldosterone and that both PI3K and gp91^{phox} are involved with the cardiodeleterious effects of chronic adrenergic stress, mechanistic data on how this pathway is activated has not yet been consolidated. Therefore, the aim of this work is to understand the role of gp91^{phox} in acute and chronic cardiac alterations that depend on oxidative stress induced by different stimuli, and to define the involvement of PI3K in this process. In the present study, we evaluated the role of gp91^{phox} (i) in acute cardiac changes induced by aldosterone, and (ii) in cardiac remodeling induced by chronic adrenergic stress. In the first chapter, our results show that gp91^{phox} mediates the acute effects of aldosterone: (a) on ROS production and protein carbonylation in cardiac tissue; (b) in the oxidation of calmodulin kinase II (CaMKII) and in the cytoplasmic calcium transient; and (c) in cellular and tissue proinflammatory pathways in the heart. We also show that PI3K γ participates in the oxidative effect of aldosterone on isolated ventricular cardiomyocytes. In the second chapter, we show that: (d) that NADPH oxidase participates in the fibrotic and hypertrophic effects of chronic adrenergic stress; and that (e) these effects depend on the gp91^{phox}/PI3K γ /ROS pathway. Together, these evidences bring a greater understanding of the involvement of gp91^{phox} in acute and chronic cardiac abnormalities that depend on oxidative stress, and the crucial role of PI3K γ as its *upstream* mediator. Our data support the idea that tools targeting the PI3K γ /gp91^{phox}/ROS signaling pathway may be important in the study of the mechanisms of cardiac diseases characterized by inflammation, hypertrophy and cardiac fibrosis.

Keywords: Oxidative stress; aldosterone; adrenergic signaling; cardiac remodeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica.....	18
Figura 2. Diferentes estágios da hipertrofia cardíaca.....	20
Figura 3. Categorias dos diferentes tipos de fibroblastos residentes no coração.	22
Figura 4. Os efeitos do estresse oxidativo no miocárdio.....	25
Figura 5. Estrutura e atividade da gp91 ^{phox} (NOX-2).	26
Figura 6. Ações genômicas vs ações não-genômicas da aldosterona.....	31
Figura 7. A aldosterona induz estresse oxidativo, inflamação e fibrose.....	31
Figura 8. Hipótese central: a atividade da gp91 ^{phox} e consequente produção de espécies reativas de oxigênio é um componente <i>upstream</i> , regulador de vias de sinalização ativadas pela aldosterona no coração.	34
Figura 9. Validação do modelo de deleção genética da gp91 ^{phox}	41
Figura 10. Expressão do receptor de mineralocorticoide (MR) e do receptor de glicocorticoide (GR) no coração de animais com deleção genética da gp91 ^{phox}	42
Figura 11. A produção de ROS induzida por aldosterona não ocorre no coração de animais com deleção genética da gp91 ^{phox}	43
Figura 12. Animais com deleção genética da gp91 ^{phox} são protegidos contra o aumento da oxidação de proteínas induzido pela aldosterona.....	44
Figura 13. Animais com deleção genética da gp91 ^{phox} não apresentam aumento da oxidação da CaMKII induzido pela aldosterona..	48
Figura 14. Cardiomiócitos de camundongos gp91 ^{phox-/-} não apresentam aumento no transiente de Ca ²⁺ induzido por aldosterona.....	47
Figura 15. Translocação nuclear do NF-κβ em resposta à aldosterona depende da atividade da gp91 ^{phox} em cardiomiócitos.	48
Figura 16. Expressão gênica de alvos relacionados ao remodelamento cardíaco no miocárdio de camundongos wild type tratados com aldosterona.	51
Figura 17. Indução de marcadores inflamatórios pela aldosterona está inibida no coração de camundongos gp91 ^{phox-/-}	52
Figura 18. O aumento da fosforilação de ERK1/2 induzida pela aldosterona depende das ROS derivadas da gp91 ^{phox}	52
Figura 19. A PI3Kγ participa do efeito da aldosterona sobre a produção de ROS em cardiomiócitos de camundongos..	53
Figura 20. Sistema nervoso adrenérgico e o coração: ativação e regulação.....	61
Figura 21. Representação esquemática da sinalização β-AR em cardiomiócitos.....	62
Figura 22. Sinalização do β-AR em cardiomiócitos em condições fisiológicas e durante a insuficiência cardíaca..	63
Figura 23. Hipótese central: o remodelamento cardíaco induzido pelo estímulo β-adrenérgico sustentado depende da ativação de gp91 ^{phox} mediada pela PI3Kγ.	66
Figura 24. Apocinina atenua o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio induzido pelo estresse adrenérgico.....	72
Figura 25. Apocinina atenua a hipertrofia cardíaca induzida pelo estresse adrenérgico crônico.....	73
Figura 26. Apocinina impede o aumento do número de células β-MHC-YFP positivas induzido pelo estresse adrenérgico.....	74

Figura 27. Apocinina atenua a fibrose cardíaca induzida pelo estresse adrenérgico crônico.	75
Figura 28. Apocinina previne o aumento da expressão de marcadores moleculares de fibrose cardíaca induzido pelo estresse adrenérgico.	76
Figura 29. O estresse adrenérgico aumenta a expressão da gp91 ^{phox} no tecido cardíaco.	77
Figura 30. O isoproterenol não induz aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco de camundongos gp91 ^{phox-/-}	80
Figura 31. O isoproterenol não induz hipertrofia cardíaca em camundongos gp91 ^{phox-/-}	81
Figura 32. Tratamento com isoproterenol não induziu fibrose cardíaca nos animais gp91 ^{phox-/-}	80
Figura 33. O isoproterenol não aumenta a expressão dos marcadores moleculares de fibrose cardíaca induzido pelo estresse adrenérgico.	81
Figura 34. Cardiomiócitos de camundongos gp91 ^{phox-/-} apresentam aumento no transiente de Ca ²⁺ induzido pelo isoproterenol.	82
Figura 35. O estresse adrenérgico aumenta a expressão do mRNA para <i>Pik3cg</i> no tecido cardíaco.	83
Figura 36. Estímulo adrenérgico promove aumento da produção de ROS em cardiomiócitos ventriculares via PI3K γ	84
Figura 37. O isoproterenol não induz aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco de camundongos PI3K γ ^{KD/KD}	85
Figura 38. Tratamento com isoproterenol não foi capaz de induzir fibrose cardíaca nos animais PI3K γ ^{KD/KD} . Tratamento com isoproterenol não foi capaz de induzir fibrose cardíaca nos animais PI3K γ ^{KD/KD}	86
Figura 39. Tratamento com isoproterenol não induz aumento na expressão dos marcadores moleculares de fibrose cardíaca no coração de camundongos PI3K γ ^{KD/KD}	87
Figura 40. Cardiomiócitos de camundongos PI3K γ ^{KD/KD} apresentam aumento no transiente de Ca ²⁺ induzido pelo isoproterenol.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AKT	Proteína quinase B
AngII	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
APO	Apocinina
AR	Receptor adrenérgico
AS605240	Inibidor farmacológico da PI3K γ
CaMKII	Calmodulina quinase II
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
CTR	Controle
DAG	Diacilglicerol
DHE	Dihidroetidio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
Epi	Epinefrina
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
Gi/o	Proteína G inibitória
gp91ds-tat	Inibidor farmacológico da gp91 ^{phox}
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
GPR-30	Receptor acoplado à proteína G 30
GR	Receptor de glicocorticoide
GRK2	Receptor quinase acoplado à proteína G
Gs	Proteína G estimulatória
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HO-1	Hemeoxigenase 1
HW/TL	Razão do peso do coração pelo tamanho da tíbia
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-33	Interleucina 33
IP3	Inositol trifosfato
ISO	Isoproterenol
IVS;d	Espessura do septo interventricular
JNK	c-Jun N-terminal cinase
KCl	Cloreto de potássio
KG	Kilogramas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MDA	Malonaldeído

MMP-2	Metaloproteinase de matriz do tipo 2
MMP-9	Metaloproteinase de matriz do tipo 9
MMP	Metaloproteinases de matriz
MR	Receptor de mineralocorticoide
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Ncf1 ^{-/-}	Camundongos nocautes para p47 ^{phox}
NE	Noradrenalina
NES	Escore de enriquecimento normalizado
NET	Transportador de noradrenalina
NFAT	Nuclear factor of activated T-cell
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGAL1	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NRF2	Fator 2 relacionado ao fator eritroide
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PAST	PAleontological STatistics
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PLN	Fosfolambam
PVDF	Polifluoreto de vinilideno
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SEM	Erro padrão da média
SGK	serum- and glucocorticoid-regulated kinase
SNS	Sistema nervoso simpático
SOD	Superóxido dismutase
TAC	Constrição da aorta transversa
TGF-β	Fator de crescimento e transformação do tipo beta
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloproteinase do tipo 2
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VSMC	Células do músculo liso vascular
WGA	Wheat germ agglutinin
WT	Wild type
α-MHC	Miosina de cadeia pesada do tipo alfa
α-SMA	Actina do músculo liso do tipo alfa
β-MHC	Miosina de cadeia pesada do tipo beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Remodelamento cardíaco: conceitos gerais	17
1.2 Alterações funcionais no remodelamento cardíaco	19
1.3 Alterações celulares no remodelamento cardíaco	21
1.4 Mecanismos moleculares do remodelamento cardíaco	23
1.5 ROS, estresse oxidativo e o remodelamento cardíaco	24
CAPÍTULO I	27
<i>Ativação da PI3K gama/gp91^{phox} (NOX-2) é um sinal downstream necessário para ativação dos efeitos cardíacos agudos da aldosterona.</i>	27
2. REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 Ações cardíacas da aldosterona	28
2.2 Ações genômicas da aldosterona no coração	28
2.3 Ações não-genômicas da aldosterona no coração	29
2.4 A gp91 ^{phox} (NOX-2) e os efeitos cardíacos da aldosterona	31
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL	33
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo geral	35
4.2 Objetivos específicos	35
5. MÉTODO	36
5.1 Animais	36
5.2 Coleta do tecido cardíaco	36
5.3 Mensuração de ROS	36
5.4 Ensaio de imunofluorescência	37
5.5 Avaliação da expressão proteica por <i>Western blot</i>	37
5.6 Isolamento de cardiomiócitos adultos e análise da sinalização de cálcio	38
5.7 Avaliação da expressão de RNAm por qRT-PCR	39
5.8 Análise estatística	39
6. RESULTADOS (CAPÍTULO I)	41
7. DISCUSSÃO (CAPÍTULO 1)	54
CAPÍTULO II	57
<i>Sinalização adrenérgica recruta fosfatidilinositol-3-cinase (PI3Kγ)/gp91^{phox} para induzir remodelamento cardíaco.</i>	57
8. REVISÃO DE LITERATURA	58
8.1 Sinalização β -adrenérgica no coração	58

8.2	O estímulo adrenérgico excessivo promove remodelamento cardíaco patológico .	61
8.3	A sinalização redox está envolvida no remodelamento cardíaco induzido pelo estresse adrenérgico	63
8.4	Participação da gp91 ^{phox} nas alterações cardíacas induzidas pelo estresse adrenérgico	64
9.	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL	66
10.	OBJETIVOS	68
10.1	Objetivo Geral	68
10.2	Objetivos Específicos	68
11.	MATERIAIS E MÉTODOS	69
11.1	Aspectos Éticos	69
11.2	Animais	69
11.3	Tratamento <i>in vivo</i> com isoproterenol e Apocinina	69
11.4	Análise da hipertrofia cardíaca e da área celular	70
11.5	Análise da deposição total de colágeno.....	70
11.6	Tratamento <i>in vitro</i> com isoproterenol ou com o AS605240 em cardiomiócitos ventriculares isolados.....	71
11.7	Análise estatística	71
12.	RESULTADOS (CAPÍTULO II)	72
13.	DISCUSSÃO (CAPÍTULO II)	89
14.	CONCLUSÃO	94
15.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 Remodelamento cardíaco: conceitos gerais

As doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo. Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que elas foram responsáveis pela morte de 8,9 milhões de morte em todo o mundo, o que corresponde a 16% dentre todas as causas de mortalidade (WHO, 2020) A patogênese destas doenças envolve inflamação, hipertrofia, fibrose e estresse oxidativo, que compõem o remodelamento estrutural e funcional do sistema cardiovascular, provocando efeitos deletérios ao organismo e levando à morte.

As alterações intersticiais, celulares e moleculares que promovem manifestações clínicas em tamanho, forma e função do coração, decorrentes de um estímulo estressor, são denominadas de remodelamento cardíaco. O remodelamento pode ser classificado em dois subtipos, fisiológico ou patológico (COHN *et al.*, 2000; AZEVEDO *et al.*, 2015). O remodelamento do tipo fisiológico se dá quando são observadas alterações na estrutura ou função cardíaca, como aumento de massa e dimensões, acompanhadas de preservação ou aumento da contratilidade deste órgão, como ocorre em resposta ao exercício físico (KEMI *et al.*, 2007). Já o remodelamento do tipo patológico está relacionado muitas vezes às alterações que progridem com redução da performance cardíaca e reexpressão de genes fetais, como acontece após o infarto agudo do miocárdio, na Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e nas miocardites (BURCHFIELD, XIE e HILL, 2013).

Um evento comum ao remodelamento cardíaco, seja fisiológico ou patológico, é a hipertrofia, conceituada como um aumento do músculo cardíaco e caracterizada pela ativação de vias de sinalização hipertróficas, com conseqüente aumento do volume celular (ZHU *et al.*, 2019). Em termos gerais, a hipertrofia cardíaca é uma resposta adaptativa que oferece ao coração a capacidade de tolerar melhor uma pressão diastólica final aumentada, com manutenção do débito cardíaco (FREY *et al.*, 2004).

O desfecho clínico da hipertrofia, entre fisiológica ou patológica, é determinado principalmente pela natureza do estímulo e, portanto, das vias de sinalização ativadas no coração (KEMI *et al.*, 2007). Na hipertrofia fisiológica ocorre manutenção ou otimização da performance funcional cardíaca, com melhoria da eficiência energética,

ativação dos sistemas antioxidantes e aumento da angiogênese de forma proporcional ao crescimento cardíaco. Por outro lado, diante da persistência do estímulo hipertrófico, o coração pode progredir com dilatação de suas paredes, redução da contratilidade e insuficiência (Figura 1). Assim, esta hipertrofia é considerada patológica, pois é acompanhada de ativação excessiva de fibroblastos, morte celular e alteração na expressão dos genes que codificam as proteínas responsáveis pela mobilização do cálcio intracelular (NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018).

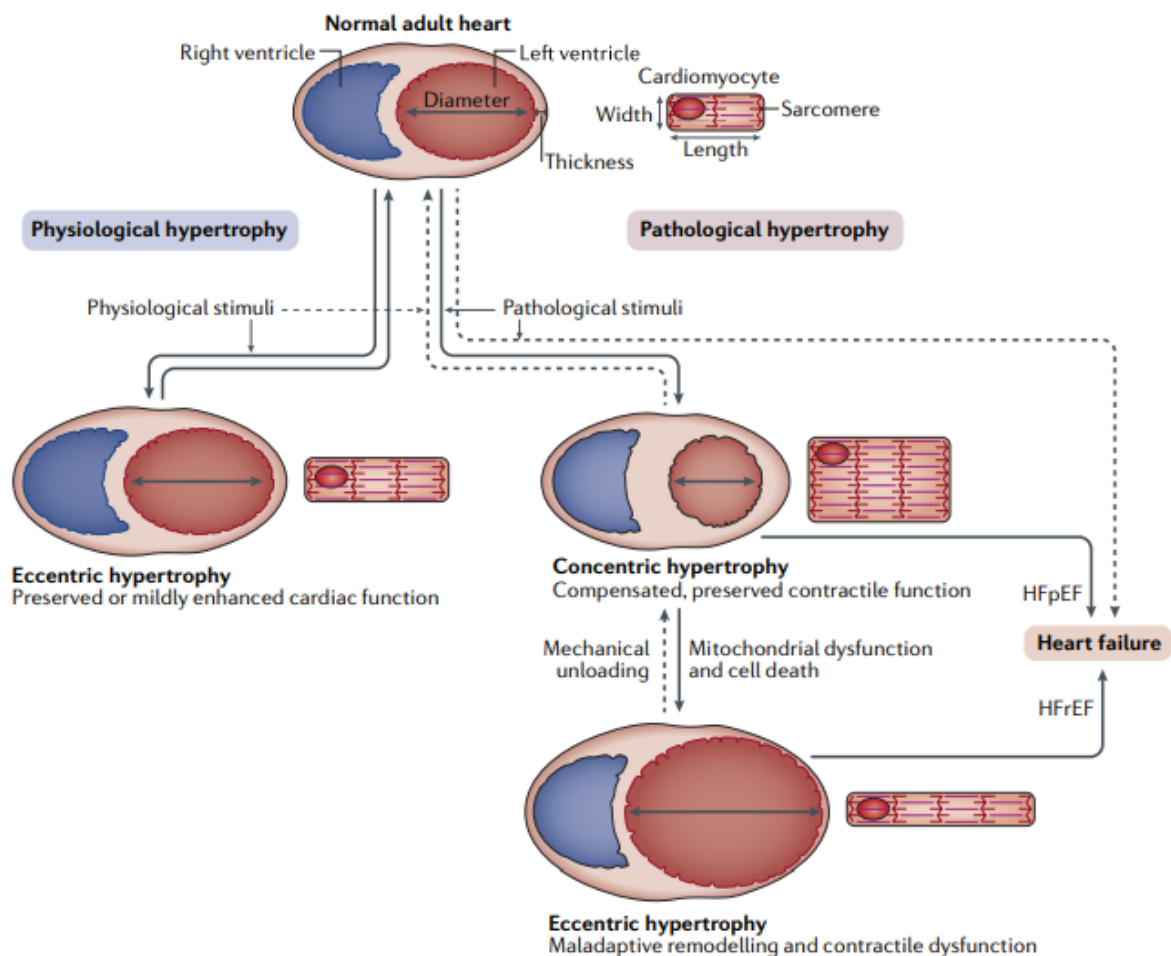


Figura 1. Visão geral da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica. A natureza do estímulo determina se as adaptações estruturais e funcionais do coração levarão ao estado patológico ou não. Na hipertrofia fisiológica é observada preservação ou incremento da função cardíaca. Já na hipertrofia patológica, o aumento do músculo cardíaco é acompanhado por alterações em sua contratilidade, culminando em disfunção e insuficiência nos estágios mais avançados. Fonte: Nakamura e Sadoshima, 2018.

Estímulos de diferentes tipos podem promover remodelamento cardíaco patológico. Infecções (NUNES ET AL., 2018), doenças pulmonares (MIKHAEEL et al., 2019), subnutrição (EL-SAYED et al., 2005), estenose aórtica (YARBROUGH et al., 2012), diabetes melitus (YAP et al., 2019), anemia (MARTENS et al., 2016) e uma série de outras doenças e condições clínicas. Nos capítulos subsequentes que tratam dos resultados desta tese, daremos ênfase a dois sistemas de controle fisiológicos: (a) sistema renina-angiotensina, representado pela aldosterona, um dos seus principais efetores; e (b) sistema nervoso autônomo, com foco na atividade adrenérgica. Ambos os sistemas, embora sejam absolutamente importantes para a manutenção da homeostase cardiovascular, quando apresentam atividade exacerbada, conduzem a alterações estruturais e funcionais do músculo cardíaco que estão relacionadas ao remodelamento patológico do órgão.

1.2 Alterações funcionais no remodelamento cardíaco

Nos estágios iniciais do remodelamento são observadas adaptações que podem promover incremento da função cardíaca, podendo, inclusive, serem consideradas benéficas para o músculo cardíaco diante do estímulo estressor (COHN et al., 2000). Durante a fase inicial (compensatória) do remodelamento cardíaco induzido pelo estresse adrenérgico crônico são observadas mudanças funcionais nos cardiomiócitos que sugerem incremento da função cardíaca. No estudo de Parreira et al. (2020) foi demonstrado que a administração de uma dose de 20mg/kg/dia de isoproterenol por um período de 7 dias promoveu aumento da contratilidade de cardiomiócitos ventriculares de camundongos. O incremento da função cardíaca foi observado também em animais geneticamente modificados com superexpressão de receptores β_1 adrenérgicos no coração (animais β_1 TG4). Os animais β_1 TG4 jovens apresentaram aumento da contratilidade cardíaca associado ao desenvolvimento da hipertrofia quando comparados aos animais selvagens. Entretanto, ao longo do tempo, estes animais passaram a apresentar redução da contratilidade cardíaca a partir da décima quinta semana de vida, e consequente insuficiência cardíaca quando idosos (ENGELHARDT et al., 1999). Este é um excelente exemplo de que, em termos gerais, a persistência do estímulo patológico promove a transição da hipertrofia compensatória para um estado em que o coração se torna incapaz de manter sua função, ocorrendo, portanto, a insuficiência.

Esta associação assimétrica entre alterações estruturais no músculo cardíaco e alterações funcionais que variam positivamente ou negativamente ao longo do tempo também pode ser observada no remodelamento cardíaco induzido pela sobrecarga pressórica. Camundongos submetidos à cirurgia de constrição da aorta transversa (TAC), um modelo clássico de hipertrofia cardíaca induzida por aumento de pós-carga, apresentam, na fase inicial do remodelamento, hipertrofia compensatória e aumento da contratilidade cardíaca (DEALMEIDA et al., 2010). Com duas semanas após a realização da TAC são observadas a hipertrofia celular e o aumento da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo, sem a presença de alterações da função no exame ecocardiográfico (SILVA et al., 2021). Por outro lado, este cenário altera quando os animais são avaliados 4 semanas após a realização da TAC. Neste tempo, já é possível observar alterações na estrutura cardíaca, como aumento da massa e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo, mas também redução da fração de ejeção (LI et al., 2018).

Frequentemente, a hipertrofia cardíaca concêntrica - observada nos estágios iniciais do remodelamento cardíaco, evolui para um fenótipo dilatado e excêntrico (HEINEKE E MOLKENTIN, 2006), como pode ser observado na Figura 2. Isto pode ser explicado pela adição de sarcômeros em série no músculo cardíaco.

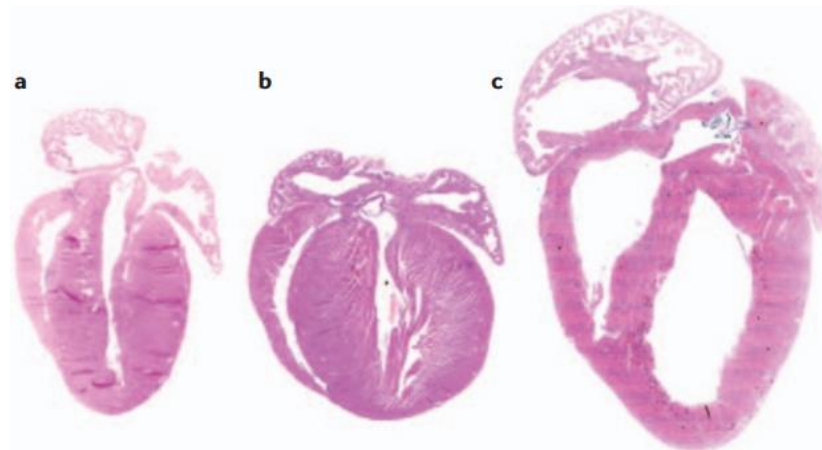


Figura 2. Diferentes estágios da hipertrofia cardíaca. Cortes longitudinais do coração de camundongos em diferentes estágios de hipertrofia. (a) Coração de um camundongo adulto jovem; (b) Coração de um animal com hipertrofia concêntrica, que pode apresentar manutenção de sua função. (c) Coração de camundongo com cardiomiopatia caracterizada pela hipertrofia excêntrica e dilatação, estado em que já pode ser observada redução da performance cardíaca. Fonte: Heineke e Molkentin, 2006.

1.3 Alterações celulares no remodelamento cardíaco

No remodelamento cardíaco ocorre uma interação complexa entre cardiomiócitos e as demais células que povoam o tecido. Um dos eventos celulares clássicos do remodelamento cardíaco é a hipertrofia dos cardiomiócitos. Em modelos experimentais de hipertrofia cardíaca, o aumento do tamanho dos cardiomiócitos é um evento clássico. A administração de agonistas adrenérgicos em dias consecutivos, por exemplo, promove aumento da área de cardiomiócitos ventriculares (PARREIRA et al., 2020), estando este efeito associado ao aumento da expressão de genes fetais, que é um evento molecular característico do remodelamento cardíaco hipertrófico.

O aumento na área celular também é observado em modelos experimentais que tem como base as alterações nos componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A administração exógena de efetores desse sistema, como angiotensina II e aldosterona, induzem hipertrofia cardíaca com aumento da área dos cardiomiócitos ventriculares. Wang et al. (2018) mostraram que a infusão de 1000ng/kg/min de angiotensina II por via subcutânea durante 2 semanas em camundongos induz o aumento do peso do coração, associado ao aumento da área dos cardiomiócitos e expressão aumentada do ANP (peptídeo natriurético atrial) e BNP (peptídeo natriurético cerebral). Nesta mesma linha, camundongos submetidos à administração de aldosterona (137µg/kg/dia) por via subcutânea durante um período de 8 semanas, associada à administração de 1% de NaCl + 0,3% KCl na água de beber, também apresentam hipertrofia cardíaca caracterizada por aumento da área dos cardiomiócitos ventriculares (SYED et al., 2018). Um estudo publicado previamente pelo nosso grupo também mostrou o aumento na área de cardiomiócitos ventriculares isolados de ratos TGR (mREN2)27, que apresentam hipertrofia cardíaca devido à expressão aumentada de renina em tecidos extrarenais, (JESUS et al., 2020).

O fenômeno hipertrófico está, muito frequentemente, associado à fibrose cardíaca, tendo como mediador celular mais importante os fibroblastos, que são as células bastante abundantes no tecido cardíaco em termos de número (HARA et al., 2017). Estas células podem assumir diferentes fenótipos funcionais e estruturais, levando-se em conta os diferentes estágios do remodelamento cardíaco. Conforme pode-se observar na Figura 3, os fibroblastos cardíacos aumentam a produção de colágeno de forma proporcional ao seu grau de ativação, que pode ser indicado pela

expressão de actina do músculo liso do tipo α (α -SMA). Quando expressam este marcador, são então classificados como miofibroblastos, apresentando expressão reduzida de marcadores altamente expressos nos fibroblastos quiescentes ou ativados (TALLQUIST E MOLKENTIN, 2017).

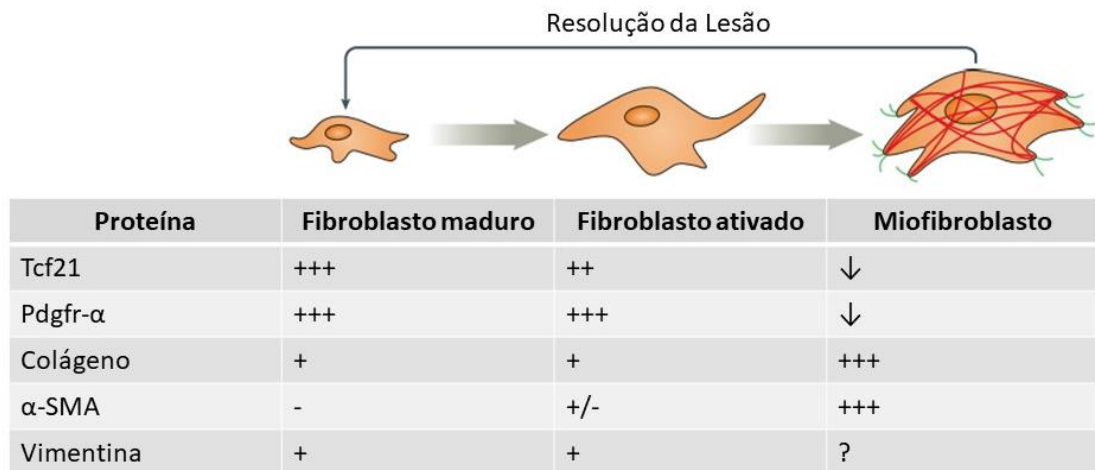


Figura 3. Categorias dos diferentes tipos de fibroblastos residentes no coração. Pelo menos três diferentes perfis de expressão de marcadores podem ser utilizados para classificar os fibroblastos cardíacos. Fonte: Adaptado de Tallquist e Molkentin, 2017.

Além da contribuição dos fibroblastos cardíacos para a manutenção da matriz extracelular, ou para sua deposição excessiva, estas células também secretam enzimas, fatores de crescimento e citocinas que interferem diretamente na instalação e progressão da fibrose cardíaca, e também contribuem para a própria hipertrofia de cardiomiócitos. (LÓPEZ et al., 2021). A comunicação parácrina que ocorre entre fibroblastos ativados e cardiomiócitos durante o desenvolvimento do remodelamento cardíaco envolve fatores de crescimento como TGF- β , PDGF, IGF-1 e citocinas (IL-33) (TAKEDA E MANABE, 2011). Para além dos mediadores químicos, as interações entre cardiomiócitos e fibroblastos também podem ocorrer por meio de comunicação elétrica. (HALL et al., 2021; PELLMAN et al, 2016). O estudo de Vasquez et al. (2010) mostrou que o infarto do miocárdio induz mudanças no fenótipo de fibroblastos, aumentando o seu grau de interação com cardiomiócitos, que, em última análise, contribui para a instalação de eventos arrítmicos com ocorrência predominante nas áreas fibróticas.

Além dos cardiomiócitos e fibroblastos, as células inflamatórias também compõem o microambiente tecidual no remodelamento cardíaco patológico. Mas é

importante ressaltar que, assim como os fibroblastos residentes – que são importantes para a manutenção da matriz extracelular em condições fisiológicas, os macrófagos cardíacos residentes desempenham funções não-inflamatórias importantes para a manutenção da atividade cardíaca em situações fisiológicas (HULSMANS et al., 2017).

A inflamação cardíaca e infiltração de leucócitos são fenômenos observados no remodelamento cardíaco induzido pelo estresse adrenérgico. Xiao et al. (2018) mostraram que uma única dose de 5 mg/kg de isoproterenol administrada por via subcutânea em camundongos promove o aumento da expressão de citocinas inflamatórias 12, 24 e 74 horas após a administração deste agonista adrenérgico. Associado ao aumento de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o isoproterenol promove também a infiltração de macrófagos no tecido cardíaco, com consequente fibrose e disfunção diastólica.

A contribuição dos macrófagos infiltrados para o desenvolvimento da disfunção cardíaca diastólica também é observada no remodelamento cardíaco induzido pela administração de aldosterona e sal (1% NaCl) em camundongos submetidos à nefrectomia unilateral. Neste modelo experimental, macrófagos cardíacos produzem IL-10, que ativa fibroblastos via sinalização parácrina e promovem, em última instância, a deposição de colágeno com consequente prejuízo no relaxamento do músculo cardíaco (HULSMANS et al., 2018).

1.4 Mecanismos moleculares do remodelamento cardíaco

A patogênese do remodelamento cardíaco patológico envolve uma série de eventos moleculares que se distribuem entre sinalizadores e transdutores de sinais. O estresse biomecânico, estímulos neuro-humorais, alterações no perfil transcricional, mediadores inflamatórios e o desequilíbrio redox configuram-se como processos-chave que interagem entre si e direcionam as alterações celulares e teciduais nos seus diferentes estágios do processo patológico (PITOULIS E TERRACCIANO, 2020; HARTUPEE E MANN, 2017; QUILES et al., 2017; ADAMO et al., 2020). No contexto inflamatório, a ação dos mediadores inflamatórios pode funcionar como uma causa direta do remodelamento patológico, mas também pode exacerbar o remodelamento cardíaco já existente (YOSHIDA et al., 2015). Já o estresse físico crônico, como a sobrecarga pressórica induzida pela TAC, induz o aumento da atividade de MAPK

(proteína quinase ativada por mitógenos) que alteram o perfil transcricional e fazem com que as células cardíacas passem a expressar genes relacionados à hipertrofia cardíaca (VAN EICKELS et al., 2001; SILVA et al., 2020). O remodelamento cardíaco patológico também pode estar associado ao aumento da sinalização mediada pela via calcineurina-NFAT (do inglês, nuclear fator of activated T-cell). Isto ocorre quando a calcineurina promove a desfosforilação e translocação nuclear do NFAT, que promove a reexpressão de genes fetais relacionados ao remodelamento cardíaco (WILKINS et al., 2004; KUMAR et al., 2018).

1.5 ROS, estresse oxidativo e o remodelamento cardíaco

Um número grande de estudos utilizando modelos experimentais animais e em humanos têm demonstrado o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ROS) no remodelamento cardíaco patológico (DEY et al., 2018; ZHANG et al., 2012; ZHANG et al., 2020). Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos endógenos antioxidantes de defesa, denominados de “estado redox” (VAN DER POL et al., 2019).

As ROS são componentes envolvidas na fisiopatologia das doenças cardíacas, principalmente por que influenciam a função contrátil dos cardiomiócitos, deposição excessiva de matriz extracelular e hipertrofia celular (Figura 4). Elas são espécies químicas formadas por oxigênio que possuem alta reatividade com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, danificando organelas como membranas e o núcleo celular. Elas incluem os radicais livres (O_2^-) e os não- radicais, que são capazes de gerar os radicais livres (H^2O_2) (MUNZEL et al., 2015; TSUTSUI et al., 2011; SEDDON et al., 2006).

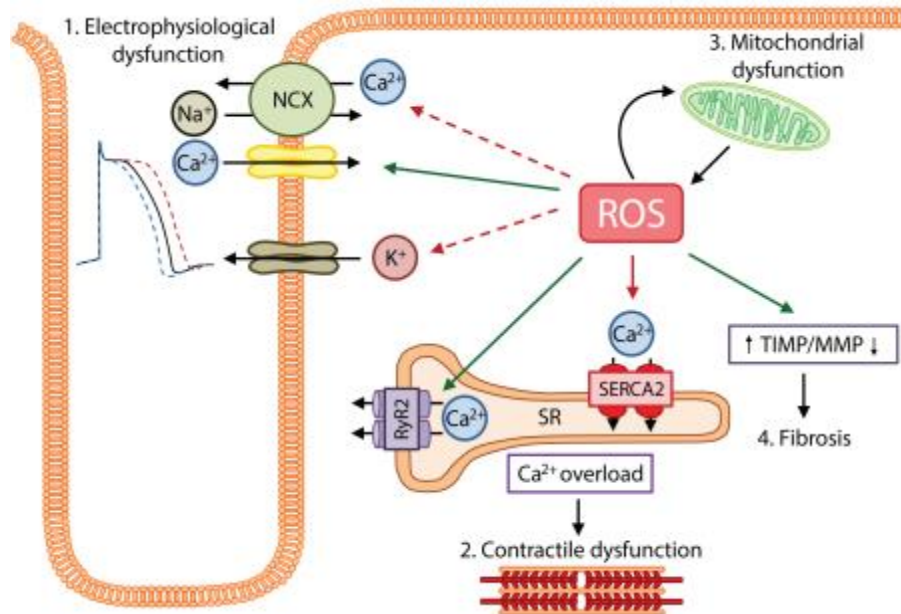


Figura 4. Os efeitos do estresse oxidativo no miocárdio. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas do desequilíbrio no estado redox promovem alterações elétricas nos cardiomiócitos, alteram a atividade da recaptação do Ca²⁺ citoplasmático pela SERCA2 e modulam a atividade dos receptores de rianodina presentes no retículo sarcoplasmático; também promovem alterações na expressão e atividade das metaloproteínas de matriz (MMPs) e de seus inibidores teciduais (TIMPs). Setas verdes indicam aumento dos mecanismos que tornam maiores as concentrações citoplasmáticas de Ca²⁺, bem como aumento da razão TIMP/MMP. Setas vermelhas tracejadas indicam efeito reversos das ROS sobre os canais de K⁺ e o trocador NCX. Fonte: van der Pol et al., 2019.

A produção das ROS se dá principalmente através da atividade da NADPH oxidase, que é uma enzima multimérica formada por um complexo de proteínas ligado à membrana e outras subunidades citosólicas. Existem cinco diferentes subunidades catalíticas de NOX, enumeradas de 1 a 5, que apresentam níveis de expressão distintos nos diferentes tecidos. No coração, a mais expressa é a NOX-2, também conhecida como gp91^{phox}. Em condições de repouso, a gp91^{phox} e uma outra subunidade de menor peso molecular, a p22^{phox}, estão localizadas na membrana como um complexo inativo. A ativação de gp91^{phox} necessita da associação de suas unidades regulatórias citosólicas p67^{phox}, Rac, p47^{phox} e p40^{phox} com o flavocitocromo, que catalisa a conversão de NADPH em oxigênio molecular, promovendo a formação de superóxido. A alteração conformacional de p47^{phox} resultante de sua fosforilação promove sua interação com p22^{phox}, que, por fim, resulta na ativação de gp91^{phox} (ZHANG, 2020; LAMBETH, 2004; MURDOCH, 2006)

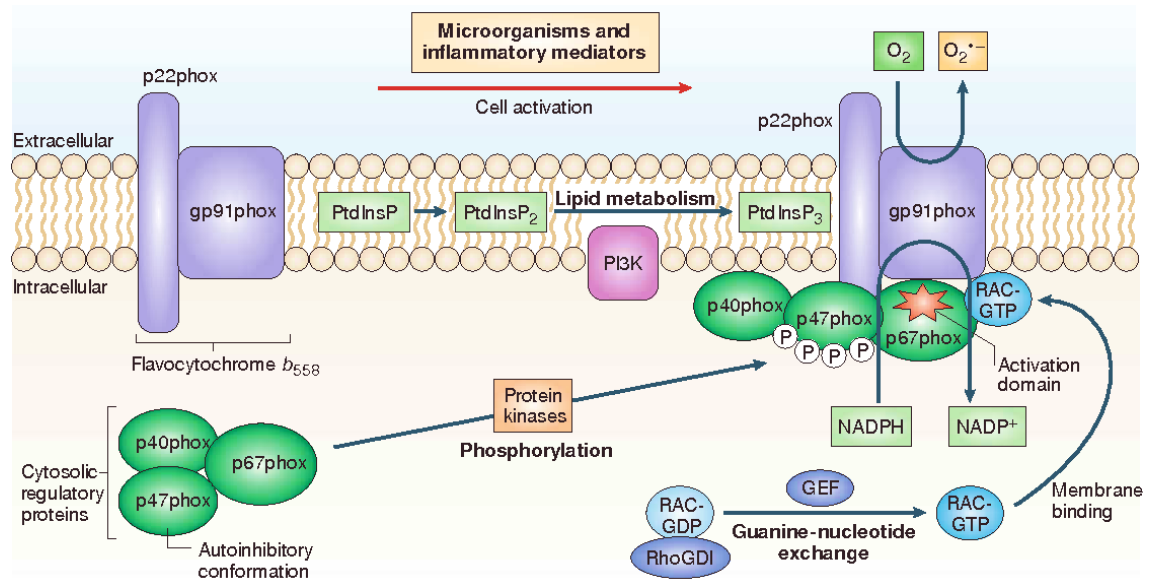


Figura 5. Estrutura e atividade da gp91^{phox} (NOX-2). A gp91^{phox} é a principal subunidade catalítica da NADPH oxidase no coração. Ela está ancorada na membrana, e sua atividade depende da translocação para a membrana das suas subunidades regulatórias citosólicas (p40^{phox}, p67^{phox} e p47^{phox}), que ao serem fosforiladas, ativam a atividade catalítica da gp91^{phox}, promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio. Fonte: Lambert, 2004.

O aumento da atividade de gp91^{phox} ocorre em resposta a uma série de alterações patológicas cardíacas, incluindo fibrose, hipertrofia e disfunção ventricular. Sendo assim, a atenuação da atividade desta enzima está associada à prevenção destes eventos patológicos. Muito embora a ativação da gp91^{phox} seja um processo que aconteça rapidamente, este evento é observado tanto em condições cardíacas agudas quanto crônicas. Tendo em vista a abrangência do estresse oxidativo no que tange os mecanismos patológicos, agudos ou crônicos, é necessário que se entenda de forma mais clara como a sinalização redox derivada da gp91^{phox} está envolvida em fenômenos cardíacos como contratilidade, hipertrofia e fibrose cardíaca.

CAPÍTULO I

Ativação da PI3K gama/gp91^{phox} (NOX-2) é um sinal downstream necessário para ativação dos efeitos cardíacos agudos da aldosterona.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ações cardíacas da aldosterona

Aldosterona é o principal hormônio esteroide com ação mineralocorticoide (SZTECHMAN, 2018). Produzida e liberada pela zona glomerulosa do córtex da glândula adrenal, sua importância na atividade renal é bastante descrita, especialmente sobre a reabsorção de sódio na porção distal dos néfrons e também sobre regulação a longo prazo da pressão arterial (MIHAILIDOU, 2012; CATENA et al., 2014). Um número crescente de trabalhos tem elucidado suas ações sobre outros tecidos, que ocorrem principalmente por meio do receptor de mineralocorticoide (MR) e são potencialmente intensificadas na presença de alta ingestão de sal. Nesta linha, evidências apontam que elevados níveis de aldosterona promovem remodelamento cardiovascular, caracterizado por inflamação, hipertrofia e fibrose (BRIET E SCHIFFRIN, 2010; MIHAILIDOU, 2012).

A expressão dos receptores de mineralocorticoides foi detectada no tecido cardíaco humano, assumindo-se que a aldosterona circulante na corrente sanguínea tenha ação sobre os mesmos. Não obstante, a CYP11B2, uma aldosterona sintase, foi detectada em cardiomiócitos atriais e ventriculares. Isto sugere que a aldosterona produzida localmente pode ter ação crucial nos mecanismos de hipertrofia e fibrose cardíaca (TSYBOULEVA et al., 2004; GOMEZ-SANCHEZ E GOMEZ-SANCHEZ, 2014; SZTECHMAN et al., 2018)

2.2 Ações genômicas da aldosterona no coração

No coração, as ações genômicas da aldosterona se dão principalmente quando a mesma se liga ao MR (Figura 6). A ligação da aldosterona ao MR promove a dissociação de chaperonas deste receptor. O então formado complexo hormônio-receptor migra como um dímero para o núcleo, onde se liga a sítios específicos do genoma que contém elementos responsivos aos mineralocorticoides, e inicia a transcrição de genes que codificam as SGK cinases, a família das proteínas Ras e a proteína CHIF, essenciais para atividade de canais de sódio e bomba de sódio e potássio (KRITIS, 2016). Além disto, foi demonstrado que a administração de

aldosterona reduz a expressão de ANP em corações de animais com hipertrofia cardíaca, exacerbando este processo patológico (AZIBANI, 2012).

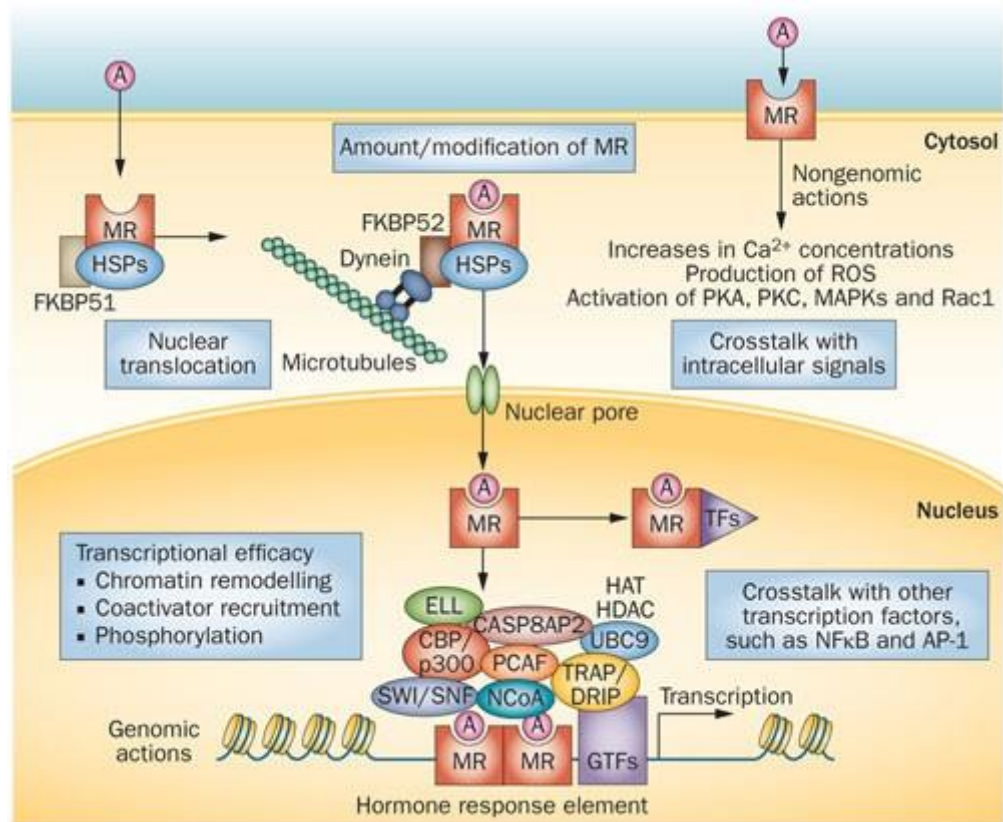


Figura 6. Ações genômicas vs ações não-genômicas da aldosterona. Os efeitos genômicos da aldosterona envolvem a translocação do receptor MR para o núcleo (esquerda na ilustração), que se liga aos elementos responsivos aos mineralocorticoides do DNA, promovendo a transcrição de genes. Já as ações não-genômicas (direita na ilustração) envolvem os efeitos rápidos deste esteroide, que promove alterações nas concentrações citoplasmáticas de cálcio, produção de ROS, ativação de diversas proteínas quinases. Fonte: Nagase e Fujita, 2013.

2.3 Ações não-genômicas da aldosterona no coração

As ações não-genômicas independem da transcrição e síntese de proteínas (Figura 6) e podem ser mediadas, ou não, pela ativação do MR, visto que algumas funções celulares da aldosterona podem ocorrer devido a sua ligação ao receptor acoplado à proteína G 30 (GPR-30) (KRITIS et al., 2016; MIHAILIDOU E ASHTON, 2014).

As ações não-genômicas da aldosterona envolvem a fosforilação de MAPKs, aumento da atividade do co-transportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+_{1/2}\text{Cl}^-$ e da bomba de Na^+K^+ , bem como o aumento na produção de segundos mensageiros de membrana, como IP_3 ,

DAG e PKC (CHUN E PRATT, 2004). Outro efeito importante não-genômico da aldosterona inclui o aumento da liberação de cálcio intracelular. O trabalho de Almeida et al. (2012) demonstrou que a aldosterona aumenta a amplitude do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos isolados de camundongos adultos, sendo este efeito parcialmente abolido pelos antagonistas do receptor MR e do receptor de glicocorticoide (GR). Além disto, os autores também demonstraram que a aldosterona induz um aumento da frequência de *sparks* de Ca^{2+} , sendo estes efeitos mediados pela PKA.

Os efeitos não-genômicos da aldosterona em miócitos cardíacos são mediados também pela ativação da NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase. Hayashi et al. (2008) demonstraram que o tratamento de cardiomiócitos com aldosterona promove um rápido aumento intracelular de ROS, em cerca de cinco minutos após a incubação, e que esta ação não ocorre por meio de uma via genômica, visto que o pré-tratamento com actinomicina D ou com cicloheximidina, inibidores de transcrição ou síntese protéica, não afetaram o efeito da aldosterona sobre a atividade da NADPH.

Em termos gerais, a produção de ROS devido à atividade da NADPH oxidase promove a oxidação das metioninas 281 e 282 no domínio regulatório da CaMKII (ERICKSON, 2008). O trabalho de He et al. (2011) demonstrou que altas doses de aldosterona promovem a oxidação e ativação da CaMKII em animais com infarto do miocárdio, levando à mortalidade devido ao aumento da expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9), com conseqüente ruptura do miocárdio. Neste mesmo estudo foi demonstrado que o aumento da expressão da metionina sulfóxido redutase A, que reduz a oxidação da CaMKII, ou a inibição da NADPH oxidase, bloqueiam estes efeitos cardiodeletérios da aldosterona.

A associação entre a atividade de NADPH oxidase, o remodelamento cardíaco patológico e os efeitos não-genômicos desencadeados pelo MR também foram observados em animais submetidos à sobrecarga pressórica cardíaca induzida pela TAC. Mohammed et al. (2010) demonstraram que ratos submetidos à administração de mineralocorticoide exógeno apresentam aceleração da hipertrofia cardíaca, fibrose e disfunção diastólica em resposta à TAC, associados ao estresse oxidativo e ativação de MR. Por outro lado, a exposição ao mineralocorticoide exógeno não promoveu aumento da transcrição de genes dependentes de MR, o que sugere que estes são efeitos patológicos não-genômicos, independentes de transcrição gênica.

2.4 A gp91^{phox} (NOX-2) e os efeitos cardíacos da aldosterona

Evidências na literatura indicam um importante papel das ROS derivadas da NADPH oxidase nas alterações cardiodeletérias promovidas pela aldosterona. Mais especificamente, o estresse oxidativo contribui para o remodelamento cardíaco provocado pela aldosterona. Reforçando essa ideia, foi observada uma regulação positiva da atividade de gp91^{phox} em animais transgênicos que superexpressam o MR (FAVRE et al, 2010; IGLARZ et al, 2004; BRIET et al, 2010).

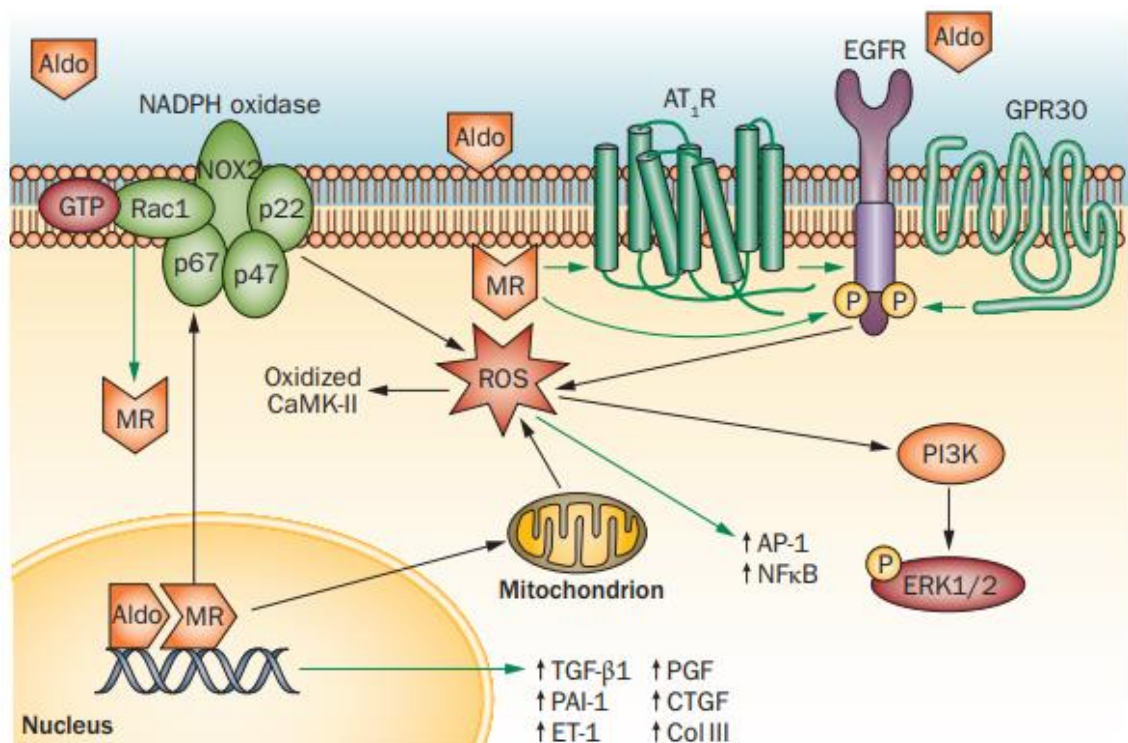


Figura 7. A aldosterona induz estresse oxidativo, inflamação e fibrose. A NADPH oxidase é um componente importante nos efeitos cardiovasculares da aldosterona, estando envolvida tanto nos seus efeitos genômicos quanto não-genômicos. A ligação da aldosterona com o receptor de mineralocorticoide (MR) promove aumento da formação de ROS pela mitocôndria. ROS formadas pela NADPH oxidase e pela atividade mitocondrial oxidam a CaMK-II. Além disso, ROS podem ativar a PI3K, que promove a fosforilação da ERK1/2. Setas verdes indicam ativação ou incremento da atividade. Setas pretas indicam uma sinalização *downstream*. Fonte: Brown, 2013.

A gp91^{phox} desempenha um papel central na fibrose cardíaca dependente de ativação do MR (Figura 7). O estudo realizado por Johar et al. (2006) demonstrou que após 4 semanas de administração de aldosterona, animais *wild type* e nocautes para gp91^{phox} (gp91^{phox} -/-) apresentaram níveis similares de elevação da pressão arterial

e da razão coração/peso corporal, no entanto, animais gp91^{phox}-/- não desenvolveram a fibrose observada nos animais WT. Além disto, os animais gp91^{phox} -/- apresentaram menores níveis de mRNA para colágeno tipo I (Col1) e fibronectina, e redução da atividade da NADPH oxidase cardíaca, quando comparados aos animais WT.

O envolvimento da gp91^{phox} nos efeitos cardiotoxicos da aldosterona também foi observado na disfunção coronariana em resposta à superexpressão cardiomiócito-específica do MR humano (hMR). Favre et al. (2010) demonstraram que animais transgênicos que superexpressam hMR desenvolveram disfunção endotelial coronariana com concomitante aumento de ROS no coração, aumento da atividade de NADPH oxidase e da expressão de gp91^{phox}, sugerindo um mecanismo parácrino no qual cardiomiócitos desencadeiam disfunção endotelial nas artérias coronárias provavelmente devido a produção de ROS mediada por gp91^{phox}. O aumento da expressão proteica da gp91^{phox} também foi observado no coração de ratos transgênicos (mRen2)27, que apresentam aumento dos níveis de AngII (STAS et al., 2007). Neste estudo, os animais (mRen2)27 submetidos ao tratamento com espinolactona, um antagonista do MR, apresentaram bloqueio da formação de ROS, ao mesmo tempo que foi abolido o aumento da expressão de gp91^{phox}. Esta mesma redução da expressão de gp91^{phox} no tecido cardíaco de roedores gerado por um antagonista do MR foi observada em ratos urêmicos submetidos ao tratamento crônico com espinolactona (MICHEA, 2008). Em conjunto, estes achados indicam que a ativação da gp91^{phox} e consequente produção de ROS ocorre em células cardíacas em resposta ao tratamento com aldosterona.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL

Sabe-se que a aldosterona exerce um papel importante no controle das funções fisiológicas cardiovasculares, mas também está envolvida na gênese e progressão das doenças relacionadas a este sistema. Nesta linha, fármacos que atuam antagonizando os receptor da aldosterona são capazes de melhorar a condição clínica de pacientes cardiopatas e seu prognóstico, o que é evidenciado pela redução da hospitalização e da morbi-mortalidade. Neste contexto, o estudo sobre as ações cardíacas da aldosterona e dos mecanismos envolvidos neste efeito têm recebido grande atenção.

Já é bem descrito que aldosterona ativa gp91^{phox}, levando a produção de ROS (CHRISOBOLIS et al., 2014), e que este aumento de ROS contribui para o processo de fibrose causada pela administração crônica de aldosterona (JOHAR et al., 2006). No entanto, os mecanismos envolvidos nestes efeitos são pouco elucidados. No primeiro capítulo 1 desta tese, nós buscamos avançar nessa área do conhecimento e investigamos ***se a sinalização redox via gp91^{phox} contribui para as ações da aldosterona no coração, agindo como mediadores downstream desta molécula no cardiomiócito e com isso participando da ativação de alvos celulares.*** Em outras palavras, nossa pergunta experimental é: se a produção de ROS via gp91^{phox} for inibida, quais alvos intracelulares da aldosterona não seriam ativados? (Figura 1). E como parte da estratégia experimental iremos focar em 3 vias de sinalização distintas, representadas por setas vermelhas na Figura 8, a saber: (1) na transcrição gênica de fatores pró-inflamatórios, pró-fibróticos e pró-hipertrofos; (2) na ativação das MAPKs; e (3) na manutenção do cálcio e alterações em proteínas envolvidas no manejo deste íon.

Como modelo de inibição da gp91^{phox} utilizamos animais nocautes para gp91^{phox}. Por meio dessa estratégia experimental pretendemos elucidar como a sinalização redox via gp91^{phox} contribui para os efeitos cardíacos da aldosterona.

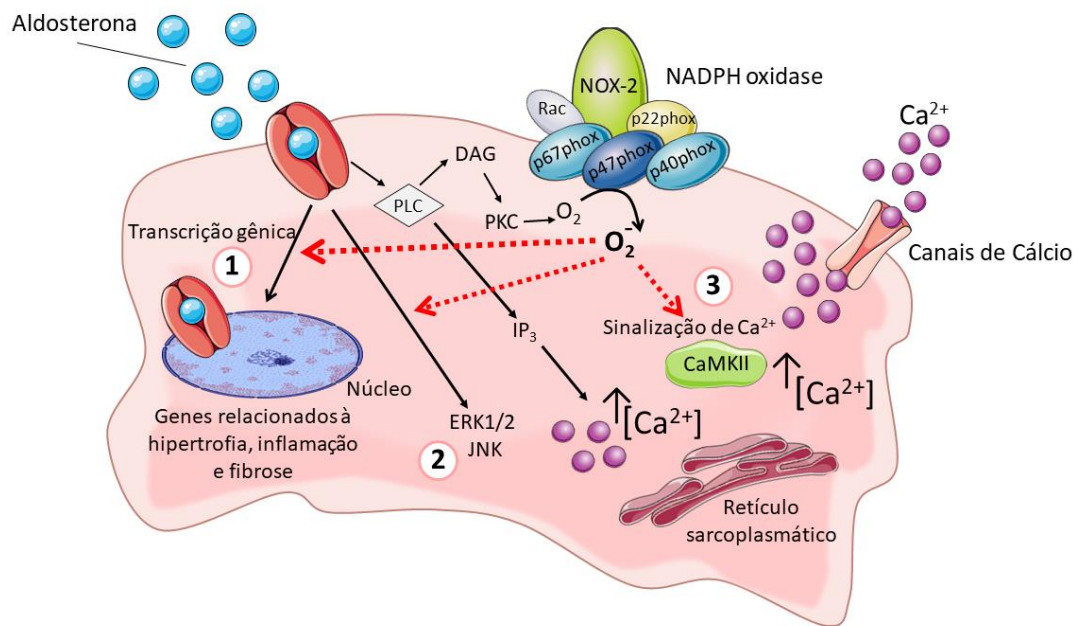


Figura 8. Hipótese central: a atividade da gp91^{phox} e consequente produção de espécies reativas de oxigênio é um componente *upstream*, regulador de vias de sinalização ativadas pela aldosterona no coração. Esta etapa aborda 3 vias principais ativadas pela aldosterona no cardiomiócito, ver setas vermelhas: (1) ativação da transcrição gênica de fatores pró-fibróticos, pró-inflamatórios e pró-hipertroáficos; (2) modulação da fosforilação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), que estão relacionadas à resposta hipertrofica; e (3) alterações na sinalização de cálcio, assim como a fosforilação das proteínas que são responsáveis pelo manejo deste íon nas funções contráteis dos cardiomiócitos. Legenda: PLC: fosfolipase C; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína cinase C; ERK1/2: cinase regulada por sinal extracelular; IP₃: 1,4,5-trifosfato de inositol. Setas pretas indicam ações já conhecidas da aldosterona em cardiomiócitos. Setas vermelhas tracejadas indicam a hipótese central deste trabalho.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento da gp91^{phox} nas alterações cardíacas agudas induzidas pela aldosterona.

4.2 Objetivos específicos

(a) Avaliar os efeitos cardíacos da administração *in vivo* da aldosterona (dose única) em camundongos C57BL/6J *wild type* e gp91^{phox}^{-/-} por meio da avaliação da:

- i. níveis de expressão dos receptores MR e GR;
- ii. produção de ROS;
- iii. carbonilação total de proteínas;
- iv. oxidação da calmodulina cinase II (CaMKII);
- v. expressão de RNA mensageiro para genes relacionados à hipertrofia (ANP), fibrose (CTGF) e inflamação (IL-1 β , TNF- α , SGK1, IL-10).

Objetivos ii e ii irão confirmar o aumento da produção de ROS em resposta ao protocolo experimental proposto e sua ausência no modelo nocaute para gp91^{phox}. Já os objetivos iii, iv e v irão avaliar a contribuição da sinalização redox via gp91^{phox} induzida pela aldosterona sobre a expressão de genes e alterações em proteínas envolvidas no manejo do cálcio.

(b) Analisar o efeito *in vitro* da aldosterona em cardiomiócitos isolados de animais C57BL/6J *wild type* e gp91^{phox}^{-/-}:

- i. no transiente de cálcio;
- ii. na produção de ROS;
- iii. translocação do NF-kB para o núcleo através de imunofluorescência em cardiomiócitos isolados;
- iv. fosforilação de ERK cardiomiócitos isolados tratados com aldosteronas em diferentes tempos de incubação.
- v. Avaliar a participação da PI3K γ na produção de ROS induzida pela aldosterona.

5. MÉTODO

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos selvagens da linhagem C57BL/6J e camundongos nocautes para gp91^{phox} (gp91^{phox-/-}) com idade entre 10 e 12 semanas. Os camundongos foram obtidos a partir do Biotério Central da UFMG e do Laboratório da Professora Leda Quércia Vieira e mantidos no Biotério de Experimentação de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica, sob condições controladas de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 h (12 horas de luz e 12 horas de escuro), bem como de temperatura (22° C). Tanto a ração Nuvilab quanto a água filtrada foram oferecidos *ad libitum*. Todos os protocolos deste trabalho foram conduzidos de acordo com as normas éticas de pesquisa com animais e foram aprovados pelo CEUA/UFMG (117/2020).

5.2 Coleta do tecido cardíaco

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, em seguida, foi realizada a abertura da caixa torácica com consequente perfusão do coração com 1 ml de KCl 10% com uso de seringa, a qual teve sua agulha posicionada no interior do ventrículo esquerdo. Após a coleta, os corações foram utilizados para experimentos de histologia/microscopia ou de biologia molecular.

5.3 Mensuração de ROS

As lâminas contendo os cortes congelados do tecido cardíaco foram pré-incubadas a 37°C por 15 minutos em solução de PBS e, em seguida, incubadas com 10 µmol/L de dihidroetídio (DHE, # 11347, Thermo Fisher Scientific), uma sonda fluorescente permeável, em uma câmara umidificada protegida por luz a 37°C durante 30 minutos. Ao final deste período, as lâminas foram lavadas e, então, montadas com glicerol 60%. A aquisição das imagens foi realizada em microscópio confocal LSM 880 (CAPI/ICB/UFMG) com tempo de exposição fixo para todos os grupos e analisada no software Zen Blue (Zeiss). A intensidade de fluorescência de DHE foi medida usando o software ImageJ 1.38x (NIH, EUA).

5.4 Ensaio de imunofluorescência

Para realização da imunofluorescência, as lâminas contendo os cortes congelados de 8 µm de espessura foram inicialmente retiradas do *freezer* e deixadas em temperatura ambiente durante 30 minutos, até secarem. Após isto, as mesmas foram fixadas com PFA 4%, durante 15 minutos. Em seguida, as mesmas foram lavadas com solução de BSA 1%, sucedendo-se o bloqueio com uma solução de BSA 3% diluído em PBS 1x com 0,3 % de Triton-X durante 30 minutos, em câmara úmida. Finalizado o bloqueio, o anticorpo primário foi incubado *overnight*. No dia seguinte, aproximadamente 20 horas após, as lâminas foram lavadas com BSA 1% e o anticorpo secundário foi incubado na preparação. As lâminas foram então incubadas com o DAPI para marcação dos núcleos. Após um período de 5 minutos, as lâminas foram lavadas mais uma vez com BSA 1%, montadas com glicerol 60% e seladas com lamínula e esmalte. As lâminas foram levadas para microscópio confocal LSM 880 (Zeiss) no Centro de Aquisição e processamento de imagens (CAPI) para captura das imagens. A quantificação da intensidade de fluorescência nas imagens capturadas foi realizada através do *software* Image J. Este parâmetro foi normalizado pela área selecionada durante a quantificação.

5.5 Avaliação da expressão proteica por *Western blot*

O tecido cardíaco foi coletado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido. Para homogeneização foi usado tampão de lise (em mmol/L: 100 NaCl, 50 Tris-base, 5 EDTA.2 H₂O, 50 Na₄P₂O₇, 10 H₂O e 1 MgCl₂, pH 8,0) contendo 0,3% de Triton X-100, foi usado, Nonidet P40 1%, desoxicolato de sódio 0,5% e NaF 20 mM, enriquecido com protease (No. P8340; Sigma-Aldrich) e coquetel de inibidores de fosfatase (No. P0044; SigmaAldrich). Após a homogeneização, as amostras foram deixadas em gelo por 5 minutos, seguido de centrifugação por 12 minutos a 6.000 g a 4 °C. 30 µg de proteínas foram separados por SDS PAGE seguido por *Western blotting*. A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Usando um gel de poliacrilamida de 10%, o conteúdo total de proteínas homogeneizado foi submetido à eletroforese e transferida para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore). Foi utilizado o

equipamento de transferência semi-dry (Bio-Rad), com voltagem fixa em 20V e tempo de transferência que variou a depender da massa molecular da proteína-alvo. Após isto, a membrana foi lavada com TBS-T (*Tris-Buffered Saline*; em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20; pH 8,0). Em seguida, utilizou-se leite em pó desnatado para bloqueio da membrana no intuito de evitar ligações inespecíficas do anticorpo primário, que foi incubado *overnight*, a 4°C. A imunodeteção foi realizada usando quimioluminescência aprimorada ECL plus - Amersham Biotechnology (GE Healthcare Bio Sciences, Pittsburgh, Estados Unidos da América) em um ImageQuant LAS 4000 Series (GE Healthcare Life Sciences). GAPDH (cat. No. Sc-32233, RRID: AB_627679, 1: 3.000; Santa Cruz Biotechnology) foi usado como um controle para quaisquer variações na carga de proteína.

5.6 Isolamento de cardiomiócitos adultos e análise da sinalização de cálcio

Cardiomiócitos ventriculares dos camundongos foram isolados de acordo com metodologia previamente descrita (Jesus *et. al.*, 2020). Resumidamente, o coração foi rapidamente removido e retro-perfundido via método de Langendorff com solução DB (*Digestion Buffer*) 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=7,4 ajustado com NaOH) contendo EGTA (0,15 mmol/L). Posteriormente, o coração foi perfundido com DB contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ de CaCl_2 e colagenase (tipo 2 – 1,1 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 meio suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*, #A4766801, Thermo Fischer Scientific).

Para análise do transiente de cálcio intracelular, foi incubada a sonda FLUO-4 AM (10 μM ; Invitrogen) por 30 minutos em solução contendo os cardiomiócitos, que foram subsequentemente lavados com solução de Tyrode. As células cardíacas foram estimuladas eletricamente a 1 Hz. As imagens foram capturadas com uso do microscópio confocal Zeiss LSM 880. Após captura, as imagens foram analisadas com uso do software Image J e Prisma 8.0. O conteúdo intracelular de cálcio foi

representado graficamente como F/F_0 , onde o F_0 representa a fluorescência da sonda ligada ao cálcio em repouso.

5.7 Avaliação da expressão de RNAm por qRT-PCR

O tecido cardíaco foi removido e refrigerado em nitrogênio líquido. A extração do RNA foi realizada com TRI Reagente (#T9424, Sigma-Aldrich), de acordo com as especificações do fabricante. Após esta etapa, foi realizada a separação das fases e precipitação do RNA, utilizando-se clorofórmio (#C2432, Sigma-Aldrich) e álcool isopropílico (#I9516, Sigma-Aldrich), respectivamente. O RNA foi, então, lavado com etanol 75%, sendo ressuspendido posteriormente em água DEPC (#750023, Invitrogen Life Technologies). O NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Scientific) foi utilizado para dosagem do RNA total. Após a quantificação, o RNA foi tratado com o Turbo DNA-free kit (#AM1907, Invitrogen Life Technologies). Para cada 15-20 μ L de RNA, foi adicionado 1,5-2,0 μ L de TurboDNase buffer. Em seguida foi acrescentado 1 μ L da *Turbo DNase*. Após 30 minutos de incubação, as amostras foram incubadas com 3 μ L do reagente de inativação da DNase. Após 2 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas durante dois minutos, a 12.000 rpm, resfriadas em 4°C. Após todo o processo, as amostras foram novamente dosadas para determinar a concentração de RNA. Foi utilizado DNaseI Amplification Grade (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Para RT-PCR, foi utilizado 1 ng de RNA e a enzima NMLV (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). O qPCR foi realizado em triplicata usando Applied Biosystems™ SYBR™ Green master mix e o S26 como controle endógeno no Viia 7 Real-Time PCR System. Todos os primers foram padronizados, sendo todas as curvas de dissociação analisadas previamente. Foram utilizados primers específicos para análise da expressão de RNA mensageiro (mRNA) dos seguintes genes: CTGF, ANP, NGAL1, SGK1, TNF- α , IL-6 e IL-10.

5.8 Análise estatística

Inicialmente, foi realizada a análise de normalidade e homoscedasticidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O teste *t de student* ou o ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, foram utilizados para análise das diferenças entre os grupos experimentais. Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos experimentais foram

consideradas quando o $p < 0,05$. Todos os testes e gráficos foram gerados no GraphPad Prisma e no PAST (Paleontological Statistics).

6. RESULTADOS (CAPÍTULO I)

Com o intuito de confirmar a deleção genética da $gp91^{phox}$ nos animais utilizados nesse estudo, foi realizada a genotipagem e também analisada a expressão da proteína $gp91^{phox}$ no coração dos camundongos. Conforme pode-se observar na Figura 9A, amostra de DNA proveniente de animal $gp91^{phox-/-}$ apresenta amplificação com *primers* específicos para $gp91^{phox}$ correspondente a 200 pares de bases, uma banda menor que a apresentada pelo grupo *wild type*, confirmando seu nocauteamento. Além disso, estes mesmos animais não apresentam expressão proteica da $gp91^{phox}$ no coração (Figura 9B).

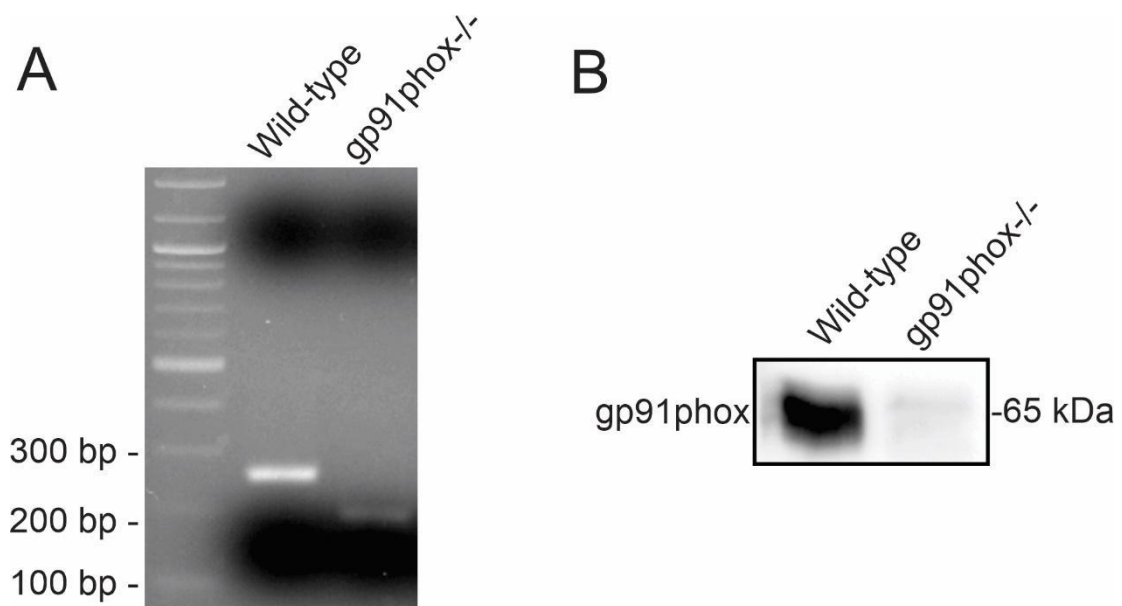


Figura 9. Validação do modelo de deleção genética da $gp91^{phox}$. (A) Genotipagem dos animais $gp91^{phox}$ nocautes através de detecção de DNA em gel de agarose 10%. (B) Expressão proteica da $gp91^{phox}$ no coração de animais selvagens e $gp91^{phox-/-}$. Legenda: bp: pares de bases.

No intuito de identificar se os animais $gp91^{phox-/-}$ poderiam apresentar variações na expressão dos receptores que estão frequentemente envolvidos nos efeitos da aldosterona, foi analisada a expressão proteica dos receptores de mineralocorticoide (MR) e de glicocorticoide (GR). Conforme podemos observar na Figura 10, não existem diferenças quanto à expressão destes receptores no coração dos animais $gp91^{phox}$, quando comparados aos animais selvagens.

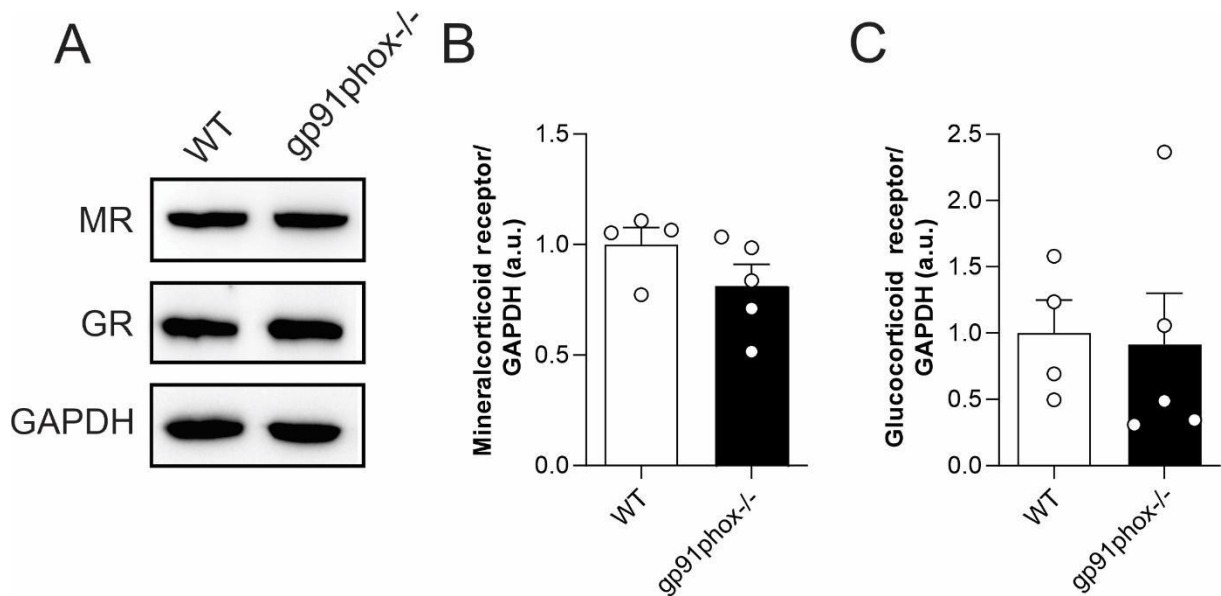


Figura 10. Expressão do receptor de mineralocorticoide (MR) e do receptor de glicocorticoide (GR) no coração de animais com deleção genética da $gp91^{phox}$. (A) Imagens representativas do *Western blot*, (B) Gráfico de barras mostra a similaridade nos níveis de expressão do MR entre animais selvagens e nocautes para o $gp91^{phox-/-}$. (C) Gráfico de barras mostra a similaridade nos níveis de expressão do GR entre animais selvagens e nocautes para o $gp91^{phox-/-}$. GAPDH foi utilizado como controle para normalização dos dados. WT= *wild type*. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). Círculos sobre as barras indicam número de homegenatos de tecido cardíaco analisados.

As ROS são componentes importantes nas vias de sinalização ativadas pela aldosterona em diferentes células e tecidos (LU et al., 2019; YAMAHARA et al., 2009; ZHANG et al., 2014). Considerando isto, o próximo passo foi analisar a participação da gp91^{phox} no aumento da atividade oxidante no tecido cardíaco induzido pela administração de aldosterona. Para isto, nós administramos uma única dose de 60µg/kg de aldosterona por via intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados 1 hora após administração da droga para coleta do tecido cardíaco. Conforme pode ser observado na Figura 11, os animais selvagens apresentam aumento da produção de ROS no tecido cardíaco em resposta à aldosterona. Por outro lado, os camundongos gp91^{phox}^{-/-} não apresentam aumento de ROS.

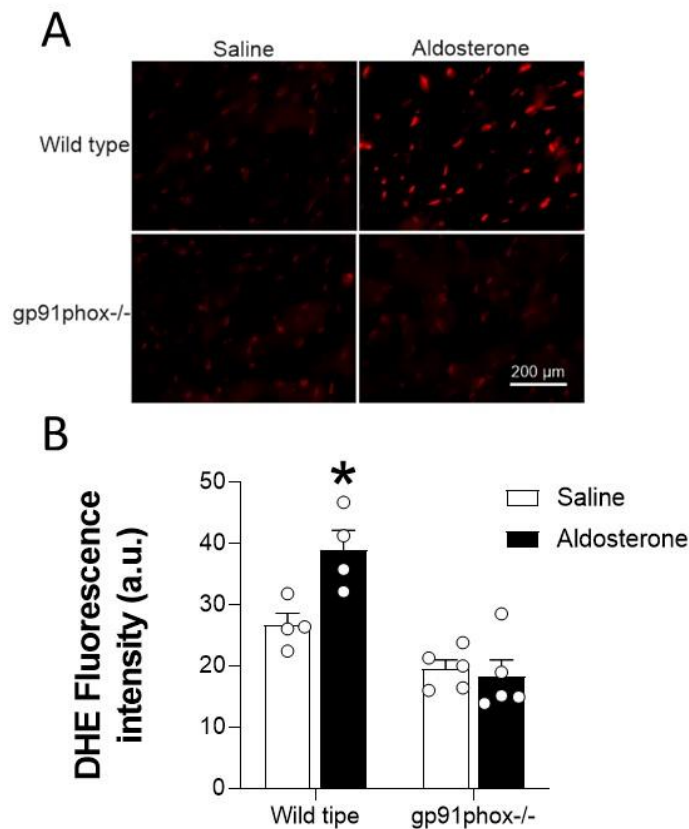


Figura 11. A produção de ROS induzida por aldosterona não ocorre no coração de animais com deleção genética da gp91^{phox}. (A) Imagens representativas de cortes cardíacos marcados com a sonda DHE de animais WT ou gp91^{phox}^{-/-} submetidos à administração de salina ou aldosterona. (B) Gráfico de barras mostra o aumento da produção de ROS induzido pela aldosterona no miocárdio de animais WT, o que não é observado no coração de animais nocautes para gp91^{phox}^{-/-}. Legenda: DHE; dihidroetídio. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média (SEM). *p<0,05 vs WT veiculo. Círculos sobre as barras indicam o número de amostras de tecido cardíaco analisados.

O aumento da produção de ROS está associado com diversos danos cardíacos, dentre eles a oxidação de proteínas, que ocorre devido à interação direta dos radicais livres com as cadeias laterais de aminoácidos (ICHIHARA et al., 2017). Portanto, o próximo passo foi analisar os níveis de carbonilação total de proteínas. Para isto, utilizamos o tecido cardíaco que foi devidamente coletado após a injeção intraperitoneal de aldosterona e submetido ao método Oxyblot. Como observado na Figura 12, os animais $gp91^{phox-/-}$ não apresentam aumento dos níveis de carbonilação de proteínas induzido pela aldosterona, ao contrário do que foi observado nos animais selvagens, o que corrobora os dados obtidos com o DHE.

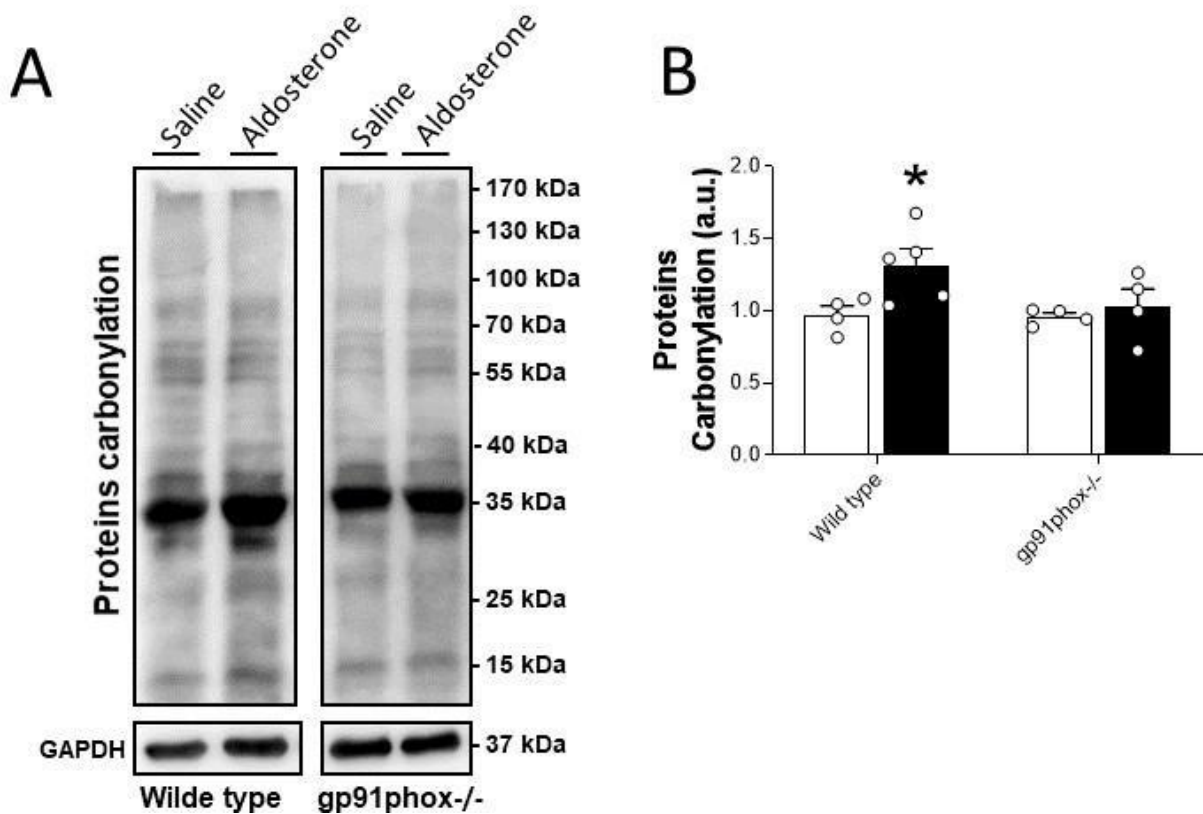


Figura 12. Animais com deleção genética da $gp91^{phox}$ são protegidos contra o aumento da oxidação de proteínas induzido pela aldosterona. (A) Imagens representativas do método oxyblot realizado no tecido cardíaco. (B) Gráfico de barras ilustra o aumento da oxidação de proteínas induzido pela aldosterona no miocárdio de animais WT e a ausência de efeito observado nos animais nocautes para $gp91^{phox}$. Legenda: GAPDH foi utilizado como controle para normalização dos dados. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs veículo. Círculos sobre as barras indicam o número de homegenatos de tecido cardíaco analisados.

A CaMKII é uma enzima essencial para a homeostase do cálcio no miócito cardíaco (WANG et al., 2018). Sua oxidação é um evento fundamental para as ações cardioprotetoras promovidas pela aldosterona (HE et al., 2011). Entretanto, até o momento não se sabia qual a participação das ROS produzidas pela gp91^{phox} neste processo. Sendo assim, nós analisamos a oxidação da CaMKII no coração de camundongos submetidos à injeção intraperitoneal de aldosterona. Nossos resultados mostram que existe um aumento da oxidação da CaMKII em resposta à administração de aldosterona, como esperado em animais selvagens. Por outro lado, nós demonstramos que este efeito da aldosterona depende de gp91^{phox}, visto que os camundongos gp91^{phox-/-} não apresentam este aumento. Também fica evidente na Figura 13, que o aumento da oxidação da CaMKII ocorre em toda a extensão do tecido cardíaco de animais selvagens.

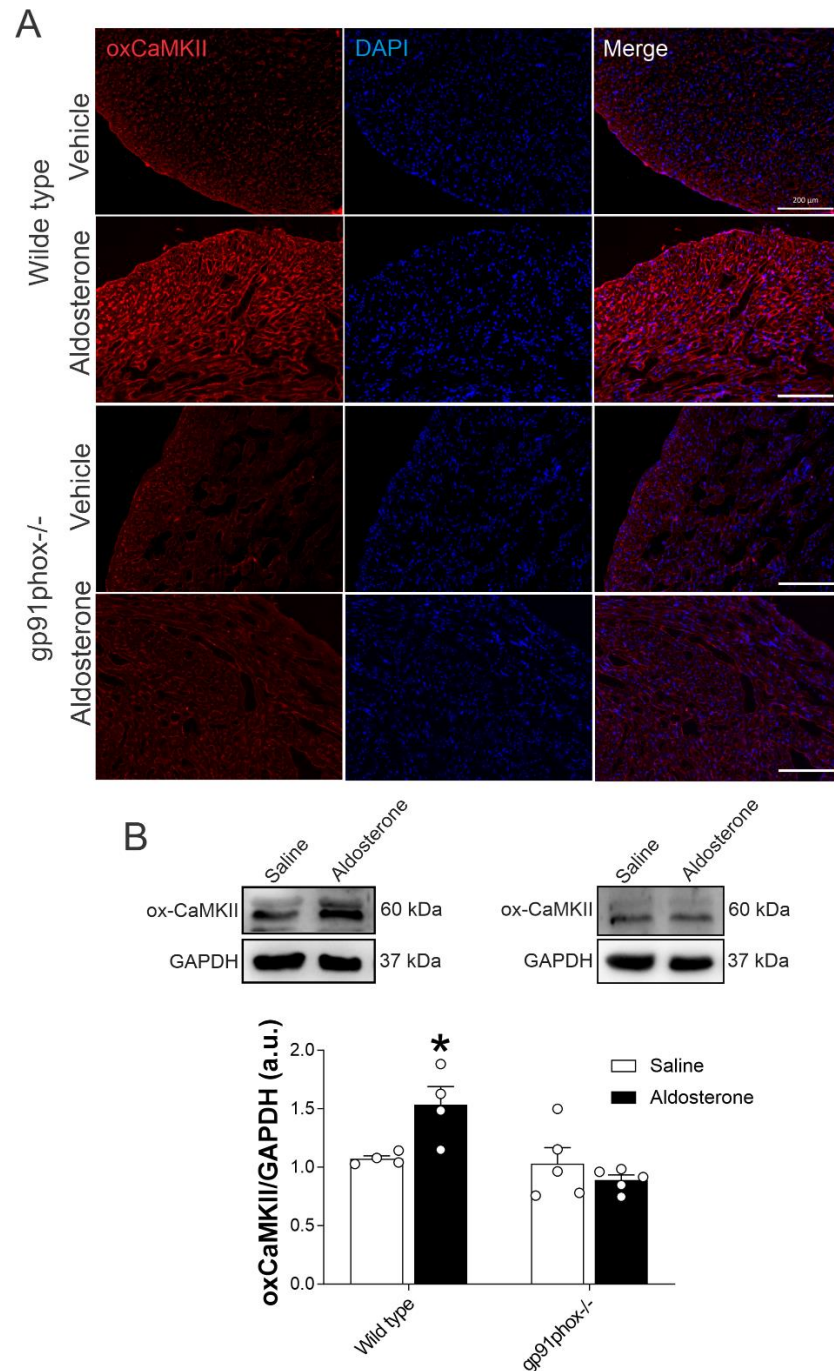


Figura 13. Animais com deleção genética da $gp91^{phox}$ não apresentam aumento da oxidação da CaMKII induzida pela aldosterona. (A) Imagens representativas da imunofluorescência realizada para ox-CaMKII. Marcação para ox-CaMKII em vermelho e núcleos marcados em azul com o DAPI. (B) Painel superior mostra *western blot* representativo. Painel inferior, gráfico de barras ilustra o aumento da oxidação da CaMKII induzido pela aldosterona no miocárdio de animais WT obtido por meio da técnica de *western blot*. Aldosterona não induz aumento da oxidação da CaMKII em corações de animais nocautes para $gp91^{phox}$. Legenda: ox-CaMKII: calmodulina cinase II oxidada. GAPDH foi utilizado como controle para normalização dos dados. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs WT veículo. Círculos sobre as barras indicam o número de amostras de tecido cardíaco analisados.

Alterações na homeostase do cálcio, incluindo o aumento exacerbado de sua saída espontânea do interior do retículo sarcoplasmático para o citosol, pode promover a atividade ectópica cardíaca (WHANG et al., 2018). O nosso grupo demonstrou que a aldosterona aumenta tanto o transiente quanto os *sparks* de cálcio em cardiomiócitos ventriculares adultos (DE ALMEIDA et al., 2012). Neste contexto, nós analisamos a participação da gp91^{phox} na mobilização do cálcio intracelular induzido pela aldosterona em cardiomiócitos adultos isolados. Conforme podemos observar na Figura 14, a aldosterona induz o aumento do transiente de cálcio nos miócitos cardíacos dos animais selvagens, mas não nos cardiomiócitos dos camundongos gp91^{phox}^{-/-}. Este resultado confirma a participação da gp91^{phox} neste efeito rápido sobre a mobilização de cálcio intracelular exercida pela aldosterona.

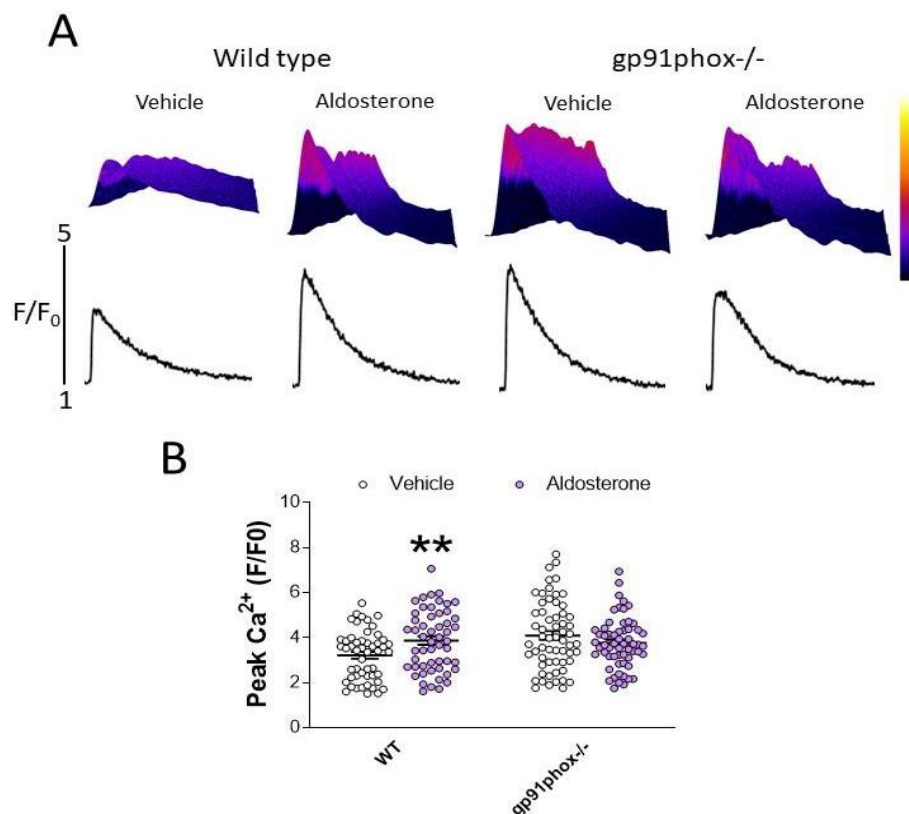


Figura 14. Cardiomiócitos de camundongos gp91^{phox}^{-/-} não apresentam aumento no transiente de Ca²⁺ induzido por aldosterona. (A) Painel superior, Imagens representativas tridimensionais do transiente de Ca²⁺ obtidos de cardiomiócitos ventriculares marcados com sonda FLUO-4 AM. Painel inferior, perfil do transiente de cálcio. (B) Gráfico de barras demonstra o aumento da fração F/F₀ induzida pela aldosterona em cardiomiócitos de animais WT, o que não é observado em cardiomiócitos provenientes de animais gp91^{phox}^{-/-}. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média (SEM). **p<0,05 vs WT veículo. Círculos sobre as barras indicam o número de células analisadas.

Um alvo importante da aldosterona na célula cardíaca é o fator de transcrição NF- κ B, que quando translocado para o núcleo ativa uma cascata de sinais na célula com ativação da expressão de vários genes inflamatórios e pró-fibróticos, dentre outros (TERADA et al., 2012; LEROY et al., 2009). Nosso próximo passo, foi, portanto, investigar se a aldosterona poderia promover a translocação nuclear deste fator de transcrição no coração dos camundongos $gp91^{phox-/-}$. A Figura 15 mostra que a incubação de cardiomiócitos com a aldosterona induz a translocação do NF- κ B (p65) para o núcleo. Entretanto, este efeito da aldosterona não é observado em cardiomiócitos isolados de camundongos $gp91^{phox-/-}$.

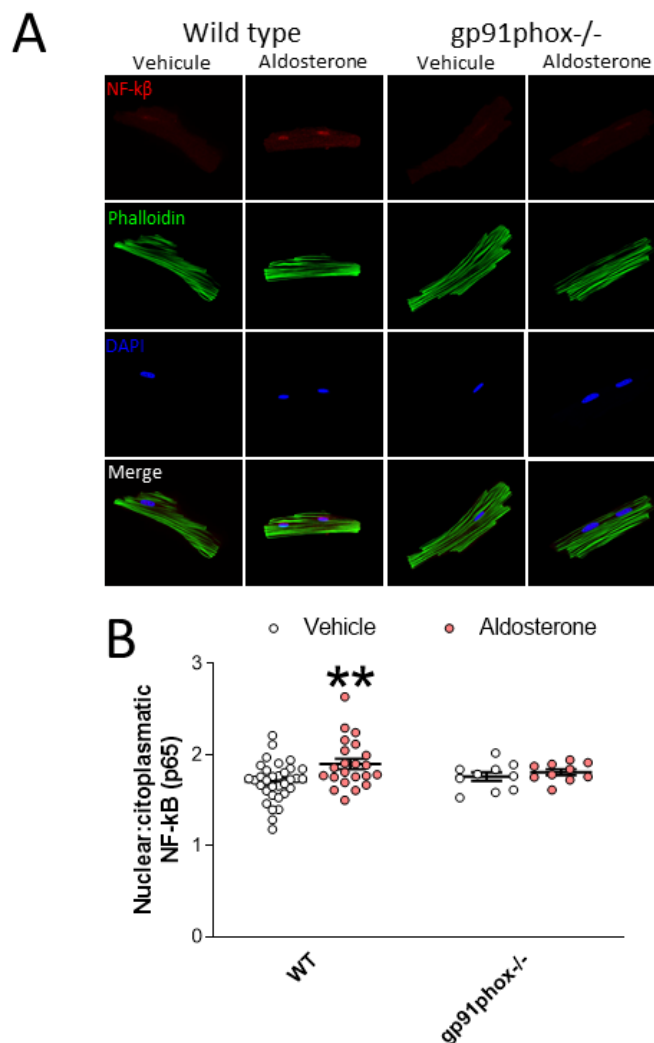


Figura 15. Translocação nuclear do NF- κ B em resposta à aldosterona depende da atividade da $gp91^{phox}$ em cardiomiócitos. (A) Imagens representativas da imunofluorescência para NF- κ B (p65) em cardiomiócitos de camundongos selvagens e $gp91^{phox-/-}$. **(B)** Gráfico de barras mostra a quantificação da razão núcleo:citoplasma para o sinal da imunofluorescência. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). ** $p < 0,05$ vs WT veículo. Círculos sobre as barras indicam o número de células analisadas.

Um dos efeitos rápidos clássicos da aldosterona é o aumento da expressão de RNA mensageiro para genes relacionados à fibrose e à hipertrofia. Sendo assim, nós avaliamos a expressão do RNA mensageiro para ANP, CTGF e NGAL1. Conforme podemos observar na Figura 16, não foram observadas alterações promovidas pela aldosterona na expressão destes genes no tecido cardíaco de camundongos selvagens em resposta ao nosso protocolo experimental. É importante ressaltar que aqui analisamos os efeitos agudos da aldosterona e, pelo menos em parte, isso poderia explicar o fato de não havermos observado o aumento da expressão do RNA mensageiro para estes alvos.

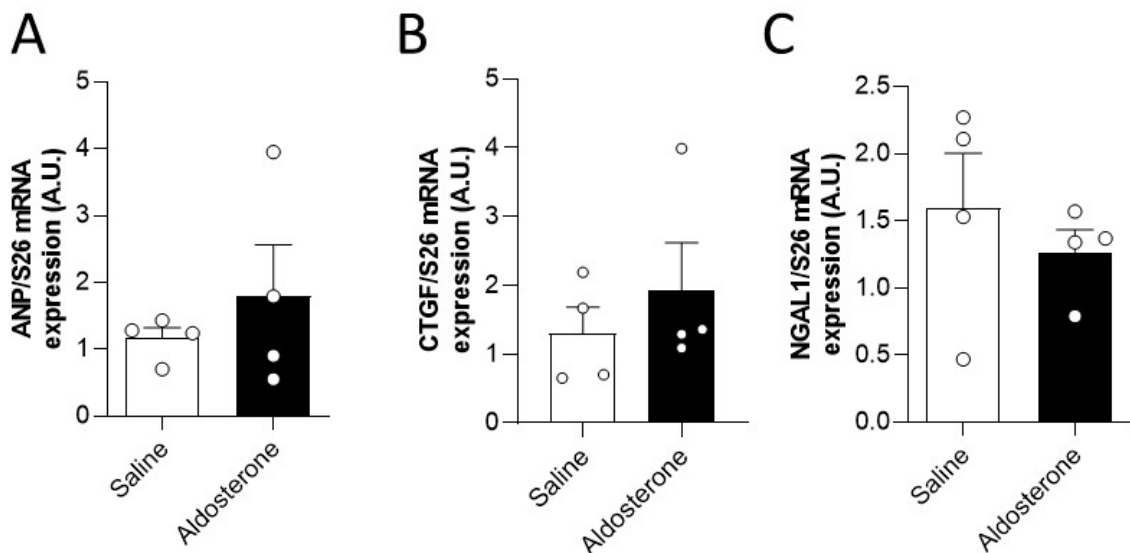


Figura 16. Expressão gênica de alvos relacionados ao remodelamento cardíaco no miocárdio de camundongos *wild type* tratados com aldosterona. Gráficos de barras mostram a expressão do mRNA para ANP (A), CTGF (B) e NGAL1 (C) em animais *wild type* submetidos à administração intraperitoneal de aldosterona. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). ** $p < 0,05$ vs WT veículo. Círculos sobre as barras indicam o número de homogenatos de tecido cardíaco analisados.

A translocação do NF- κ B para o núcleo do cardiomiócito é um importante evento, que conduz ao aumento da expressão de RNA mensageiro para genes relacionados à inflamação, incluindo os genes que codificam as quinases, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Nesta linha, nós analisamos a expressão do RNA mensageiro para SGK1, envolvido nos efeitos pró-inflamatórios cardíacos por ativação do inflamassoma. Foi observado que a aldosterona induz o aumento do RNA mensageiro para este marcador apenas nos animais selvagens (Figura 17). O envolvimento da gp91^{phox} na expressão de marcadores inflamatórios foi observado também para a IL-6, TNF- α e IL-10, visto que os animais nocautes para gp91^{phox} não apresentaram o aumento dos níveis de RNA mensageiro para estes alvos, um resultado distinto do observado nos animais selvagens (Figura 17).

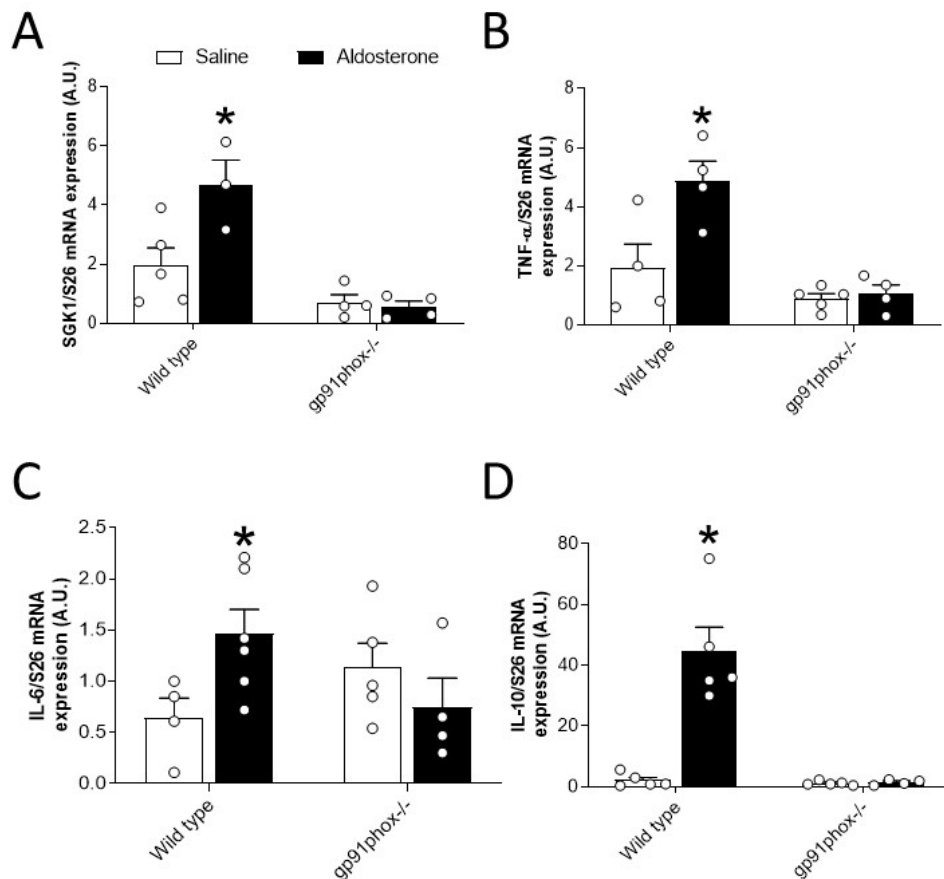


Figura 17. Indução de marcadores inflamatórios pela aldosterona está inibida no coração de camundongos gp91^{phox}^{-/-}. Gráficos de barras mostram a expressão do mRNA para SGK1 (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) em animais WT e gp91^{phox}^{-/-} submetidos à administração intraperitoneal de aldosterona. Em animais selvagens aldosterona induziu a expressão do mRNA para todos os alvos analisados no coração. Deleção da gp91^{phox} inibiu essa resposta. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). **p<0,05 vs WT veículo. Círculos sobre as barras indicam o número de homegenatos de tecido cardíaco analisados.

Diversos estímulos cardíacos estressores ativam a ERK1/2, dentre eles a aldosterona. Foi demonstrado que um dos efeitos iniciais da aldosterona sobre o coração é o aumento dos níveis de fosforilação desta MAPK, e que seu efeito cardíaco hipertrófico é abolido diante da ação de um inibidor farmacológico de sua ativação (OKOSSSI et al., 2004). Além disso, evidências na literatura indicam que as ROS derivadas da NADPH estão envolvidas na ativação de ERK1/2 induzida pela aldosterona (QUEISSER et al., 2017). Sendo assim, nós analisamos os efeitos do tratamento com aldosterona na fosforilação da ERK1/2 em cardiomiócitos ventriculares isolados. Como podemos observar na Figura 18, o aumento da fosforilação de ERK1/2, observado 10 minutos após a incubação das células com aldosterona, é abolido nos cardiomiócitos obtidos de animais $gp91^{phox^{-/-}}$. Para identificar se esta via estava preservada nos animais nocautes e que poderia ser de fato ativada pelas ROS, nós incubamos cardiomiócitos com o H_2O_2 e investigamos a fosforilação da ERK nessas condições. Figura 18C mostra o aumento da fosforilação da ERK1/2 em amostras expostas a H_2O_2 por 10 min.

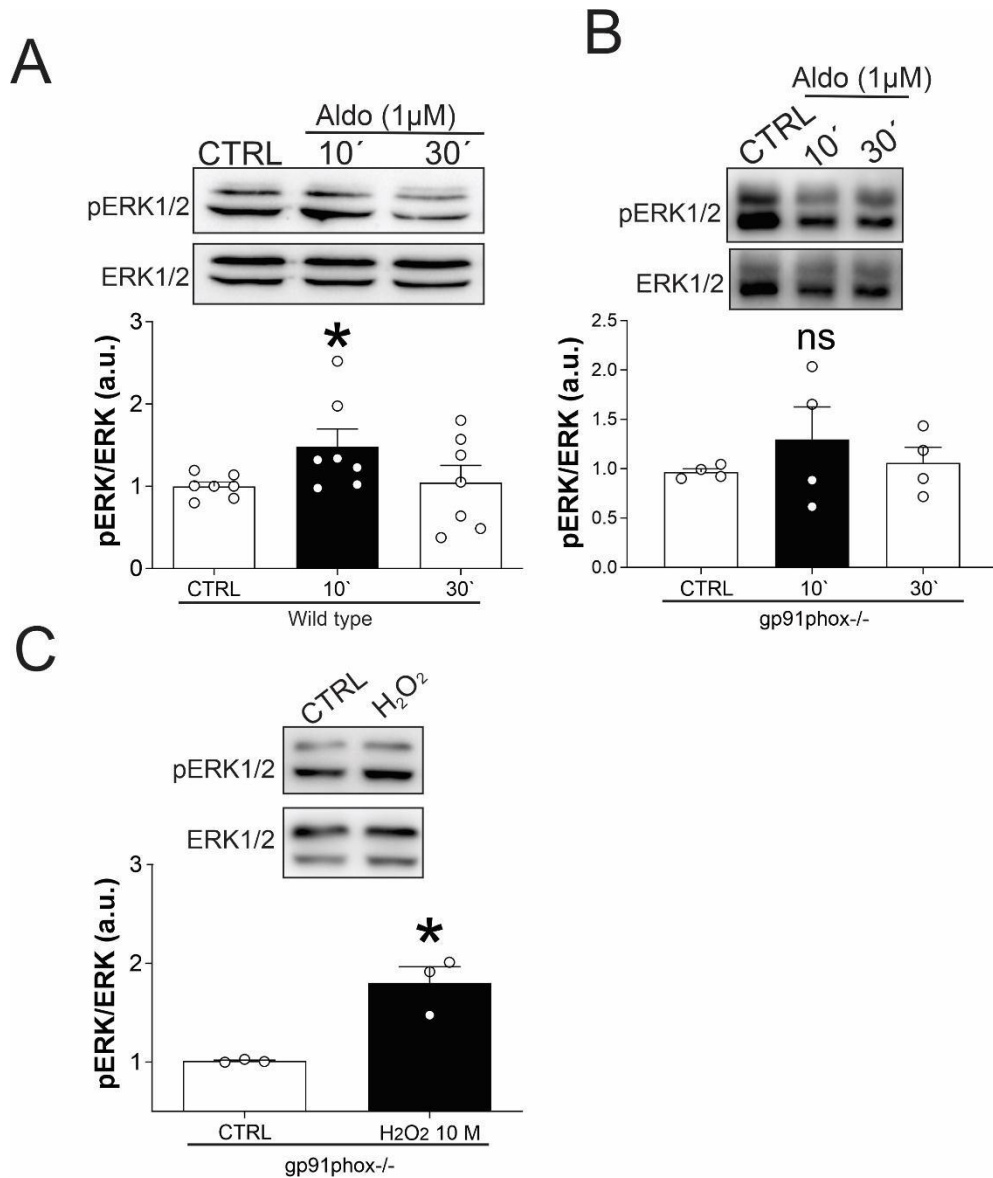


Figura 18. O aumento da fosforilação de ERK1/2 induzida pela aldosterona depende das ROS derivadas da gp91^{phox}. (A) Imagens representativas do *Western blot* e gráfico de barras mostram o aumento da fosforilação da ERK1/2 após 10 min de tratamento dos cardiomiócitos isolados com aldosterona. (B) Imagens representativas e gráfico de barras mostram que este efeito foi abolido nos animais gp91^{phox}^{-/-}. (C) A fosforilação da ERK1/2 ocorre diante da exposição das células ao H₂O₂. ERK total foi utilizada como controle para normalização dos dados. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs WT. Círculos sobre as barras indicam o número de homegenatos de tecido cardíaco analisados.

Os resultados apresentados acima indicam fortemente a participação da gp91^{phox-/-} nos efeitos *in vivo* e *in vitro* da aldosterona. Já foi demonstrando também na literatura que a ativação da gp91^{phox} depende da fosforilação da subunidade regulatória p47^{phox}, que pode ser ativada pela enzima PI3K γ . Nesta linha, nós hipotetizamos que a PI3K γ poderia ser um mediador *upstream* aos eventos intracelulares induzidos pela aldosterona. Inicialmente, avaliamos se o AS605240, inibidor seletivo da PI3K γ , seria capaz de inibir o aumento de ROS. Para tal, cardiomiócitos foram incubados com a sonda DHE. Ao tratar com aldosterona cardiomiócitos adultos isolados previamente incubados com o AS605240, observamos que o efeito pró-oxidante da aldosterona foi abolido, demonstrando assim, que a PI3K γ é um mediador *downstream* dos efeitos da aldosterona no cardiomiócito atuando na ativação da gp91^{phox} (Figura 19).

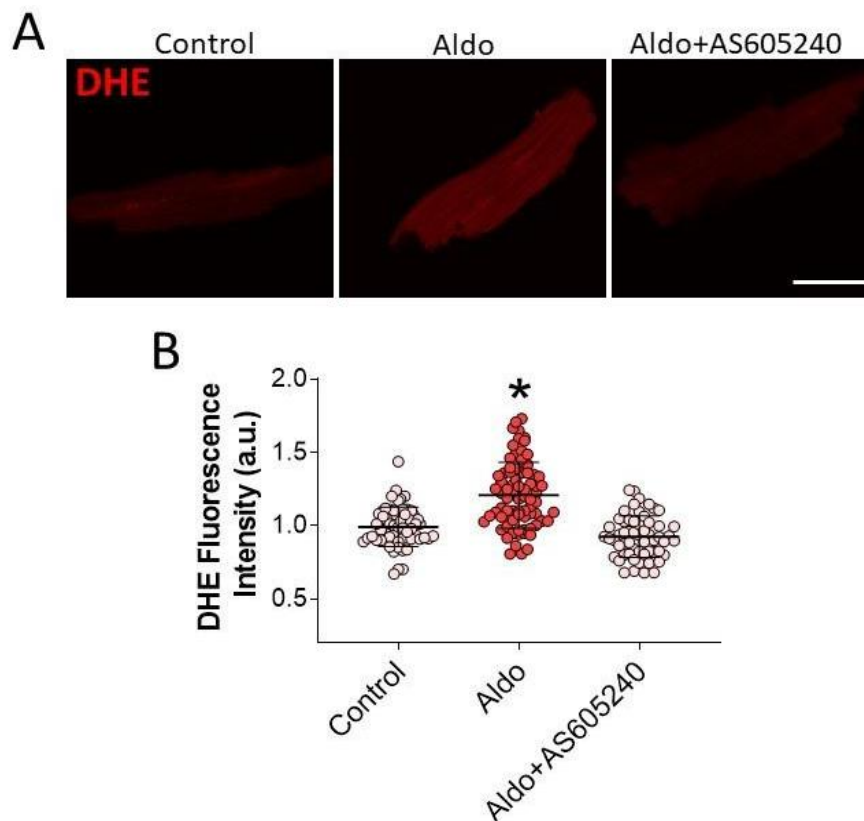


Figura 19. A PI3K γ participa do efeito da aldosterona sobre a produção de ROS em cardiomiócitos de camundongos. (A) Imagens representativas da sonda DHE em cardiomiócitos provenientes de animais selvagens submetidos à incubação com aldosterona e/ou AS605240 (inibidor seletivo da PI3K γ). (B) Gráfico de barras mostra o aumento da produção de ROS induzido pela aldosterona no miocárdio de animais WT, o que não é observado nos cardiomiócitos pré-incubados com AS605240. Legenda: DHE; dihidroetídio. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs demais grupos. Círculos sobre as barras indicam o número de células analisados.

7. DISCUSSÃO (CAPÍTULO 1)

Na parte I desta tese, nós mostramos que os efeitos oxidantes da aldosterona não foram induzidos no tecido cardíaco dos animais $gp91^{phox-/-}$, o mesmo aplica-se com relação ao aumento no transiente de cálcio e a expressão das citocinas inflamatórias. Estas respostas, no entanto, são observadas nos animais selvagens. Além disso, mostramos também que a aldosterona perde seu efeito oxidativo em cardiomiócitos isolados, quando os mesmos são submetidos à incubação prévia do inibidor farmacológico da PI3Kγ, sugerindo que esta enzima pode estar envolvida, como um componente *upstream*, na ativação de $gp91^{phox}$ induzida pela aldosterona.

É bem descrito na literatura o efeito da aldosterona sobre a resposta oxidante cardíaca, que envolve a atividade de NADPH oxidase. Hayashi et al. (2008) demonstraram que a incubação de aldosterona em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatais promove aumento da produção intracelular de ROS de maneira dose-dependente, e que a ativação da NADPH oxidase nessas células ocorre em 5 minutos após a incubação da aldosterona. Além disso, os autores demonstraram também que a incubação prévia com apocinina reverteu esse efeito oxidativo da aldosterona nessas células. O efeito oxidativo da aldosterona também pode ser observado à nível tecidual. He et al. (2011) demonstraram que 15 minutos após a administração de aldosterona por via intraperitoneal em camundongos selvagens, observa-se um aumento na produção de ROS no tecido cardíaco destes animais. Por outro lado, estes autores submeteram animais $Ncf1^{-/-}$, nocautes para $p47^{phox}$, ao mesmo tratamento com aldosterona, contudo não observaram o mesmo efeito oxidante. Este resultado é importante por que é uma evidência importante do envolvimento da $gp91^{phox}$ nos efeitos oxidantes cardíacos da aldosterona, visto que $p47^{phox}$ é a principal subunidade citoplasmática regulatória de sua atividade (EL-BENNA et al., 2009). Estes resultados corroboram e reforçam nossos achados uma vez, que em nosso trabalho, os animais $gp91^{phox-/-}$ não apresentaram aumento de produção de ROS no tecido cardíaco em resposta à administração de aldosterona.

O aumento da produção de ROS reflete em alterações secundárias, visto que as ROS podem funcionar como sinalizadoras de efeitos patológicos para o músculo cardíaco. Isto se dá porque as ROS podem oxidar moléculas, incluindo as proteínas, alterando suas estruturas e atividades (HAFSTAD, NABBEBACCUS E SHAH, 2013). Deste pressuposto partiu nosso intuito de analisar a carbonilação total de proteínas e,

até onde sabemos, este é o primeiro trabalho na literatura que demonstra que a aldosterona aumenta a carbonilação total de proteínas no músculo cardíaco. Em adição, mostramos também de forma pioneira que a aldosterona não foi capaz de induzir a carbonilação total de proteínas no músculo cardíaco de animais $gp91^{phox/-}$. Isto abre caminho para uma série de investigações sobre proteínas que podem ser alteradas por carbonilação em resposta à aldosterona.

O efeito oxidativo da aldosterona é um passo essencial para o remodelamento cardíaco patológico induzido por este hormônio. Por exemplo, foi mostrado que as ROS derivadas da atividade de NADPH oxidase promovem oxidação da CaMKII, que induz a transcrição do MEF2, fator que, por sua vez, aumenta a expressão de MMP-9. Em animais infartados, este mecanismo é responsável pelo remodelamento e ruptura do músculo cardíaco, e a morte dos animais induzida pela aldosterona (HE et al., 2011). Isto mostra a importância da oxidação da CaMKII para os efeitos cardíacos patológicos da aldosterona. Nosso trabalho avançou neste campo, visto que temos demonstrado que a oxidação da CaMKII induzida pela aldosterona depende da $gp91^{phox}$. Esta é a primeira evidência direta da participação da $gp91^{phox}$ no efeito da aldosterona sobre a oxidação da CaMKII.

A CaMKII tem uma importância fisiológica para o cardiomiócito, mas sua ativação excessiva está relacionada à ocorrência das doenças cardíacas (HEYGI et al., 2019; BECKENDORF et al., 2018; SINGH E ANDERSON, 2011). Um dos efeitos deletérios da ativação excessiva da CaMKII é o aumento, também das concentrações citoplasmáticas de cálcio (WANG et al., 2018). Considerando isto, e também dados de um estudo prévio publicado pelo nosso grupo que mostrou que a aldosterona aumenta o transiente de cálcio em cardiomiócitos ventriculares de ratos (DE ALMEIDA et al., 2012), nós analisamos o efeito da aldosterona na amplitude do transiente de cálcio citosólico em cardiomiócitos ventriculares isolados. Nossos resultados mostraram que o aumento do transiente de cálcio induzido pela aldosterona nos cardiomiócitos dos animais selvagens, não é observado nos cardiomiócitos provenientes dos animais $gp91^{phox/-}$, o que está alinhado ao dado da CaMKII discutido acima.

É importante frisar que este capítulo não tem o intuito de explicar como diferentes componentes intracelulares alterados pela aldosterona conversam entre si, em uma via de sinalização única. Não obstante, foi mostrado recentemente que, em células do músculo liso vascular (VSMC), a aldosterona aumenta os níveis

intracelulares de cálcio, e isto está associado a um aumento da atividade de NF-KB (HAO et al., 2020). Em nosso estudo, mostramos que a aldosterona promove o tráfego do NF-KB para o núcleo em cardiomiócitos ventriculares de camundongos selvagens, o que provavelmente tem relação com o aumento da transcrição do mRNA para genes relacionados à inflamação (SGK1, TNF- α , IL-6 e IL-10) induzido pela administração *in vivo* de aldosterona. Mais uma vez, e corroborando aos resultados anteriores, não observamos estes efeitos inflamatórios da aldosterona nas células e no tecido cardíaco dos animais gp91^{phox}, o que mostra que a gp91^{phox} está envolvida no efeito inflamatório da aldosterona, efeito este que parece depender do estresse oxidativo induzido por este hormônio.

Dados clínicos da literatura mostram que pacientes com hiperaldosteronismo primário apresentam aumento da ativação da via PI3K/AKT/mTOR em células de adenomas (SU et al., 2013). Além disso, o estudo de Tsybouleva et al. (2004) mostrou que a aldosterona promove aumento da expressão de PI3K-p110 δ em cultura de fibroblastos cardíacos, e que a inibição desta enzima bloqueou o efeito fibrótico e hipertrófico da aldosterona. Considerando estas evidências, nós analisamos a participação da PI3K γ no efeito pró-oxidativo da aldosterona. Nosso resultado mostra que a PI3K γ participa do efeito da aldosterona sobre a produção de ROS em cardiomiócitos ventriculares. Embora seja apenas um dado isolado, isto abre perspectivas para novos estudos que visem entender a relação entre atividade de PI3K γ e a consequente ativação da gp91^{phox}. No próximo capítulo desta tese, iremos desenvolver melhor esta ideia, utilizando outro modelo experimental, mas que assim como este, tem o estresse oxidativo como mediador chave de suas alterações moleculares, celulares e teciduais.

CAPÍTULO II

***Sinalização adrenérgica recruta fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K γ)/
gp91^{phox} para induzir remodelamento cardíaco.***

8. REVISÃO DE LITERATURA

8.1 Sinalização β -adrenérgica no coração

O sistema nervoso simpático (SNS) exerce uma gama de efeitos cardiovasculares. Suas ações cardíacas envolvem o aumento da frequência (cronotropismo positivo) e da contratilidade (inotropismo positivo) e a aceleração do relaxamento cardíaco (lusotropia positiva). Estas ações do SNS sobre o coração são fundamentais para promover o aumento da performance cardíaca diante de estímulos ambientais estressores, preparando o organismo para reagir em situações de luta ou fuga (LYMPEROPOULOS, 2013).

As ações do SNS sobre o coração se dão pela liberação de catecolaminas: (1) a noradrenalina, que é liberada pelos terminais de nervos simpáticos cardíacos localizados nos nós sinoatrial e atrioventricular, promovendo aumento da frequência cardíaca e condução atrioventricular; e também no ventrículo esquerdo, provocando aumento da força de contração; (2) a adrenalina, liberada na circulação sistêmica pela glândula adrenal, que ao chegar ao coração modula suas atividades; (3) produção e liberação local de noradrenalina e adrenalina por sistemas simpáticos teciduais, responsáveis pela sinalização autócrina e parácrina sobre as próprias células cardíacas (TRIPOSKIADIS et al., 2009; LYMPEROPOULOS, 2013; ZHANG E ANDERSON, 2014).

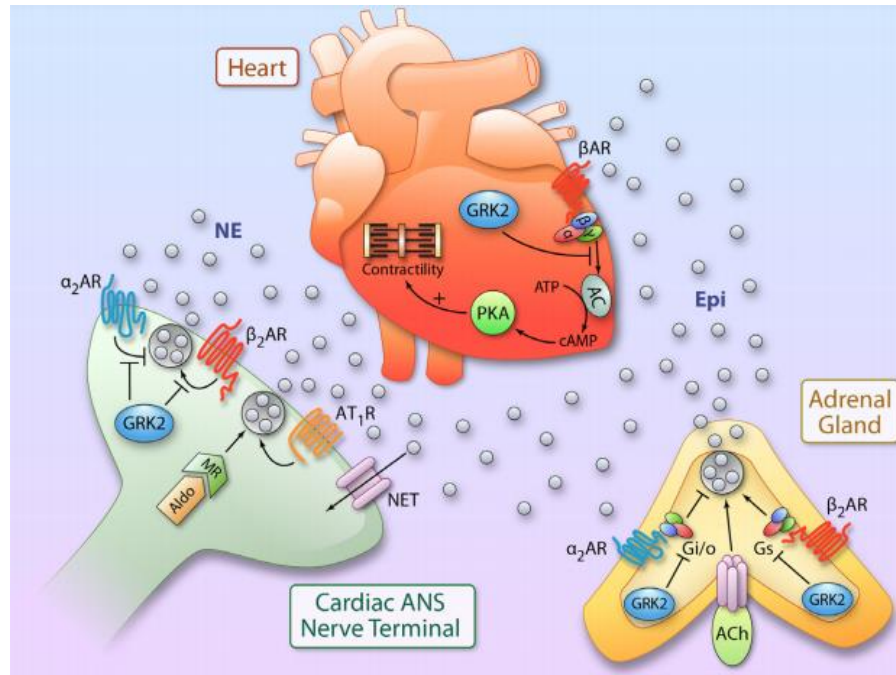


Figura 20. Sistema nervoso adrenérgico e o coração: ativação e regulação. O aumento da atividade do sistema nervoso autônomo sobre o sistema cardiovascular promove a liberação de duas catecolaminas que exercem seus efeitos. A noradrenalina (NE), liberada pelos terminais nervosos cardíacos e a adrenalina (Epi) liberada pelas glândulas adrenais na corrente sanguínea, que modula a atividade cardíaca e também os vasos periféricos. Ao se ligar aos seus receptores no tecido cardíaco, as catecolaminas se ligam aos receptores adrenérgicos, promovendo o aumento da atividade da adenilil ciclase com consequente formação do AMP cíclico (cAMP), que ativa a PKA e aumenta a contratilidade cardíaca. ACh, acetilcolina; Aldo, aldosterona; AR, receptor adrenérgico; Gi/o, proteína G inibitória; Gs, proteína G estimulatória; MR, receptor de mineralocorticoide; NE, noradrenalina; Epi, adrenalina; NET, transportador de noradrenalina. Fonte: Lympopoulos et al, 2013.

Estas catecolaminas promovem seus efeitos através dos receptores adrenérgicos, que podem ser do tipo α ou β . Neste trabalho daremos ênfase a sinalização cardíaca mediada por receptores adrenérgicos do tipo β por se tratarem do nosso objeto de estudo. Os receptores β adrenérgicos são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) e são primariamente divididos em três subtipos: β_1 , β_2 e β_3 , permanecendo os receptores β_4 ainda controversos. No coração humano, existe uma proporção de 4 receptores β_1 para cada receptor β_2 , com uma expressão baixa de receptores β_3 (de Lucia, 2018). Da mesma forma, o coração de murinos também apresenta uma predominância de receptores β_1 frente a β_2 e β_3 .

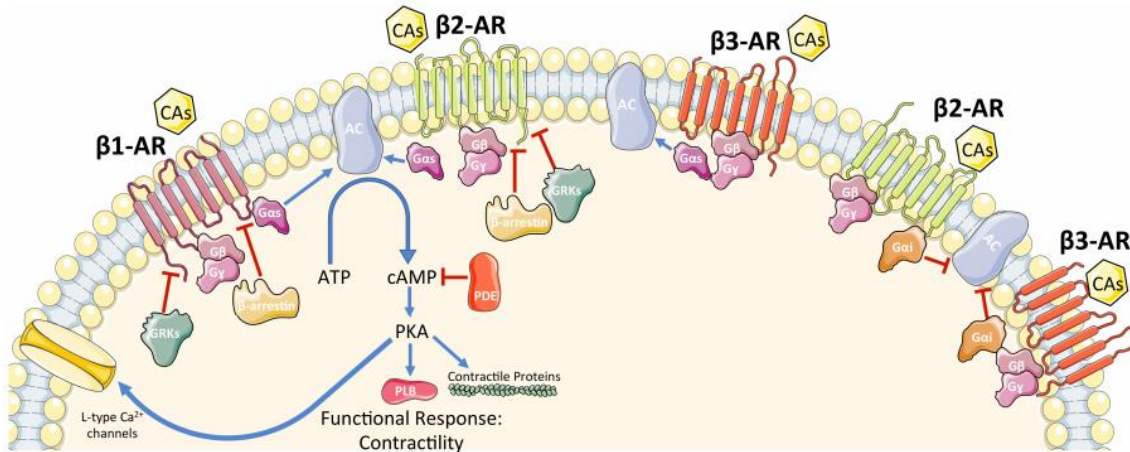


Figura 21. Representação esquemática da sinalização β -AR em cardiomiócitos.

CAs, catecolaminas; β -AR, receptor β -adrenérgico; Subunidades da proteína G: $G\alpha$ (G_{as} ou G_{ai}), $G\beta$, $G\gamma$; GRK2, quinase 2 do receptor acoplado à proteína G; AC, adenilil ciclase; ATP, trifosfato de adenosina; cAMP, monofosfato de adenosina cíclico; PDE, fosfodiesterase; PKA, proteína quinase A. Uma seta azul é usada quando um mecanismo estimulatório está envolvido, enquanto uma linha com ponta de barra vermelha é usada para um mecanismo inibitório. Fonte: de Lucia et al., 2018.

O receptor β 1 adrenérgico é acoplado a uma proteína G estimulatória (G_s), que é formada por 3 subunidades (α , β e γ). Frente a ligação de agonistas adrenérgicos aos receptores β , ocorre a dissociação deste complexo, seguido pela ativação da adenilil ciclase, que catalisa a conversão de ATP em AMP cíclico. Este segundo mensageiro intracelular promove a ativação da proteína quinase A (PKA), que por sua vez fosforila uma série de alvos na célula cardíaca, dentre estes os canais de cálcio do tipo L, miofilamentos proteicos, fosfolambam (PLN), e bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA). É importante ressaltar que a ativação dos receptores adrenérgicos excede seus efeitos sobre a regulação da atividade contrátil cardíaca. Outras funções celulares são também reguladas por estes receptores, como a transcrição gênica e a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que podem sinalizar para crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular. Muito embora a sinalização derivada da ativação dos receptores β 2 não seja idêntica àquela dos receptores β 1, agonistas adrenérgicos também promovem aumento da formação de AMPc e ativação da PKA via os receptores β 2 (FERRARA, 2014).

8.2 O estímulo adrenérgico excessivo promove remodelamento cardíaco patológico

Embora o aumento da atividade simpática seja essencial para a resposta cardíaca às condições de estresse agudo e reações de luta-ou-fuga, estímulos adrenérgicos excessivos podem gerar lesões cardíaca de diferentes características patológicas e com manifestações clínicas variadas. Em humanos, a hiperatividade simpática é uma característica clássica da insuficiência cardíaca; dessa forma, o bloqueio β -adrenérgico é base fundamental da terapia farmacológica dessa doença (GARLIE et al., 2011).

O isoproterenol, também conhecido como isoprenalina, é largamente utilizado para induzir lesão cardíaca em modelos experimentais. Este é um agonista β -adrenérgico não seletivo que, agindo sobre os receptores β_1 cardíacos após altas doses de sua administração, pode promover aumento excessivo do transiente de cálcio citoplasmático, estresse oxidativo, hipotensão coronariana e depleção dos níveis de energia (ABDELZAHER et al, 2021). É importante frisar que o estímulo adrenérgico em modelos experimentais pode gerar remodelamento cardíaco mesmo que o agonista seja administrado em dose única. Xiao et al. (2018) demonstraram que uma única injeção de isoproterenol (5 mg/kg) por via subcutânea, promove ativação de inflamassoma, infiltração de macrófagos e remodelamento cardíaco patológico caracterizado por fibrose em camundongos C57BL/6J. O remodelamento cardíaco após uma única dose de isoproterenol também é observado em ratos submetidos a uma dose de 5mg/kg por via subcutânea deste agonista adrenérgico (ELLISON et al., 2007). Estes autores mostraram que ratos submetidos a esta sobrecarga adrenérgica apresentaram arritmia cardíaca, hipertrofia de cardiomiócitos, necrose e dano celular associado à fosforilação excessiva dos receptores de rianodina.

Um outro modelo clássico de induzir remodelamento cardíaco é o estímulo adrenérgico sustentado através da administração contínua de isoproterenol por bombas osmóticas. Frequentemente, este modelo é utilizado para induzir insuficiência cardíaca em animais experimentais, normalmente ratos ou camundongos, que apresentam hipertrofia patológica e fibrose como processos patológicos finais.

A administração crônica e sustentada de isoproterenol pode induzir anormalidades ecocardiográficas quando administrado por 2 semanas em camundongos. Karam et al. (2020) mostraram que a infusão crônica de 60mg/kg/dia

de isoproterenol por via subcutânea provocou redução da fração de ejeção em duas semanas após o início do tratamento, que perdurou 4 semanas após o início da administração da droga, mesmo após a interrupção da mesma. Além disso, os animais apresentaram fibrose e hipertrofia cardíaca.

A reexpressão de genes fetais é outra característica clássica do remodelamento cardíaco induzido pelo estímulo adrenérgico crônico. Zhou et al. (2018) mostraram que a administração crônica de uma dose de 30 mg/kg de isoproterenol em camundongos por um período de duas semanas, aumentou a expressão do RNA mensageiro para β -MHC e ANP no coração destes animais, juntamente com a indução da hipertrofia cardíaca e redução da fração de ejeção. Este mesmo aumento para β -MHC e ANP foi observado no trabalho de Ding et al. (2016), que também mostraram uma redução da α -MHC no coração dos animais tratados com uma dose de 5mg/kg de isoproterenol por via subcutânea pelo mesmo período de tempo que o trabalho supracitado.

É importante destacar que o estímulo adrenérgico crônico pode induzir diferentes fases da resposta cardíaca, no que diz respeito à contratilidade e à função. Inicialmente pode-se observar uma resposta cardíaca hipertrófica compensatória, com incremento da contratilidade dos cardiomiócitos e da função cardíaca. No entanto, com a persistência do estímulo adrenérgico, observa-se redução da contratilidade cardíaca com prejuízo funcional, caracterizando, portanto, a insuficiência cardíaca. Essa transição se dá, porque, no início, ocorre aumento da fosforilação dos receptores β , que regula positivamente a adenilil ciclase/PKA, o que ocorre de forma contrária na insuficiência cardíaca, quando ocorre a dessensibilização dos receptores β devido à hiperestimulação adrenérgica (Figura 22).

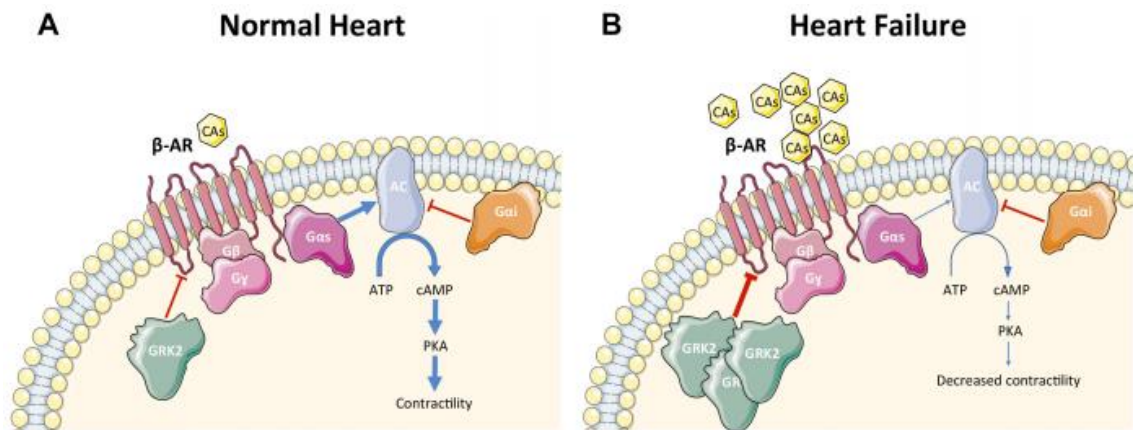


Figura 22. Sinalização do β-AR em cardiomiócitos em condições fisiológicas e durante a insuficiência cardíaca. Condições fisiológicas (A): GRK2 fosforila os receptores β-adrenérgicos em cardiomiócitos e regula a contratilidade por meio da ativação da via AC-PKA. Insuficiência cardíaca (B): O aumento de catecolaminas circulantes levou à hiperestimulação de receptores β-adrenérgicos e à suprarregulação de GRK2 em cardiomiócitos, resultando em dessensibilização/regulação negativa dos receptores β-adrenérgicos, levando à redução da contratilidade. Fonte: de Lucia et al., 2018.

8.3 A sinalização redox está envolvida no remodelamento cardíaco induzido pelo estresse adrenérgico

O estresse oxidativo é outro componente fundamental do estresse cardíaco promovido pela hiperatividade do sistema nervoso simpático. Um de seus efeitos clássicos sobre o tecido cardíaco é o aumento da produção de ROS, que pode ocorrer em respostas aos estímulos adrenérgicos agudos e crônicos, sustentados ou intermitentes (CORBI et al., 2013). A participação do estresse oxidativo no estresse adrenérgico agudo está relacionado com a ativação de MAPK (ERK1/2, JNK, p38) (ZHANG et al., 2005). Neste trabalho, os autores mostraram que a administração de uma dose de 3mg/kg/dia durante um período de 10 dias em ratos está relacionado com o desenvolvimento de hipertrofia e fibrose. Além disso, os efeitos da administração do ISO sobre as MAPK foram revertidos pela administração do Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidinoxyl), um *scavenger* de ROS. Por outro lado, embora a administração do Tempol tenha revertido a fibrose, não foi eficaz de reverter a hipertrofia cardíaca induzida pelo estresse adrenérgico crônico.

Corroborando a ideia de que grande parte dos efeitos cardiodeletérios do isoproterenol são mediados pelo estresse oxidativo, Abdelzaher et al (2021) mostraram que o remodelamento cardíaco induzido pelo agonista adrenérgico foi

prevenido pelo dapsona, uma droga capaz de inibir a produção de ânion superóxido por interagir com a NADPH oxidase. Estes autores mostraram que a administração do dapsona inibiu a fibrose cardíaca induzida pelo isoproterenol via NRF2/HO-1, suprimindo o estresse oxidativo, inflamação e apoptose no coração de ratos.

8.4 Participação da gp91^{phox} nas alterações cardíacas induzidas pelo estresse adrenérgico

O aumento da expressão e da atividade de gp91^{phox} está associada ao estresse adrenérgico. No estudo de Kralova et al. (2015), ratos Wistar com insuficiência cardíaca induzida por uma dose de 5 mg/kg/dia durante 7 dias apresentaram um aumento expressivo da gp91^{phox}. O mesmo aumento da gp91^{phox} também foi observado em camundongos submetidos à administração de uma dose de 5mg/kg/dia de isoproterenol por 10 dias. Neste estudo, os autores mostraram que o aumento da gp91^{phox} induzido pela isoproterenol foi revertido pela administração da apocinina, um inibidor não-seletivo da NADPH oxidase. Tendo em vista o efeito da apocinina sobre a produção de ROS, conclui-se que o estresse adrenérgico retroalimenta um *feedback* positivo onde as ROS sustentam a expressão aumentada da gp91^{phox}, sua principal fonte no coração (YANG et al, 2016).

O aumento da expressão de gp91^{phox} também é observado em camundongos transgênicos que superexpressam o receptor β 2 adrenérgico (β 2-TG). Animais β 2-TG com 5 meses de idade apresentam aumento da produção de ROS no ventrículo cardíaco, fenômeno que é associado ao aumento da expressão de gp91^{phox} (XU et al., 2010). Estes autores ainda demonstraram que a expressão aumentada de gp91^{phox} foi reduzida pela administração de NAC (n-acetylcisteína), um agente antioxidante.

A relação entre a sinalização adrenérgica e a produção de ROS derivada da gp91^{phox} também pode ser visualizada no plano celular. Foi demonstrado que mioblastos cardíacos H9c2 incubados com noradrenalina (5 μ M) apresentam aumento da produção de ROS, que foi abolida pela incubação com o inibidor farmacológico seletivo da gp91^{phox}, o gp91ds-tat. A redução da atividade oxidante da gp91^{phox} foi associada ainda ao bloqueio das alterações na expressão de β e α -MHC e do ANP induzidas pela noradrenalina (SALEEM E GOSWAMI, 2017).

A participação das ROS derivadas da NADPH oxidase nas alterações cardíacas também são visualizadas através do estímulo adrenérgico no coração senil.

Corações isolados de ratos adultos e idosos foram desafiados com concentrações crescentes de isoproterenol. Diferentemente dos corações de ratos adultos, nos quais o isoproterenol apresentou efeito inotrópico e lusotrópico positivos, corações de ratos idosos apresentaram essa resposta diminuída. Por outro lado, o efeito do agonista adrenérgico no coração dos animais idosos foi completamente recuperado pela incubação da apocinina, o que também foi observado na contratilidade no plano celular em cardiomiócitos isolados (VALDÉS et al., 2018).

Todas estas evidências reforçam a importância da atividade da gp91^{phox} para os efeitos cardíacos do sistema nervoso simpático, aqui evidenciado pela sinalização β -adrenérgica. A literatura é vasta em mostrar essa relação em diversos modelos experimentais animais e também em experimentos *in vitro*, mas carece de evidências consistentes a respeito de como ocorre a ativação da gp91^{phox} em resposta ao estímulo adrenérgico, em especial de quais fatores estão *upstream* à ativação da gp91^{phox} em resposta aos agonistas adrenérgicos. Imbuídos na busca do entendimento deste processo e de preenchermos esta lacuna na literatura, realizamos, portanto, este trabalho.

9. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL

O sistema nervoso autônomo simpático tem um envolvimento crucial nos processos patológicos que culminam na manifestação clínica das doenças cardiovasculares; inclusive o bloqueio de sua atividade está associado ao aumento da expectativa de vida de pacientes cardiopatas.

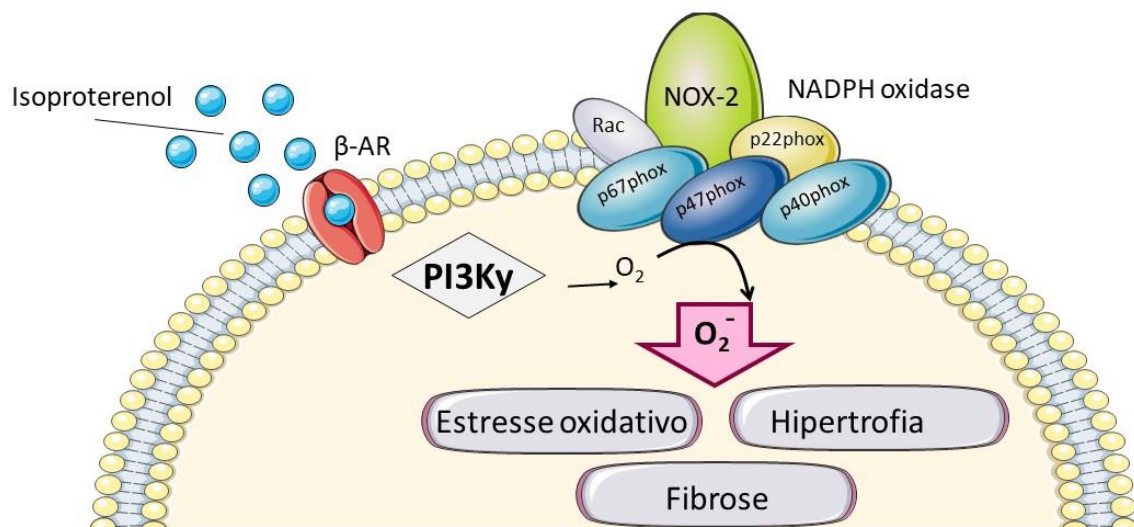


Figura 23. Hipótese central: o remodelamento cardíaco induzido pela estímulo β-adrenérgico sustentado depende da ativação de gp91^{phox} mediada pela PI3Ky.
β-AR: Receptores β adrenérgicos; PI3Ky: fosfatidilinositol-3-cinase gama.

Existem muitas evidências que demonstram que o estresse oxidativo tem um envolvimento substancial nos efeitos cardiodeletérios do desequilíbrio autonômico. Além disso, estudos mais recentes apontam que a gp91^{phox} está envolvida com o desenvolvimento de hipertrofia, fibrose e inflamação cardíaca. Por outro lado, pouco é conhecido sobre os mecanismos que estão *upstream* à ativação de gp91^{phox} durante o desenvolvimento do remodelamento patológico.

Nesta linha, nossas perguntas experimentais no segundo capítulo desta tese é: os efeitos patológicos do estímulo adrenérgico crônico persistem diante da inibição da gp91^{phox}? Se sim, qual(is) seria(m) os ativadores *upstream* da gp91^{phox} em resposta a ativação adrenérgica? Uma possibilidade seria a via da PI3Ky, uma vez que existem evidências na literatura que sua fosforilação e o PIP3, produto deste processo, podem recrutar p47^{phox} para a membrana, e, com isso, ativar gp91^{phox}. Para elucidar essas questões em aberto, desafiaremos camundongos selvagens e nocautes com a administração intraperitoneal de isoproterenol por 7 dias. Este é um modelo murino bem caracterizado de estimulação adrenérgica excessiva associada

ao desbalanço redox. Utilizaremos uma combinação de estudos *in vivo* e *in vitro* em animais selvagens e geneticamente modificados $gp91^{phox/-}$ e $PI3K\gamma^{KD/KD}$, para elucidar a relação entre fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K γ) e a $gp91^{phox}$ e o remodelamento cardíaco induzido pela ativação adrenérgica no coração.

10. OBJETIVOS

10.1 Objetivo Geral

Investigar a participação da PI3K γ sobre a ativação de gp91^{phox} induzida pelo estímulo adrenérgico crônico.

10.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar a participação da NADPH oxidase no remodelamento cardíaco induzido pela administração de isoproterenol em camundongos C57BL/6J através da:

- i.* produção de ROS;
- ii.* quantificação da hipertrofia cardíaca e da área de secção transversal de cardiomiócitos;
- iii.* deposição total de colágeno;
- iv.* expressão proteica de marcadores moleculares de fibrose cardíaca;
- v.* avaliação ecocardiográfica.

b) Avaliar a participação da gp91^{phox} no remodelamento cardíaco induzido pela administração de isoproterenol utilizando camundongos gp91^{phox^{-/-}}.

Para isto, serão repetidos os experimentos i, ii, iii e iv nos animais nocautes.

c) Avaliar a participação da PI3K γ no remodelamento cardíaco induzido pela administração de isoproterenol utilizando camundongos PI3K γ ^{KD/KD}.

Para isto, serão repetidos os experimentos i, ii, iii e iv nos animais mutantes para subunidade γ da PI3K.

11. MATERIAIS E MÉTODOS

11.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número de protocolo: 117/2020.

11.2 Animais

Neste estudo foram utilizados: camundongos machos C57BL/6J obtidos no Biotério Central da UFMG, camundongos machos Myh7-YFP^{+/-} cedidos pelo Prof. Dr. William Pu (Harvard University, Estados Unidos), camundongos machos gp91^{phox^{-/-}} obtidos em colaboração com a Profa. Dra. Leda Quércia Vieira (Departamento de Bioquímica) e camundongos machos PI3K^{γ^{KD/KD}} obtidos em colaboração com o Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG). Foram utilizados animais de 10-12 semanas, os quais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/UFMG), num ciclo claro/escuro de 12 horas (12 horas de claridade, 12 horas de escuro), recebendo água e comida *ad libitum*.

11.3 Tratamento *in vivo* com isoproterenol e Apocinina

Camundongos C57BL/6J ou Myh7-YFP^{+/-} foram tratados via injeção intraperitoneal com isoproterenol (Sigma-Aldrich) na dose de 25 mg/kg/dia, durante 7 dias. Os animais do grupo controle foram tratados com salina (NaCl, 0,9%, no volume médio que foi injetado nos animais tratados com ISO, pela mesma via de administração). Foi realizada eutanásia por deslocamento cervical 24 horas após a última injeção de isoproterenol. Após isto, os corações foram rapidamente removidos e transferidos para nitrogênio líquido, e posteriormente armazenados em freezer -80°C. Quando apropriado, o tecido cardíaco foi embebido em O.C.T. Tissue-Tek (#4583, Sakura) e armazenados em freezer -20°C.

Em um segundo delineamento experimental, os animais transgênicos gp91^{phox}^{-/-} e PI3K^γ^{KD/KD} foram submetidos ao mesmo tratamento com isoproterenol. A forma de coleta do tecido cardíaco seguiu o mesmo protocolo descrito no item anterior.

11.4 Análise da hipertrofia cardíaca e da área celular

No oitavo dia após o início da administração do isoproterenol, a hipertrofia cardíaca foi analisada através da razão do peso úmido do coração, em miligramas (mg), pelo tamanho da tibia esquerda, em centímetros (cm) - mensurado com uso de paquímetro. A análise da hipertrofia celular foi realizada utilizando-se o WGA (*Wheat germ agglutinin*). Os tecidos foram inicialmente fixados com PFA 4% durante 30 min. Ao final deste tempo, os tecidos foram lavados 3x com PBS 1x e, então, foram incubados com WGA (5 µg/ml, #W32466, Thermo Fisher Scientific), conjugado com Alexa Fluor 647, durante 15 minutos. Após nova lavagem, os tecidos foram incubados durante 5 min com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1:500, #D1306, RRID: AB_2629482, Thermo Fisher Scientific) para marcação do núcleo. As lâminas foram novamente lavadas e submetidas à selagem e montagem com lamínulas. O glicerol 60% foi utilizado como meio de montagem. As imagens dos tecidos corados com WGA foram capturadas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss) situado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) no ICB/UFMG. O *software* Zem Blue (Zeiss) foi utilizado para quantificação da área celular.

11.5 Análise da deposição total de colágeno

A deposição de colágeno foi avaliada através da coloração PicroSirius Red. O coração foi seccionado em fatias de 8 µm, que foram transferidas para lâminas. Inicialmente, as lâminas foram retiradas do freezer. Após secarem completamente, as lâminas foram incubadas por 45 min em solução de PicroSirius Red. Após isso, as lâminas foram transferidas para solução de HCl 0,01% por dois minutos. Ao final, as lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e seladas com uso de Entelan (#107961, Merck Millipore). A aquisição das imagens foi realizada em microscópio de luz com aumento de 400x. A porcentagem de colágeno foi calculada pelo software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, U.S.A).

11.6 Tratamento *in vitro* com isoproterenol ou com o AS605240 em cardiomiócitos ventriculares isolados

O isolamento dos cardiomiócitos ventriculares foi realizado de acordo com os métodos previamente descritos no capítulo I. Os cardiomiócitos foram tratados durante 15 minutos com o inibidor seletivo da PI3K γ , o AS60524015. Ao final dos 15 min, os cardiomiócitos foram então tratados com isoproterenol (10 nmol/L).

11.7 Análise estatística

Inicialmente, foi realizada a análise de normalidade e homoscedasticidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. O teste *t de student* ou o ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, foram utilizados para análise das diferenças entre os grupos experimentais. Os dados foram expressos em média e erro padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos experimentais foram consideradas quando o $p < 0,05$. Todos os testes e gráficos foram gerados no GraphPad Prisma e no PAST (Paleontological Statistics).

12. RESULTADOS (CAPÍTULO II)

Com o objetivo de avaliar a ocorrência do estresse oxidativo nos camundongos C57BL/6J, submetidos ao tratamento com isoproterenol (ISO, 25mg/kg/dia) e apocinina (APO, 1mg/ml), durante 7 dias, e sacrificados 24 horas após a última administração de ISO. Conforme pode ser observado na Figura 24, o tratamento com ISO induziu aumento das ROS, como detectado pelo aumento da fluorescência do DHE e o tratamento com APO atenuou o aumento dessa produção de ROS.

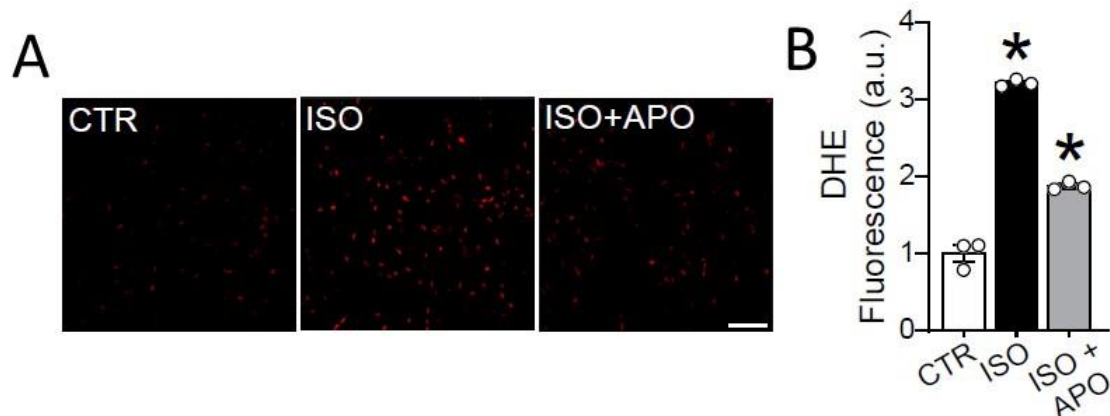


Figura 24. Apocinina atenua o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio induzido pelo estresse adrenérgico. (A) Imagens representativas de corações incubados com DHE. Barra de escala=20 μ m. (B) O gráfico de barras mostra a quantificação da intensidade de fluorescência do DHE obtida nos cortes transversais do tecido cardíaco. É observado um aumento na fluorescência DHE no grupo tratado com ISO em comparação com o grupo CTR, um resultado que é revertido pela apocinina. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs outros grupos. N= número de amostras de tecido cardíaco.

É sabido que as ROS têm influência sobre a resposta hipertrófica cardíaca ao isoproterenol (RAUT et al., 2020). Diante disso, investigamos o efeito do tratamento com APO na hipertrofia cardíaca, e também à nível celular. Conforme observado na Figura 25, o tratamento com apocinina atenuou a hipertrofia cardíaca induzida pelo ISO, o que pode ser observado no plano celular (Figura 25B), visto que o tratamento com APO atenuou o aumento da área de secção transversa induzida pelo ISO no tecido cardíaco. Em adição, a administração de APO atenuou também o efeito do ISO sobre a razão HW/TL, bem como sobre a expressão do mRNA para *Nppa*, que codifica a expressão do ANP (Figura 25C-D).

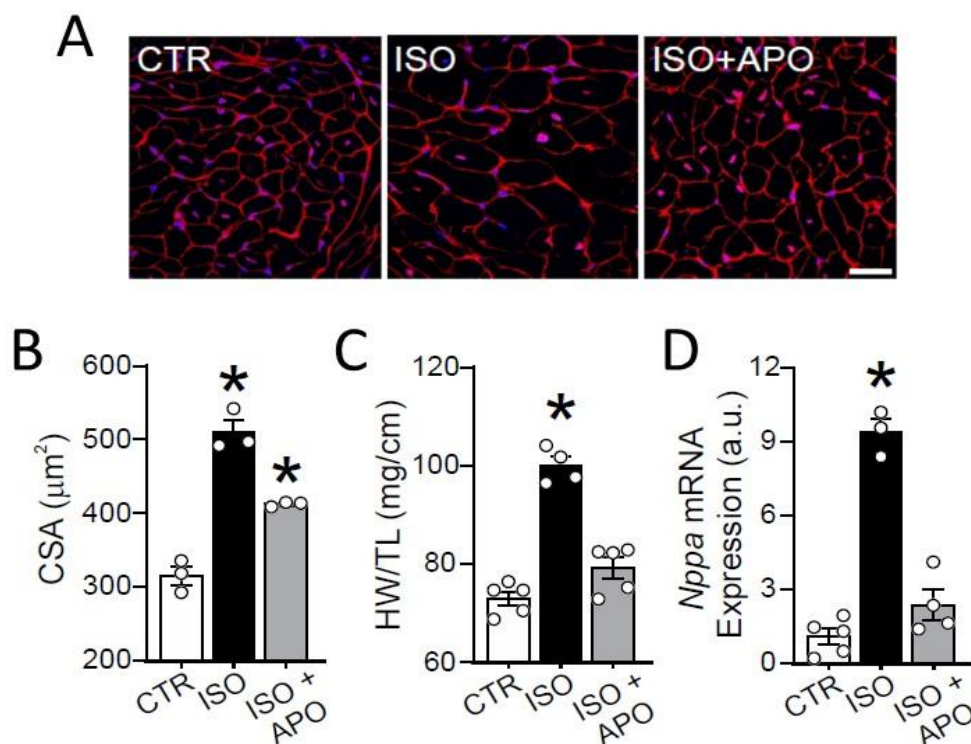


Figura 25. Apocinina atenua a hipertrofia cardíaca induzida pelo estresse adrenérgico crônico. (A) Imagens representativas cortes transversais do tecido cardíaco incubados com WGA. Barra de escala=20 μm. (B) O gráfico de barras mostra a quantificação da área de secção transversal celular nos cortes transversais do tecido cardíaco. (C) Gráfico de barras mostra a razão entre o peso do coração (mg) normalizado pelo comprimento da tíbia (cm). O aumento desta razão observado no grupo ISO é revertido pela administração de Apocinina. (D) Gráfico de barras mostra o aumento da expressão do RNA mensageiro para o gene *Nppa*, que condifica a expressão do ANP, efeito que é bloqueado pela administração de Apocinina. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs outros grupos. N= número de amostras de tecido cardíaco.

Considerando que o efeito estressor adrenérgico está associado à reexpressão de genes fetais, decidimos analisar o efeito da APO sobre a expressão de β -MHC. A β -MHC é um alvo importante uma vez que sua presença tem sido associada a regiões de fibrose (DARAZI et al., 2014). Para isto, camundongos mutantes Myh7-YFP⁺ foram submetidos ao tratamento com ISO e APO. Conforme pode ser observado na Figura 26, o ISO aumenta o número de células positivas para β -MHC, localizadas em regiões difusas dos músculos papilares e em torno das artérias coronárias. Este efeito do ISO foi atenuado pelo tratamento com APO, que reduziu o número de células positivas para β -MHC.

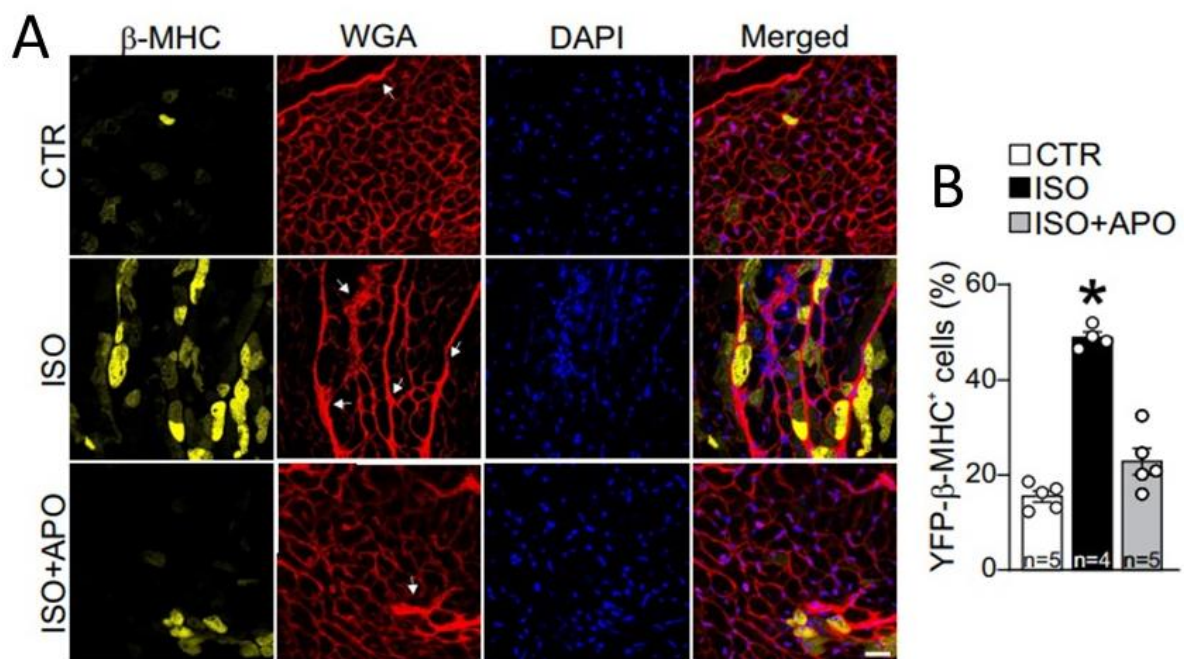


Figura 26. Apocinina impede o aumento do número de células β -MHC-YFP positivas induzido pelo estresse adrenérgico. (A) Imagens representativas ilustram o tecido cardíaco marcado com WGA. Na primeira coluna do painel é observada a fluorescência endógena para β -MHC-YFP, em amarelo. Em vermelho, fluorescência emitida pelo WGA e os núcleos estão marcados em azul pelo DAPI. Barra de escala=20 μ m. É possível observar um aumento do número de células β -MHC-YFP positivas. (B) O gráfico de barras mostra a quantificação do número de células β -MHC-YFP positivas, aumentado no grupo ISO. Este efeito do ISO é abolido pela administração de Apocinina. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs outros grupos. N= número de amostras de tecido cardíaco.

A fibrose é um evento clássico do remodelamento cardíaco induzido pelo estresse adrenérgico (THANGAIYAN et al., 2020). Considerando isto, avaliamos a deposição total de colágeno com uso do PicroSirius Red. Conforme pode ser observado na Figura 27, o tratamento com APO impediu o aumento da deposição total de colágeno induzido pelo ISO no tecido cardíaco.

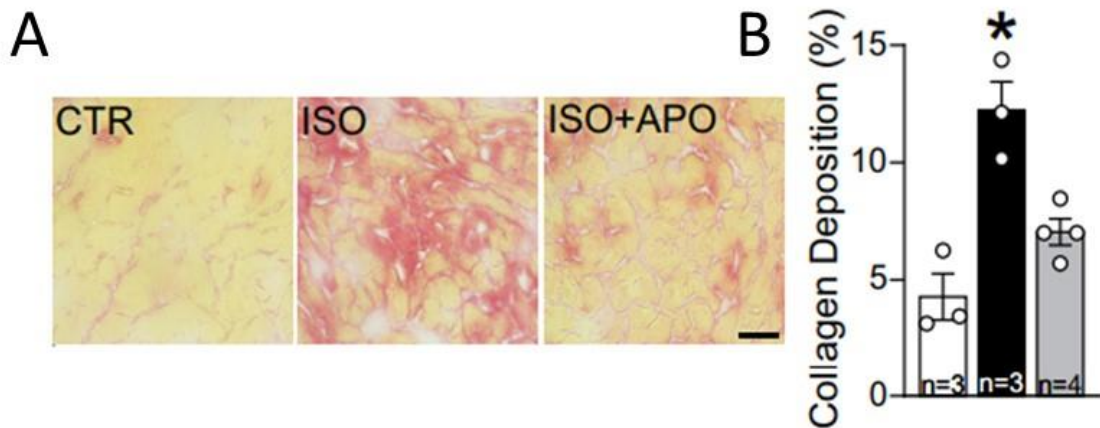


Figura 27. Apocinina atenua a fibrose cardíaca induzida pelo estresse adrenérgico crônico. (A) Imagens representativas de cortes transversais do tecido cardíaco corados com PicroSirius. O colágeno é visualizado nas imagens em tons que variam entre róseo e vermelho. Barra de escala=20 μ m. (B) O gráfico de barras mostra a quantificação da deposição total de colágeno. O aumento da deposição total de colágeno no grupo ISO, em comparação ao grupo controle, é revertido pela administração de Apocinina. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs outros grupos. N= número de amostras de tecido cardíaco.

O efeito antifibrótico do tratamento com APO se estende aos marcadores moleculares de remodelamento e fibrose cardíaca, que, neste trabalho, foram avaliados através da técnica de *Western Blot*. Avaliamos a expressão da MMP-2 e seu inibidor tecidual, o TIMP-2, que são agentes importantes envolvidos na fibrose cardíaca. Conforme podemos observar na Figura 28, o tratamento com APO impediu o aumento da expressão proteica destes marcadores induzido pelo ISO. Também analisamos a expressão do TGF- β , um sinalizador importante no desenvolvimento da fibrose cardíaca. Assim como para MMP-2 e TIMP-2, o tratamento com APO também impediu o aumento deste marcador molecular.

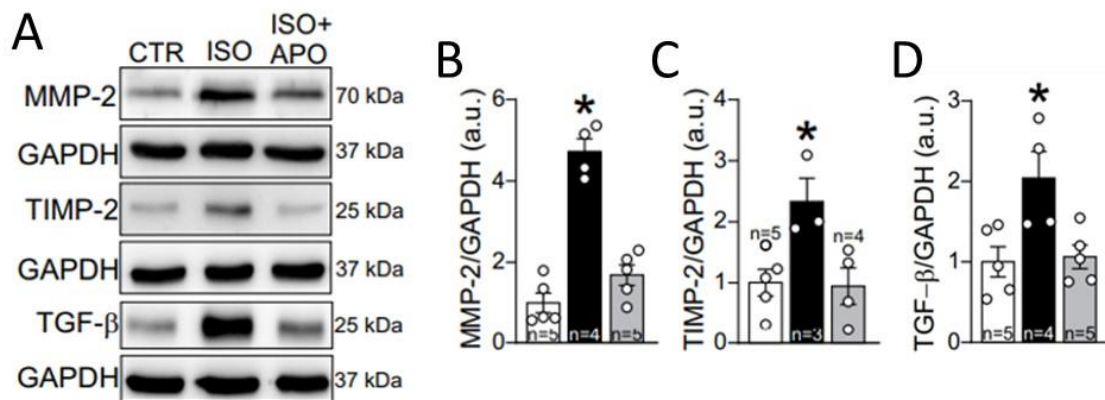


Figura 28. Apocinina previne o aumento da expressão de marcadores moleculares de fibrose cardíaca induzido pelo estresse adrenérgico. (A) Imagens representativas do *Western blot* para expressão da MMP-2, TIMP-2 e TGF- β . O GAPDH foi utilizado como controle para normalização dos dados. Gráficos de barra ilustram o aumento da expressão da (B) MMP-2, (C) TIMP-2 e do (D) TGF- β induzido pelo ISO, efeito este prevenido pela administração de apocinina. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs outros grupos. N= número de homogenatos de tecido cardíaco.

Tendo em vista os dados apresentados e a participação da NADPH oxidase no remodelamento fibrótico induzido pelo ISO, nosso próximo passo foi verificar a expressão da gp91^{phox} no tecido cardíaco em resposta ao tratamento adrenérgico. Assim, realizamos uma análise temporal da expressão proteica da gp91^{phox} nos dias 1, 3 e 8, após o início da administração do ISO. Conforme podemos observar na Figura 29, o ISO aumenta a expressão já no terceiro dia, efeito que se mantém sustentado até o final do tratamento.

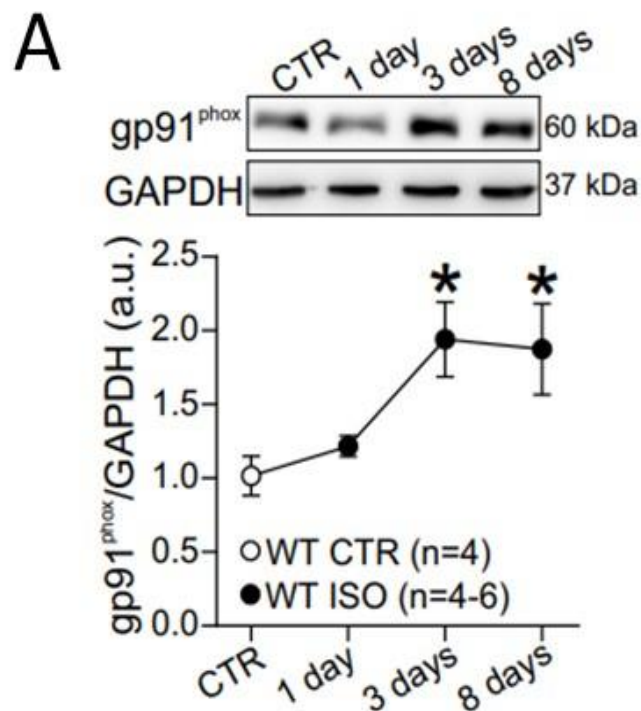


Figura 29. O estresse adrenérgico aumenta a expressão da gp91^{phox} no tecido cardíaco. Imagens representativas do *Western blot* para expressão da gp91^{phox} no tecido cardíaco em diferentes dias. O GAPDH foi utilizado como controle para normalização dos dados. Gráfico de linhas ilustra o aumento da expressão da gp91^{phox} que ocorre no terceiro dia após o início do tratamento com ISO, e permanece aumentado até o final do tratamento. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs outros grupos. N= número de homogenatos de tecido cardíaco.

Considerando o aumento da gp91^{phox} induzido pelo ISO, nos perguntamos, então, se esta subunidade estaria envolvida no efeito oxidativo induzido por este agente. Para responder a esta pergunta, submetemos animais com deleção genética da gp91^{phox} (gp91^{phox-/-}) ao tratamento com ISO. Conforme pode ser visualizado na Figura 30, nestas condições o tratamento com ISO não induziu aumento da fluorescência do DHE, como observado anteriormente em animais *wild type*.

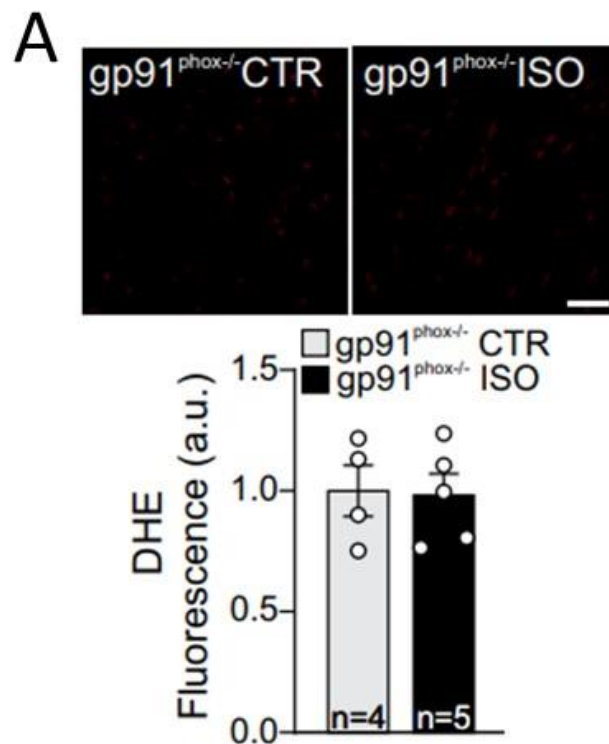


Figura 30. O isoproterenol não induz aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco de camundongos gp91^{phox-/-}. (A) Imagens representativas de corações incubados com sonda DHE. Barra de escala=20 μ m. (B) O gráfico de barras mostra a quantificação da intensidade de fluorescência do DHE obtida nos cortes transversais do tecido cardíaco. Não é observada diferença entre os grupos CTR e ISO. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). N= número de amostras cardíacas analisadas.

Considerando o envolvimento da sinalização redox no efeito hipertrófico do ISO e também a participação crucial da gp91^{phox} no efeito oxidante do estresse adrenérgico crônico, o próximo passo foi avaliar o envolvimento da gp91^{phox} na resposta hipertrófica cardíaca ao ISO. Conforme observamos na figura 31, o ISO não induziu hipertrofia cardíaca nos animais gp91^{phox}^{-/-}, como pode ser observado por meio da razão HW/TL, bem como no plano celular através da área de secção transversa.

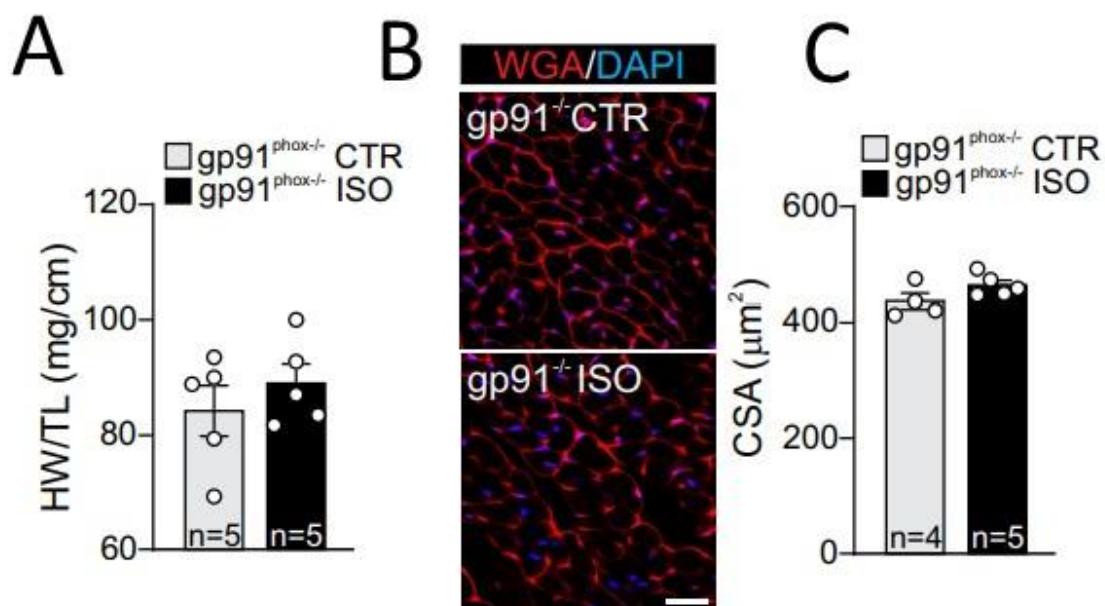


Figura 31. O isoproterenol não induz hipertrofia cardíaca em camundongos gp91^{phox}^{-/-}. (A) Gráfico de barras mostra a razão entre o peso do coração (mg) normalizado pelo comprimento da tíbia (cm). (B) Imagens representativas de cortes transversais do tecido cardíaco incubados com WGA. Barra de escala=20 μm. (C) O gráfico de barras mostra a quantificação da área de secção transversal celular nos cortes transversais do tecido cardíaco. O ISO não induziu hipertrofia nos animais gp91^{phox}^{-/-}. Os dados são expressos em média ± erro padrão da média (SEM). N= número de amostras cardíacas analisadas.

Diferentemente do que foi observado nos animais selvagens, o estresse adrenérgico crônico não induziu fibrose cardíaca nos animais com deleção genética da gp91^{phox}. Como pode ser observado na Figura 32, não existem diferenças entre os grupos para a deposição de colágeno total no tecido cardíaco de camundongos gp91^{phox-/-} em comparação aos animais selvagens.

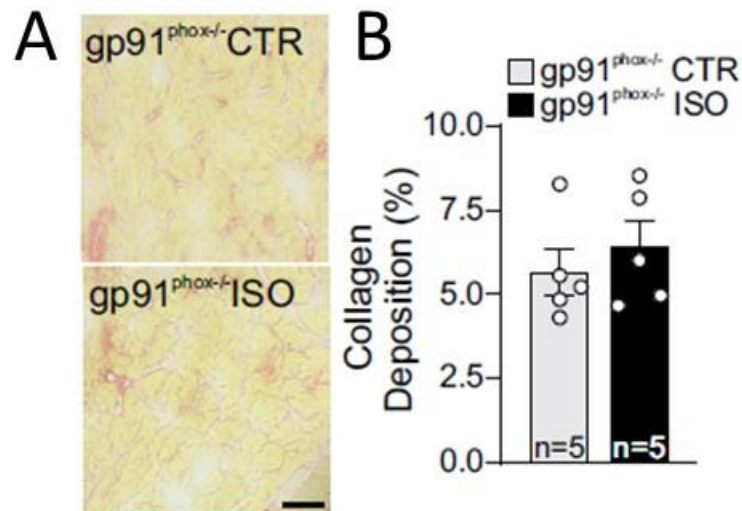


Figura 32. Tratamento com isoproterenol não induziu fibrose cardíaca nos animais gp91^{phox-/-}. (A) Imagens representativas de cortes transversais do tecido cardíaco corados com PicroSirius Red. O colágeno é visualizado nas imagens em tons que variam entre róseo e vermelho. Barra de escala=20 μ m. (B) O gráfico de barras mostra a quantificação da deposição total de colágeno. Não são observadas diferenças entre os grupos. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). N= número de amostras cardíacas utilizadas.

O ISO também não induziu aumento dos marcadores moleculares de remodelamento cardíaco nos animais $gp91^{phox-/-}$. Como podemos observar na figura 33, não existem diferenças na expressão proteica do TGF- β , MMP-2 e TIMP-2 entre os grupos experimentais.

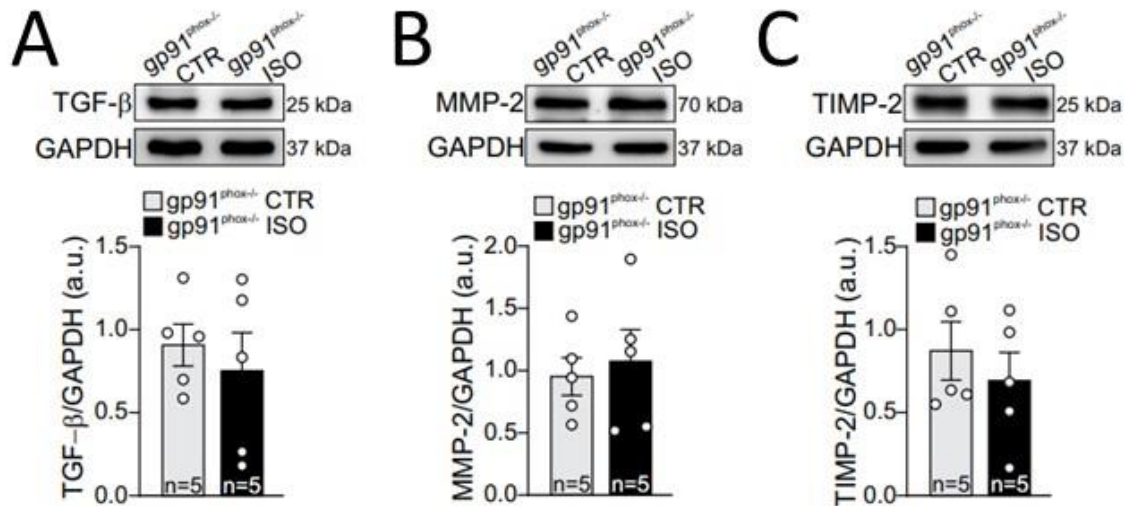


Figura 33. O isoproterenol não aumenta a expressão dos marcadores moleculares de fibrose cardíaca induzido pelo estresse adrenérgico. Imagens representativas do *Western blot* para expressão da TGF- β , MMP-2 TIMP-2. O GAPDH foi utilizado como controle para normalização dos dados. Gráficos de barra ilustram a expressão do (A) TGF- β , (B) MMP-2 e do (C) TIMP-2. Não existem diferenças entre os grupos. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). N= número de homogenatos de tecido cardíaco.

Considerando que, até o momento, não observamos nenhum efeito do ISO no coração dos animais $gp91^{phox}$, nós realizamos então experimento com cardiomiócitos isolados destes animais no intuito de verificar se sinalização adrenérgica ativada pelo ISO está preservada nestes animais. Para isto, analisamos o efeito *in vitro* do ISO sobre o transiente de cálcio, que é um efeito classicamente descrito na literatura. Como podemos observar na figura 34, o ISO induziu aumento no transiente de cálcio em cardiomiócitos provenientes dos animais $gp91^{phox}$, o que demonstra que a sinalização está preservada no coração destes animais.

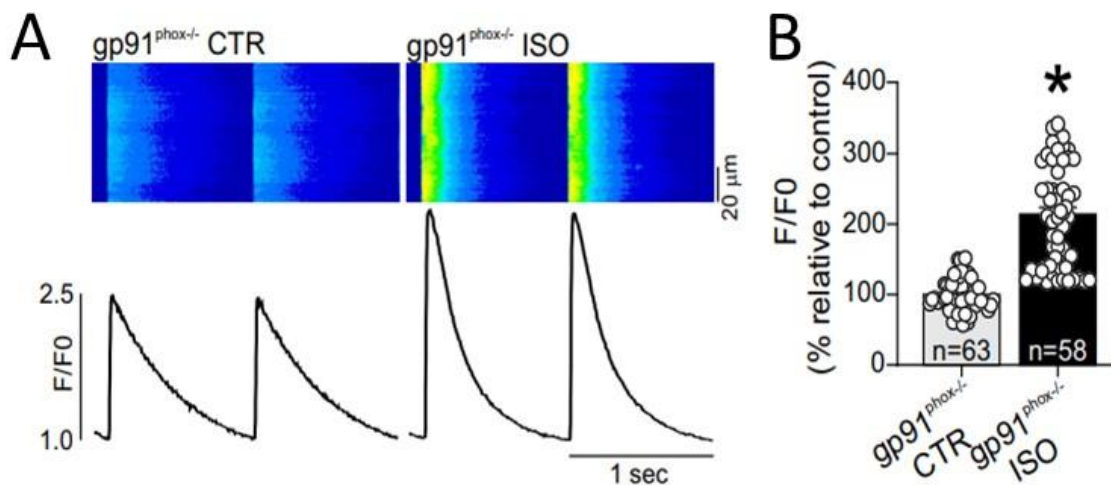


Figura 34. Cardiomiócitos de camundongos $gp91^{phox-/-}$ apresentam aumento no transiente de Ca^{2+} induzido pelo isoproterenol. (A) No painel superior, imagens representativas do transiente de Ca^{2+} obtidos de cardiomiócitos ventriculares marcados com sonda FLUO-4 AM. Painel inferior, perfil do transiente de cálcio. (B) Gráfico de barras demonstra o aumento da fração F/F_0 induzida pelo isoproterenol em cardiomiócitos de animais $gp91^{phox-/-}$. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). ** $p < 0,05$ vs WT veículo. N=número de células analisadas.

Estudos prévios em demonstrado que a família de lipases PI3K está envolvida com a ativação da gp91^{phox}. Entretanto, ainda não era bem estabelecida a contribuição da PI3K na ativação de NOX-2 no coração, e sua real contribuição para o remodelamento cardíaco patológico decorrente de sua ativação. Imbuídos do intuito de elucidar esta questão em aberto, primeiros analisamos o efeito do estresse adrenérgico crônico sobre a expressão do mRNA para o *Pik3cg*, gene que codifica a expressão da PI3K γ no coração. Conforme é possível observar na figura 35, o tratamento com ISO aumenta a expressão do mRNA *Pik3cg* no coração de animais selvagens.

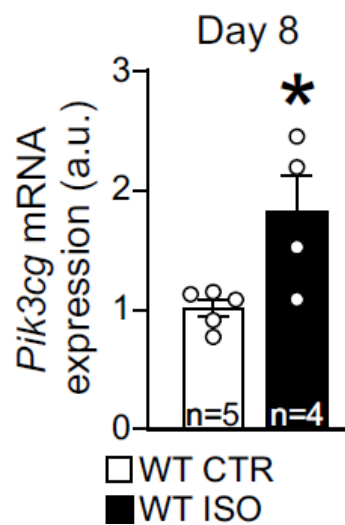


Figura 35. O estresse adrenérgico aumenta a expressão do mRNA para *Pik3cg* no tecido cardíaco. Gráfico de barras ilustra o aumento da expressão da mRNA para *Pik3cg* no coração dos animais submetidos ao estresse adrenérgico crônico com isoproterenol. S26 foi utilizado com um controle interno. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$ vs grupo controle. N= número de homogenatos de tecido cardíaco.

Dado o fato de que a PI3K γ pode estar envolvida com a produção de ROS no tecido cardíaco, nós analisamos o envolvimento da mesma no efeito oxidativo do ISO. Primeiro, isolamos cardiomiócitos de animais *wild type* e submetemos ao tratamento com ISO, diante (ou não) da pré-incubação com o inibidor farmacológico da PI3K γ , o AS605240. Como podemos observar na figura 36, a inibição farmacológica da PI3K γ abole o efeito oxidativo do ISO. Em seguida, isolamos cardiomiócitos de animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$ e tratamos com ISO. Novamente, o ISO teve seu efeito oxidativo abolido. Juntos, estes resultados apontam que a PI3K γ é crucial para o efeito oxidativo do ISO em cardiomiócitos.

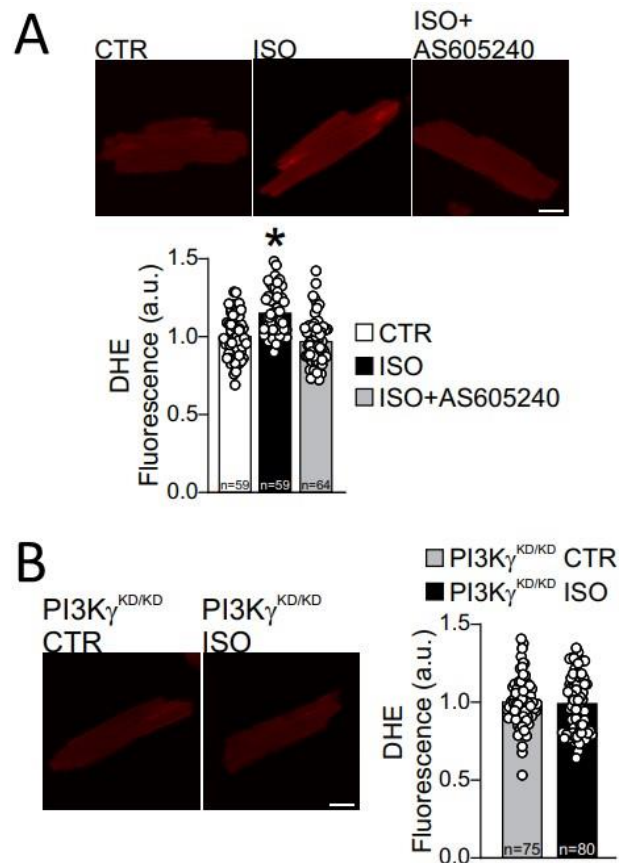


Figura 36. Estímulo adrenérgico promove aumento da produção de ROS em cardiomiócitos ventriculares via PI3K γ . (A) Painel mostra as imagens representativas dos cardiomiócitos incubados com DHE. Gráfico de barras mostra que o AS605240 (inibidor de PI3K γ) bloqueia o aumento da produção de ROS induzido pelo ISO em cardiomiócitos. (B) Painel mostra as imagens representativas dos cardiomiócitos provenientes de animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$ incubados com DHE. Gráfico de barras mostra que o ISO não aumenta a produção de ROS nos cardiomiócitos provenientes dos animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). ** $p < 0,05$ vs WT veículo. N= número de células analisadas.

Para avaliar a participação da PI3K γ no efeito oxidativo do ISO *in vivo*, nós submetemos animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$ à administração crônica de ISO. Como podemos observar na Figura 37, o efeito do ISO sobre a produção de ROS no tecido cardíaco foi abolido.

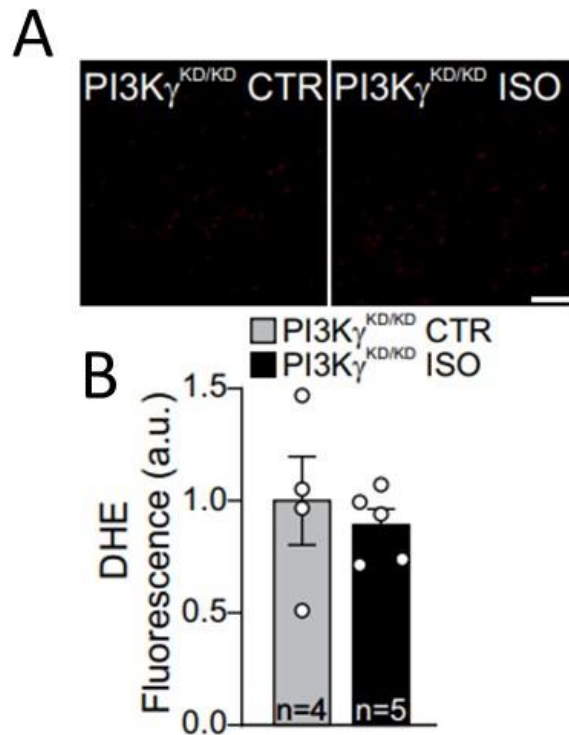


Figura 37. O isoproterenol não induz aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco de camundongos PI3K $\gamma^{KD/KD}$. (A) Imagens representativas de corações incubados com DHE. Barra de escala=20 μ m. (B) O gráfico de barras mostra a quantificação da intensidade de fluorescência do DHE obtida nos cortes transversais do tecido cardíaco. Não é observado diferença entre os grupos CTR e ISO. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). N= número de amostras de tecido cardíaco analisadas.

Tendo em vista a participação da sinalização redox no efeito fibrótico cardíaco do ISO, e a abolição da produção de ROS pelo inibidor da PI3K γ , no próximo passo nós analisamos a deposição total de colágeno no tecido cardíaco dos animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$ submetidos à administração de ISO. Como podemos observar na Figura 38, o ISO não induziu fibrose no tecido cardíaco dos animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$.

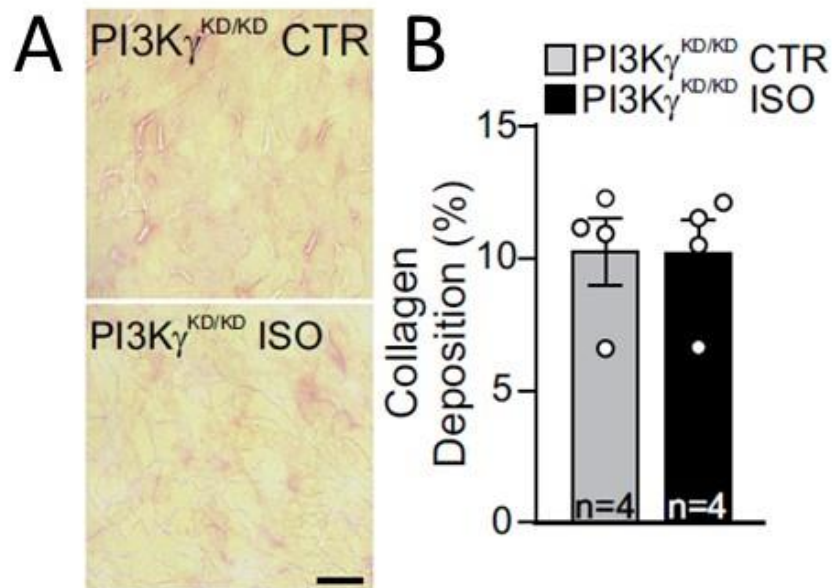


Figura 38. Tratamento com isoproterenol não foi capaz de induzir fibrose cardíaca nos animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$. Tratamento com isoproterenol não foi capaz de induzir fibrose cardíaca nos animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$. (A) Imagens representativas de cortes transversais do tecido cardíaco corados com PicroSirius Red. O colágeno é visualizado nas imagens em tons que variam entre róseo e vermelho. Barra de escala=20 μ m. (B) O gráfico de barras mostra a quantificação da deposição total de colágeno. Não são observadas diferenças entre os grupos. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). N= número de amostras de tecido cardíaco analisadas.

A ausência de efeito do ISO também foi observada na expressão proteica dos marcadores moleculares de remodelamento nos corações dos animais $PI3K\gamma^{KD/KD}$. Surpreendentemente, a expressão do TIMP-2 foi reduzida no coração dos animais $PI3K\gamma^{KD/KD}$ (Figura 39).

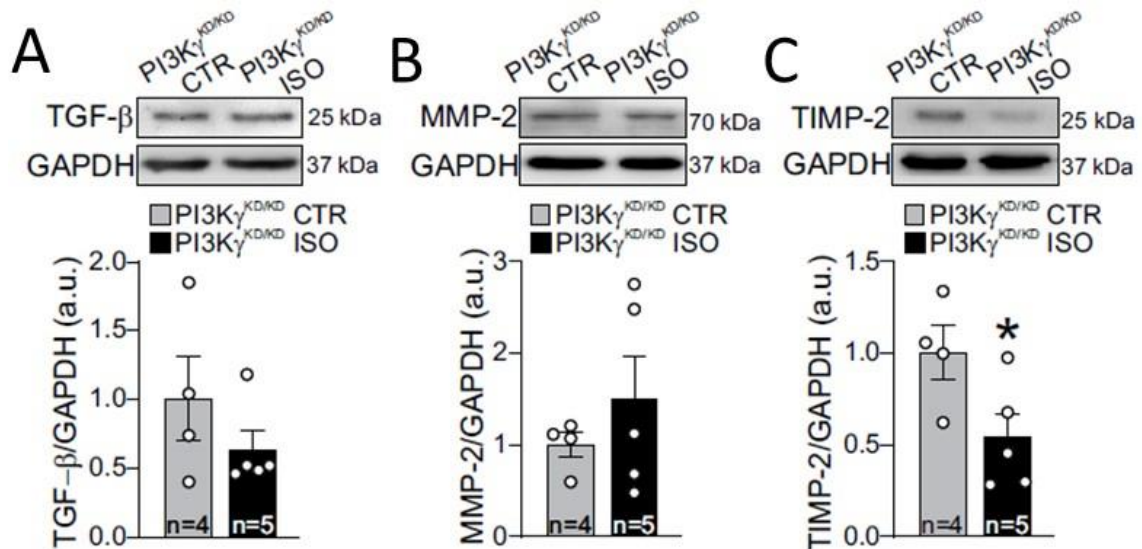


Figura 39. Tratamento com isoproterenol não induz aumento na expressão dos marcadores moleculares de fibrose cardíaca no coração de camundongos $PI3K\gamma^{KD/KD}$. Imagens representativas do *Western blot* para expressão da TGF- β , MMP-2 TIMP-2. O GAPDH foi utilizado como controle para normalização dos dados. Gráficos de barra ilustram a expressão da (A) TGF- β , (B) MMP-2 e do (C) TIMP-2. Não existem diferenças entre os grupos para a expressão de TGF- β e de MMP-2. O ISO reduz a expressão de TIMP-2 no coração dos animais $PI3K\gamma^{KD/KD}$. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). N= número de homogenatos de tecido cardíaco analisadas.

No intuito de atestar que a sinalização adrenérgica estava preservada no coração dos animais $PI3K\gamma^{KD/KD}$, nós analisamos o efeito do ISO sobre o transiente de cálcio em cardiomiócitos provenientes de animais $PI3K\gamma^{KD/KD}$. Como podemos observar na Figura 40, o ISO induziu o aumento do transiente de cálcio dos cardiomiócitos dos animais $PI3K\gamma^{KD/KD}$, o que demonstra que a sinalização adrenérgica está preservada nos cardiomiócitos destes animais.

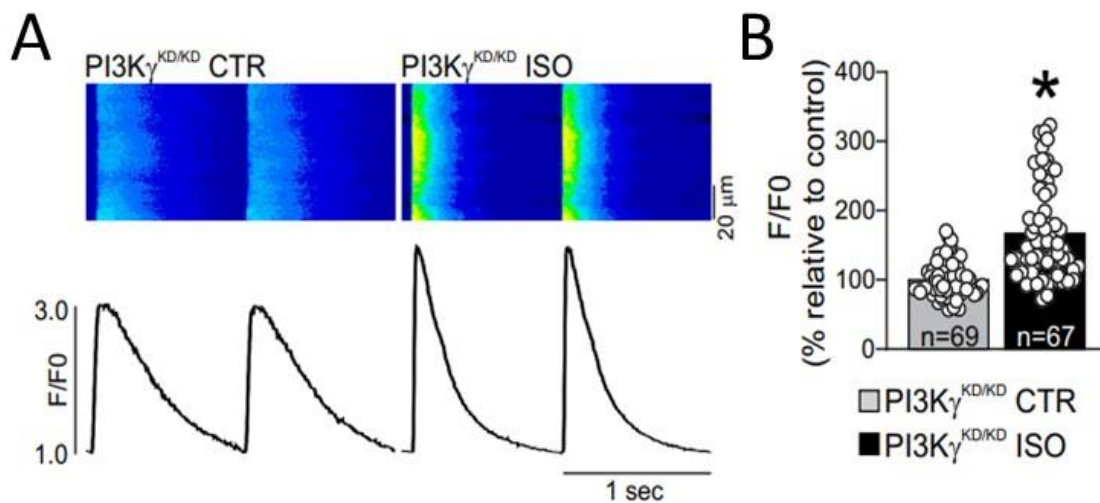


Figura 40. Cardiomiócitos de camundongos $PI3K\gamma^{KD/KD}$ apresentam aumento no transiente de Ca^{2+} induzido pelo isoproterenol. (A) Imagens representativas do transiente de Ca^{2+} obtidos de cardiomiócitos ventriculares marcados com sonda FLUO-4 AM. Na parte inferior, perfil do transiente de cálcio. (B) Gráfico de barras demonstra o aumento da fração F/F_0 induzida pelo isoproterenol em cardiomiócitos de animais $PI3K\gamma^{KD/KD}$. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). ** $p < 0,05$ vs WT veículo. N= número de células analisadas.

13. DISCUSSÃO (CAPÍTULO II)

No capítulo II, mostramos que PI3Ky recruta a gp91^{phox} para induzir programa fibrótico no coração em resposta à estimulação adrenérgica. Inicialmente, mostramos que a apocinina atenuou as alterações cardíacas induzidas pelo ISO, confirmando a contribuição das ROS derivadas da NADPH oxidase no remodelamento cardíaco induzido pelo estresse adrenérgico crônico. Nesta linha, demonstramos que ISO não foi capaz de induzir o remodelamento cardíaco em camundongos com deficiência de gp91^{phox}. Este dado, em especial, reforça a ideia de que o gp91^{phox}, principal fonte de ROS no coração, é crucial para o estabelecimento dos efeitos da sinalização adrenérgica sobre o tecido cardíaco. Além disso, também mostramos que o ISO não induziu o aumento da formação de ROS em cardiomiócitos ventriculares na presença do inibidor farmacológico de PI3Ky, ou em cardiomiócitos isolados de camundongos PI3Ky^{KD/KD}. Finalmente, nossos resultados mostram que os animais PI3Ky^{KD/KD} são resistentes à fibrose e hipertrofia cardíaca induzida por insulto adrenérgico. Juntos, nossos achados indicam que a ativação de PI3Ky é um sinal crítico para consequente ativação de gp91^{phox} em resposta à estimulação adrenérgica crônica. Estes dados fornecem evidências importantes sobre os mecanismos envolvidos no remodelamento cardíaco induzido pelo estresse adrenérgico, destacando o papel do eixo PI3Ky/gp91^{phox} neste processo e indicando que estratégias terapêuticas baseadas na modulação deste eixo podem ser úteis para mitigar a instauração da fibrose durante o desenvolvimento da doença cardíacas.

O ponto de partida do nosso trabalho foi a avaliação global do panorama de genes alterados no coração em resposta ao ISO. Este dado foi de extrema importância, porque indicou o programa de ativação gênica pró-fibrótico como o principal alvo da estimulação adrenérgica crônica. Mais importante ainda, o tratamento com apocinina foi capaz de reverter esse padrão de ativação. Isso corrobora com a literatura, visto que dados mostram a função cardioprotetora da apocinina em reverter a fibrose cardíaca induzida pelo ISO. Yang et al. (2016), mostraram que a administração da apocinina preveniu as alterações induzidas pelo ISO sobre perfil da expressão de microRNAs que compõe vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento da fibrose cardíaca. Com este dado em mente partimos para investigar a participação do eixo PI3Ky/gp91^{phox} neste processo.

É bem sabido que a estimulação adrenérgica crônica induz um desequilíbrio no estado redox (SOUZA et al., 2020). Estudos mostram que as ROS compõem os mecanismos envolvidos no remodelamento cardíaco promovido pela ativação crônica de receptores β -adrenérgicos (KATARE et al., 2017; LI et al., 2016; WANG et al., 2021). Corroborando dados previamente publicados, nosso trabalho mostra que a inibição da NADPH oxidase previne hipertrofia e fibrose cardíaca induzidas pelo insulto adrenérgico. Aqui é importante ressaltar que além da fibrose, a hipertrofia cardíaca é outro efeito clássico da estimulação adrenérgica no coração (RAUT et al., 2020). O trabalho de Tanriverdi et al (2017) mostrou que a administração de apocinina reduz a lesão cardíaca induzida pelo ISO por atenuar o estresse oxidativo induzido pelo agonista adrenérgico. Neste trabalho, os autores mostraram que a administração de apocinina reduziu os níveis de malonaldeído (MDA), um clássico marcador de dano oxidativo, ao mesmo tempo que elevou os níveis de superóxido dismutase (SOD), catalase, e glutathione, enzimas conhecidamente antioxidantes. Os efeitos protetores da apocinina se estenderam também à redução de infiltração de células inflamatórias no tecido cardíaco. O efeito da apocinina sobre o efeito hipertrófico do ISO que demonstramos neste capítulo também foi observado no trabalho de Saleem et al. (2017). Estes autores mostraram que a administração de apocinina atenuou o aumento do peso cardíaco, e também as alterações ecocardiográficas induzidas pelo ISO.

Neste trabalho, observamos que o ISO aumentou o número de células β -MHC-YFP+, que ocorreram com mais frequência nas regiões de fibrose (PANDYA, KIM E SMITHIES, 2006). Estas células estão relacionadas à progressão da insuficiência cardíaca e, quando reduzidas pela administração de antagonistas adrenérgicos, pode ser observado a recuperação da performance cardíaca (Machackova et al., 2011). Muito embora no modelo utilizado neste estudo não seja observada insuficiência cardíaca, é possível hipotetizar que a inibição da NADPH oxidase poderia adiar a instalação da insuficiência cardíaca, posto que o aumento do número de células β -MHC-YFP+ estão associadas à redução de contratilidade cardíaca. Nesta mesma linha, nós também mostramos que a administração de apocinina atenua o efeito fibrótico do ISO. Este resultado é particularmente importante por que a fibrose é um evento patológico final comum de desordens cardíacas. Yang et al. (2016) mostraram efeito semelhante em camundongos com fibrose cardíaca induzida pela injeção de 5 ou 10 mg/kg de ISO por via intraperitoneal. Estes autores mostraram que a

administração de 50 mg/kg de apocinina, iniciada no sexto dia após a indução da fibrose, atenuou a deposição de matriz extracelular no tecido cardíaco.

No coração, as ROS compreendem várias vias de sinalização para funções fisiológicas importantes (KUBIN et al., 2011; SANTOS et al., 2011), mas também estão envolvidas no aparecimento e progressão de doenças cardíacas. (CADENAS et al., 2018; ZHANG et al., 2018; YANG et al., 2020). As ROS podem modular a atividade e conformação de proteínas sensíveis ao estado redox local, conhecidas como alvos moleculares regulados pelo estado redox. Nossos resultados mostraram que o aumento da expressão de MMP-2, TIMP-2 e TGF- β induzidos pelo ISO dependem da atividade de NADPH oxidase, visto que a apocinina bloqueou esse efeito do estresse adrenérgico crônico. A redução da expressão desses marcadores reforça a participação do estado redox como modulador chave no mecanismo patológico do estresse adrenérgico crônico sobre o coração, visto que MMP-2, TIMP-2 e TGF- β são mediadores moleculares relacionados à instalação e progressão da fibrose neste e em outros modelos experimentais de lesão cardíaca.

Dados da literatura mostram que o estresse adrenérgico crônico promove aumento da expressão da gp91^{phox} (YANG et al., 2016), principal fonte de ROS no coração (SIRKER et al., 2016). Em adição, dados pré-clínicos mostraram fortes evidências de que a gp91^{phox} está envolvida com o remodelamento cardíaco patológico. Anteriormente, Bendall et al., (2002), mostraram que camundongos gp91^{phox}^{-/-} são protegidos contra efeitos deletérios cardíacos da infusão subcutânea de Angiotensina II, em uma dose subpressora, como hipertrofia cardíaca, fibrose miocárdica e reexpressão de genes fetais. Em consonância com esses achados, Parajuli et al., (2014) mostraram que o gp91^{phox} participa do avanço da insuficiência cardíaca em um modelo de doença cardíaca com sobrecarga de pressão. Nossos dados obtidos em um modelo de ativação simpática crônica confirmam e expandem os achados anteriores que apoiam a gp91^{phox} como a principal fonte de ROS no coração e seu papel fundamental no desenvolvimento de doenças cardíacas. A conclusão de que gp91^{phox} tem um papel crucial no desenvolvimento do remodelamento cardíaca sob ativação simpática crônica, baseou-se nas seguintes observações: (1) que o tratamento com ISO leva à regulação positiva da expressão da proteína gp91^{phox} no coração; (2) o fato de que camundongos gp91^{phox}^{-/-} não apresentam aumento da produção de ROS em resposta ao ISO, e (3) ausência de hipertrofia cardíaca, reexpressão de genes fetais e fibrose em camundongos gp91^{phox}^{-/-}.

^{-/-} tratados com ISO. É importante salientar, que apesar do coração expressar outras subunidades de NOX, como NOX-4 (CAI et al., 2020) e NOX-5 (ZHAO et al., 2020), nossos dados mostram que a NOX2 é a principal isoforma responsável pela geração de ROS em resposta ao tratamento com ISO.

Outro ponto importante a ser ressaltado é o fato de que o ISO induz o aumento no transiente do cálcio nos cardiomiócitos ventriculares isolados dos animais gp91^{phox}^{-/-}. Este dado sugere fortemente que a sinalização β -adrenérgica está preservada nestes animais, descartando um mecanismo compensatório como potencial envolvido na cardioproteção observada neste modelo. No entanto, esse achado também levantou uma questão interessante sobre o papel do cálcio no desenvolvimento de fibrose em resposta ao ISO. É amplamente conhecido que a mobilização de cálcio participa da instauração da insuficiência cardíaca (LOU et al., 2012), entretanto, nossos resultados indicaram, que em um primeiro momento, a deleção da gp91^{phox} não induz de forma direta em alterações no manejo do cálcio. Dado isto, é necessário que novos experimentos sejam realizados no intuito de entender o grau de envolvimento do aumento das concentrações citoplasmáticas de cálcio induzidas pelo estímulo adrenérgico com o remodelamento cardíaco patológico.

Dados na literatura mostram que a atividade de gp91^{phox} pode estar associada ativação da PI3K (GHOSHAL et al., 2017). Além disso, produtos da fosforilação da PI3K γ podem promover o recrutamento da p47^{phox} para próximo da membrana, e, conseqüentemente, aumentar a formação de ROS via ativação da gp91^{phox} (DRUMMOND et al., 2011). Considerando estas evidências, e também o fato de que foi demonstrada uma interação entre a PI3K e os receptores β -adrenérgicos (ZHANG et al., 2011), nós analisamos o envolvimento desta enzima com o remodelamento cardíaco patológico induzido pelo estresse adrenérgico. O primeiro dado importante, neste sentido, foi mostrar que o aumento da produção de ROS induzido pelo ISO é bloqueado pelo inibidor farmacológico da PI3K γ . Nesta mesma linha, o fato de que a produção de ROS induzida pelo ISO não é observada nos cardiomiócitos PI3K γ ^{KD/KD}, é outro forte indicativo que sustenta nossa hipótese de que a PI3K γ recruta gp91^{phox} após estimulação dos receptores β -adrenérgicos. Estes resultados corroboram com o estudo de Frey et al. (2006), que mostraram que o fator de necrose tumoral (TNF) alfa induziu a fosforilação de p47^{phox} e ativação de gp91^{phox} em células endoteliais através da via PI3K γ -proteína quinase C zeta (PKCzeta). Sendo assim, nossa evidência de que a deleção da PI3K γ protege os camundongos do remodelamento cardíaco

associado ao desbalanço redox induzido pelo estresse adrenérgico crônico sugere fortemente que a ativação de gp91^{phox} mediada por PI3K γ tem um papel central na hipertrofia cardíaca e instauração da fibrose miocárdica.

Em conclusão, nossos achados em um modelo pré-clínico de doença cardíaca fornecem uma nova linha de raciocínio para elucidar como a atividade de gp91^{phox} é regulada no coração e sua contribuição para o remodelamento cardíaco. Em particular, mostramos que a ativação de gp91^{phox} por PI3K γ é um ponto crítico para hipertrofia cardíaca e instauração de fibrose miocárdica em resposta ao estresse adrenérgico crônico. Assim, nossos novos achados sugerem que as terapias que têm como alvo o eixo PI3K γ /gp91^{phox} podem ser úteis no tratamento das doenças caracterizadas pelo remodelamento cardíaco de cunho fibrótico.

14. CONCLUSÃO

Este trabalho traz um maior entendimento sobre a participação crucial da gp91^{phox} nas alterações cardíacas agudas e crônicas que dependem do estresse oxidativo. Nossos resultados indicam que a gp91^{phox} é crucial para a instalação da fibrose e inflamação induzidas pelo estresse adrenérgico crônico e pela aldosterona, respectivamente. Além disso, mostramos que isto ocorre pelo recrutamento da PI3K γ , que ativa gp91^{phox} e induz produção de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, ativam vias de sinalização cardiodeletérias.

Estas evidências são importantes porque nos ajudam a entender melhor os mecanismos patológicos associados ao estresse oxidativo no músculo cardíaco, e também porque abrem perspectivas para novas estratégias terapêuticas das doenças cardíacas que apresentam o estresse oxidativo, inflamação e fibrose como características.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

World Health Organization. Newsroom <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causesof-death> (2020).

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 1º de março de 2000;35(3):569–82.

Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 8 de dezembro de 2015;106:62–9.

Kemi OJ, Ellingsen Ø, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* setembro de 2007;43(3):354–61.

Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.* 23 de julho de 2013;128(4):388–400.

Zhu L, Li C, Liu Q, Xu W, Zhou X. Molecular biomarkers in cardiac hypertrophy. *J Cell Mol Med.* 2019 Mar;23(3):1671-1677.

Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation.* 2004 Apr 6;109(13):1580-9.

Li P, Chen X-R, Xu F, Liu C, Li C, Liu H, et al. Alamandine attenuates sepsis-associated cardiac dysfunction via inhibiting MAPKs signaling pathways. *Life Sci.* 1º de agosto de 2018;206:106–16.

Li R-L, Wu S-S, Wu Y, Wang X-X, Chen H-Y, Xin J-J, et al. Irisin alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inducing protective autophagy via mTOR-independent activation of the AMPK-ULK1 pathway. *J Mol Cell Cardiol.* agosto de 2018;121:242–55.

Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol.* julho de 2018;15(7):387–407.

Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, Bern C, Bolger AF, Echeverría LE, Dutra WO, Gascon J, Morillo CA, Oliveira-Filho J, Ribeiro ALP, Marin-Neto JA; American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Stroke Council. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2018 Sep 18;138(12):e169-e209.

Mikhael M, Makar C, Wissa A, Le T, Eghbali M, Umar S. Oxidative Stress and Its Implications in the Right Ventricular Remodeling Secondary to Pulmonary Hypertension. *Front Physiol.* 24 de setembro de 2019;10:1233.

El-Sayed HL, Nassar MF, Habib NM, Elmasry OA, Gomaa SM. Structural and functional affection of the heart in protein energy malnutrition patients on admission and after nutritional recovery. *Eur J Clin Nutr.* abril de 2006;60(4):502–10.

Yarbrough WM, Mukherjee R, Ikonomidis JS, Zile MR, Spinale FG. Myocardial remodeling with aortic stenosis and after aortic valve replacement: mechanisms and future prognostic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* março de 2012;143(3):656–64.

Yap J, Tay WT, Teng T-HK, Anand I, Richards AM, Ling LH, et al. Association of Diabetes Mellitus on Cardiac Remodeling, Quality of Life, and Clinical Outcomes in Heart Failure With Reduced and Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc.* 3 de setembro de 2019;8(17):e013114.

Martens P, Verbrugge F, Nijst P, Dupont M, Tang WHW, Mullens W. Impact of Iron Deficiency on Response to and Remodeling After Cardiac Resynchronization Therapy. *Am J Cardiol.* 1º de janeiro de 2017;119(1):65–70.

Parreira RC, Gómez-Mendoza DP, de Jesus ICG, Lemos RP, Santos AK, Rezende CP, et al. Cardiomyocyte Proteome Remodeling due to Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy during the Compensated Phase. *Proteomics Clin Appl.* julho de 2020;14(4):e2000017.

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 de junho de 1999;96(12):7059–64.

deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XHT. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp JoVE.* 21 de abril de 2010;(38):1729.

Silva MM, de Souza-Neto FP, Jesus ICG de, Gonçalves GK, Santuchi M de C, Sanches B de L, et al. Alamandine improves cardiac remodeling induced by transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1º de janeiro de 2021;320(1):H352–63.

Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* agosto de 2006;7(8):589–600.

Wang L, Zhang Y-L, Lin Q-Y, Liu Y, Guan X-M, Ma X-L, et al. CXCL1-CXCR2 axis mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration. *Eur Heart J.* 21 de maio de 2018;39(20):1818–31.

Syed M, Ball JP, Mathis KW, Hall ME, Ryan MJ, Rothenberg ME, et al. MicroRNA-21 ablation exacerbates aldosterone-mediated cardiac injury, remodeling, and dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1º de dezembro de 2018;315(6):E1154–67.

Jesus ICG, Mesquita TRR, Monteiro ALL, Parreira AB, Santos AK, Coelho ELX, et al. Alamandine enhances cardiomyocyte contractility in hypertensive rats through a nitric oxide-dependent activation of CaMKII. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1º de abril de 2020;318(4):C740–50.

Hara H, Takeda N, Komuro I. Pathophysiology and therapeutic potential of cardiac fibrosis. *Inflamm Regen*. 17 de julho de 2017;37:13.

Tallquist MD, Molkenin JD. Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat Rev Cardiol*. agosto de 2017;14(8):484–91.

López B, Ravassa S, Moreno MU, José GS, Beaumont J, González A, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches. *Nat Rev Cardiol*. julho de 2021;18(7):479–98.

Takeda N, Manabe I. Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. *Int J Inflamm*. 2011;2011:535241.

Hall C, Gehmlich K, Denning C, Pavlovic D. Complex Relationship Between Cardiac Fibroblasts and Cardiomyocytes in Health and Disease. *J Am Heart Assoc*. fevereiro de 2021;10(5):e019338.

Pellman J, Zhang J, Sheikh F. Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems. *J Mol Cell Cardiol*. maio de 2016;94:22–31.

Vasquez C, Mohandas P, Louie KL, Benamer N, Bapat AC, Morley GE. Enhanced fibroblast-myocyte interactions in response to cardiac injury. *Circ Res*. 15 de outubro de 2010;107(8):1011–20.

Hulsmans M, Sager HB, Roh JD, Valero-Muñoz M, Houstis NE, Iwamoto Y, et al. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *J Exp Med*. 5 de fevereiro de 2018;215(2):423–40.

Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell*. 20 de abril de 2017;169(3):510–522.e20.

Xiao H, Li H, Wang J-J, Zhang J-S, Shen J, An X-B, et al. IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon β -adrenergic insult. *Eur Heart J*. 1º de janeiro de 2018;39(1):60–9.

Pitoulis FG, Terracciano CM. Heart Plasticity in Response to Pressure- and Volume-Overload: A Review of Findings in Compensated and Decompensated Phenotypes. *Front Physiol*. 2020;11:92.

Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. janeiro de 2017;14(1):30–8.

Quiles JM, Narasimhan M, Mosbrugger T, Shanmugam G, Crossman D, Rajasekaran NS. Identification of transcriptome signature for myocardial reductive stress. *Redox Biol*. outubro de 2017;13:568–80.

Adamo L, Rocha-Resende C, Prabhu SD, Mann DL. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. maio de 2020;17(5):269–85.

Yoshida Y, Shimizu I, Katsuomi G, Jiao S, Suda M, Hayashi Y, et al. p53-Induced inflammation exacerbates cardiac dysfunction during pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* agosto de 2015;85:183–98.

van Eickels M, Grohé C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 18 de setembro de 2001;104(12):1419–23.

Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkentin JD. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2004 Jan 9;94(1):110-8. Epub 2003 Dec 1. PMID: 14656927.

Kumar S, Wang G, Liu W, Ding W, Dong M, Zheng N, Ye H, Liu J. Hypoxia-Induced Mitogenic Factor Promotes Cardiac Hypertrophy via Calcium-Dependent and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Mechanisms. *Hypertension.* 2018 Aug;72(2):331-342. Epub 2018 Jun 11. PMID: 29891648.

Dey S, DeMazumder D, Sidor A, Foster DB, O'Rourke B. Mitochondrial ROS Drive Sudden Cardiac Death and Chronic Proteome Remodeling in Heart Failure. *Circ Res.* 20 de julho de 2018;123(3):356–71.

Zhang DY, Anderson AS. The sympathetic nervous system and heart failure. *Cardiol Clin.* fevereiro de 2014;32(1):33–45, vii.

Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, Chibber R, Pagano PJ, Shah AM, et al. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. *Circulation.* 7 de março de 2006;113(9):1235–43.

Zhang Y, Murugesan P, Huang K, Cai H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(3):170–94.

van der Pol A, van Gilst WH, Voors AA, van der Meer P. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail.* 2019 Apr;21(4):425-435. doi: 10.1002/ejhf.1320. Epub 2018 Oct 19.

Zhang G-X, Kimura S, Nishiyama A, Shokoji T, Rahman M, Yao L, et al. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. *Cardiovasc Res.* 1º de janeiro de 2005;65(1):230–8.

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, Lu L-S, Lyu YL, Liu LF, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* novembro de 2012;18(11):1639–42.

Münzel T, Gori T, Keaney JF Jr, Maack C, Daiber A. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur Heart J.* 2015 Oct 7;36(38):2555-64.

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

Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*. 2007 Aug;93(8):903-7.

Zhang Y, Murugesan P, Huang K, Cai H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol*. março de 2020;17(3):170–94.

Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. março de 2004;4(3):181–9.

Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 15;71(2):208-15.

Sztechman D, Czarzasta K, Cudnoch-Jedrzejewska A, Szczepanska-Sadowska E, Zera T. Aldosterone and mineralocorticoid receptors in regulation of the cardiovascular system and pathological remodelling of the heart and arteries. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. dezembro de 2018;69(6).

Mihailidou AS. Aldosterone in heart disease. *Curr Hypertens Rep*. abril de 2012;14(2):125–9.

Catena C, Colussi G, Nait F, Martinis F, Pezzutto F, Sechi LA. Aldosterone and the Heart: Still an Unresolved Issue? *Front Endocrinol [Internet]*. 2014 [citado 1º de agosto de 2021];0. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2014.00168/full>

Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol*. maio de 2010;6(5):261–73.

Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, Patel R, Lutucuta S, Nemoto S, et al. Aldosterone, Through Novel Signaling Proteins, Is a Fundamental Molecular Bridge Between the Genetic Defect and the Cardiac Phenotype of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation*. 16 de março de 2004;109(10):1284–91.

Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Compr Physiol*. julho de 2014;4(3):965–94.

Kritis AA, Gouta CP, Liaretidou EI, Kallaras KI. Latest aspects of aldosterone actions on the heart muscle. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. fevereiro de 2016;67(1):21–30.

Mihailidou AS, Ashton AW. Cardiac effects of aldosterone: does gender matter? *Steroids*. 2014 Dec;91:32-7.

Azibani F, Devaux Y, Coutance G, Schlossarek S, Polidano E, Fazal L, et al. Aldosterone inhibits the fetal program and increases hypertrophy in the heart of hypertensive mice. *PLoS One*. 2012;7(5):e38197.

Nagase M, Fujita T. Role of Rac1-mineralocorticoid-receptor signalling in renal and cardiac disease. *Nat Rev Nephrol*. fevereiro de 2013;9(2):86–98.

Chun T-Y, Pratt JH. Non-genomic effects of aldosterone: new actions and questions. *Trends Endocrinol Metab TEM*. Outubro de 2004;15(8):353–4.

Hayashi H, Kobara M, Abe M, Tanaka N, Gouda E, Toba H, Yamada H, Tatsumi T, Nakata T, Matsubara H. Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens Res*. 2008 Feb;31(2):363-75.

Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, et al. A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell*. 2 de maio de 2008;133(3):462–74.

He BJ, Joiner M-LA, Singh MV, Luczak ED, Swaminathan PD, Koval OM, et al. Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone. *Nat Med*. 13 de novembro de 2011;17(12):1610–8.

Mohammed SF, Ohtani T, Korinek J, Lam CS, Larsen K, Simari RD, Valencik ML, Burnett JC Jr, Redfield MM. Mineralocorticoid accelerates transition to heart failure with preserved ejection fraction via "nongenomic effects". *Circulation*. 2010 Jul 27;122(4):370-8.

Favre J, Gao J, Zhang AD, Remy-Jouet I, Ouvrard-Pascaud A, Dautreux B, et al. Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. junho de 2011;300(6):H2035-2043.

Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotension system. *Am J Hypertens*. 2004 Jul;17(7):597-603.

Chrissobolis S, Drummond GR, Faraci FM, Sobey CG. Chronic aldosterone administration causes Nox2-mediated increases in reactive oxygen species production and endothelial dysfunction in the cerebral circulation. *J Hypertens*. 2014 Sep;32(9):1815-21.

Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. julho de 2006;20(9):1546–8.

Stas S, Whaley-Connell A, Habibi J, Appesh L, Hayden MR, Karuparthi PR, et al. Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling. *Endocrinology*. agosto de 2007;148(8):3773–80.

Michea L, Villagrán A, Urzúa A, Kuntsmann S, Venegas P, Carrasco L, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and prevents oxidative stress in uremic rats. *Hypertens Dallas Tex* 1979. agosto de 2008;52(2):295–300.

Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res*. 30 de agosto de 2013;113(6):739–53.

Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The Sympathetic Nervous System in Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 3 de novembro de 2009;54(19):1747–62.

de Lucia C, Eguchi A, Koch WJ. New Insights in Cardiac β -Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging. *Front Pharmacol*. 2018;9:904.

Ferrara N, Komici K, Corbi G, Pagano G, Furgi G, Rengo C, et al. β -adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. *Front Physiol*. 9 de janeiro de 2014;4:396.

Garlie JB, Hamid T, Gu Y, Ismahil MA, Chandrasekar B, Prabhu SD. Tumor necrosis factor receptor 2 signaling limits β -adrenergic receptor-mediated cardiac hypertrophy in vivo. *Basic Res Cardiol*. novembro de 2011;106(6):1193–205.

Abdelzaher WY, Ahmed SM, Welson NN, Alsharif KF, Batiha GE-S, Labib DAA. Dapsone Ameliorates Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction via Nrf2/ HO-1; TLR4/ TNF- α Signaling Pathways and the Suppression of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis in Rats. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021 [citado 1º de agosto de 2021];0. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.669679/full>

Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Purushothaman S, Curcio A, Gasparri C, et al. Acute beta-adrenergic overload produces myocyte damage through calcium leakage from the ryanodine receptor 2 but spares cardiac stem cells. *J Biol Chem*. 13 de abril de 2007;282(15):11397–409.

Karam S, Margaria JP, Bourcier A, Mika D, Varin A, Bediouné I, et al. Cardiac Overexpression of PDE4B Blunts β -Adrenergic Response and Maladaptive Remodeling in Heart Failure. *Circulation*. 14 de julho de 2020;142(2):161–74.

Zhou L, Miao K, Yin B, Li H, Fan J, Zhu Y, et al. Cardioprotective Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Heart Failure. *Circulation*. 10 de julho de 2018;138(2):181–97.

Ding Y-Y, Li J-M, Guo F-J, Liu Y, Tong Y-F, Pan X-C, et al. Triptolide Upregulates Myocardial Forkhead Helix Transcription Factor p3 Expression and Attenuates Cardiac Hypertrophy. *Front Pharmacol*. 2016;7:471.

Corbi G, Conti V, Russomanno G, Longobardi G, Furgi G, Filippelli A, et al. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Front Physiol*. 2013;4:324.

Kralova E, Doka G, Pivackova L, Srankova J, Kuracinova K, Janega P, et al. L-Arginine Attenuates Cardiac Dysfunction, But Further Down-Regulates α -Myosin Heavy Chain Expression in Isoproterenol-Induced Cardiomyopathy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. outubro de 2015;117(4):251–60.

Yang Q, Cui J, Wang P, Du X, Wang W, Zhang T, et al. Changes in interconnected pathways implicating microRNAs are associated with the activity of apocynin in attenuating myocardial fibrogenesis. *Eur J Pharmacol*. 5 de agosto de 2016;784:22–32.

Xu Q, Dalic A, Fang L, Kiriazis H, Ritchie R, Sim K, et al. Myocardial oxidative stress contributes to transgenic β 2-adrenoceptor activation-induced cardiomyopathy and heart failure. *Br J Pharmacol.* março de 2011;162(5):1012–28.

Saleem N, Goswami SK. Activation of adrenergic receptor in H9c2 cardiac myoblasts co-stimulates Nox2 and the derived ROS mediate the downstream responses. *Mol Cell Biochem.* 1º de dezembro de 2017;436(1):167–78.

Valdés Á, Treuer AV, Barrios G, Ponce N, Fuentealba R, Dulce RA, et al. NOX Inhibition Improves β -Adrenergic Stimulated Contractility and Intracellular Calcium Handling in the Aged Rat Heart. *Int J Mol Sci.* 15 de agosto de 2018;19(8):E2404.