

Vanessa Leite Andrade

A FUNÇÃO DO INOSITOL 1,4,5- TRISFOSFATO (InsP₃) NA HIPERTROFIA CARDÍACA

Orientadora: Prof^ª. Maria de Fátima Leite

Professora Associada – Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientador: Prof. Dawidson Assis Gomes

Professor Adjunto – Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

**Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Vanessa Leite Andrade

A FUNÇÃO DO INOSITOL 1,4,5- TRISFOSFATO (InsP₃) NA HIPERTROFIA CARDÍACA

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientadora: Prof^a. Maria de Fátima Leite

Co-orientador: Prof. Dawidson Assis Gomes

**Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2009**

“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado.”

Isaac Newton

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

- Howard Hughes Medical Institute (HHMI)

Agradeço aos meus pais Afonso Pantuza e Solange Leite, pelo carinho, apoio e incentivo constante em todos os momentos da minha vida.

Ao Frederico Cotta (Fred) por todo amor, paciência, dedicação e incentivo.

Aos meus orientadores Maria de Fátima Leite e Dawidson Assis Gomes pela oportunidade, ensinamentos, conselhos, e amizade.

À Prof^a. Silvia Guatimosim pela colaboração e imensa contribuição neste trabalho.

À Sandhra Carvalho (Sandroca mãezona), por todo carinho, amizade e por fazer meus dias mais alegres!!!

À Michele Rodrigues, pelo carinho, amizade e todo esforço dispensado neste projeto para torná-lo realidade.

Às minhas queridas amigas Cláudia Silva, Carolina Melo e Ana Cristina pelo carinho e apoio.

A toda minha família pelo apoio.

A todos os meus amigos do laboratório de sinalização celular.

À todos do Laboratório Eletrocel, em especial ao Enéas Ricardo e Aline Lara pela atenção.

Agradeço também a Deus por me permitir chegar até aqui!

Índice

Índice

Lista de Abreviaturas	vii
Lista de Figuras.....	ix
Resumo.....	xi
1. Introdução	1
1.1 Aspectos básicos da sinalização do Ca²⁺ intracelular	2
1.2 Sinalização de Ca²⁺ em cardiomiócitos	4
1.3 Sinalização de Ca²⁺ e hipertrofia cardíaca	5
1.4 Sinalização de Ca²⁺ nuclear	9
2. Objetivos	11
3. Material e Métodos	13
3.1 Animais	14
3.2 Cultura primária de cardiomiócitos neonatais	14
3.3 Transfecção dos cardiomiócitos com as construções para tamponar InsP₃..	15
3.4 Western Blot.....	16
3.5 Imunofluorescência.....	17
3.6 Análise Estatística	18
4. Resultados.....	19
4.1 O tratamento com ET-1 induz hipertrofia em Cardiomiócitos.....	20
4.2 ET-1 e as vias de Hipertrofia	22
4.3 Expressão e localização subcelular das construções tamponadoras de InsP₃ nuclear e citosólico	25

5. Discussão.....	38
6. Sumário e Conclusões.....	46
7. Referências Bibliográficas.....	48
8. Anexos	58

Lista de Abreviaturas

AEC	Acoplamento excitação-contração
Ang II.....	Angiotensina II
AraC.....	Citosina B-D-arabinofuranoside
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
ATP.....	Adenosina trifosfato
BNF.....	Fator Natriurético Cerebral
BSA.....	Albumina de soro bovina
Ca ²⁺	Cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de Ca ²⁺
CAMK	Kinase dependente de Calmodulina
CICR.....	Liberação de Ca ²⁺ induzida por Ca ²⁺
Cn.....	Calcineurina
DAG.....	Diacilglicerol
DMEM.....	Meio mínimo essencial de Dulbecco
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
EGTA.....	Ácido etileno glicol-bis (β-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ET-1	Endotelina
FE.....	Fenilefrina
Fluo-4/AM	Fluo-4 aceto-metil-éster
Gs.....	Proteína G estimulatória
HDAC	Histona Deacetilase
HEPES	(N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico])
IICR.....	Liberação de Ca ²⁺ induzida por InsP ₃
InsP ₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato
InsP ₃ R	Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato
ISO.....	Isoproterenol
Kn 92.....	Controle negativo do Inibidor de CaMKII
Kn 93.....	Inibidor de CaMKII

MAPK.....	Proteína cinase ativada por mitógenos
mg.....	Miligrama(s)
MHC.....	Miosina de cadeia pesada
mL.....	Mililitro(s)
mM.....	Milimolar
mRFP.....	Proteína monomérica vermelha
ms.....	Mili segundo(s)
NCX.....	Trocador Na^+/Ca^+
NES.....	Sinal de exclusão nuclear
NFAT.....	Fator Nuclear de Células T ativadas
NLS.....	Sinal de localização nuclear
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma(s) por mililitro
μL	Microlitro(s)
μm	Micrômetro(s)
μM	Micromolar
nM.....	Nanomolar
PBS.....	Solução salina tamponada com fosfato
PLC.....	Fosfolipase C
PKA.....	Proteína cinase A
PKC.....	Proteína cinase C
PMCA.....	Ca^{2+} ATPase de membrana plasmática
RE.....	Retículo endoplasmático
RN.....	Ratos neonatos
ROC.....	Canais operados por receptores
Ry.....	Rianodina
RyR.....	Receptores de rianodina
RS.....	Retículo sarcoplasmático
SERCA.....	Ca^{2+} ATPase do retículo sarco-endoplasmá- tico
u.a.....	Unidades arbitrárias
UV.....	Ultravioleta
VOC.....	Canais operados por voltagem

Lista de Figuras

Figura 1: Mecanismo de ativação de InsP_3Rs via receptores acoplados a proteína G	3
Figura 2: Vias de sinalização hipertrófica no cardiomiócito em resposta a estímulos hormonais	7
Figura 3: Endotelina-1 induz hipertrofia em cardiomiócitos	21
Figura 4: Efeito da Endotelina-1 na via de sinalização Cn/NFAT	23
Figura 5: Efeito da Endotelina-1 na via de sinalização CaMKII/HDAC5	24
Figura 6: Localização subcelular das construções tamponadoras de InsP_3	26
Figura 7: O tamponamento do InsP_3 citosólico inibe parcialmente a resposta hipertrófica induzida por Endotelina-1	27
Figura 8: Efeito do tamponamento do InsP_3 citosólico sobre vias hipertróficas estimuladas por Endotelina-1	29
Figura 9: O tamponamento do InsP_3 nuclear inibe a resposta hipertrófica induzida por Endotelina-1	30
Figura 10: Efeito do tamponamento do InsP_3 nuclear sobre vias hipertróficas estimuladas por Endotelina-1	31
Figura 11: Isoproterenol induz hipertrofia e aumento da expressão de ANP em cardiomiócitos	33
Figura 12: Isoproterenol induz translocação de HDAC5 e NFAT em cardiomiócitos	34
Figura 13: Efeito do tamponamento do InsP_3 nuclear e citosólico sobre a resposta hipertrófica induzida por Isoproterenol	35

Figura 14: Efeito do tamponamento do InsP₃ nuclear e citosólico sobre a via CaMKII/HDAC5 estimulada por Isoproterenol..... 36

Figura 15: Efeito do tamponamento do InsP₃ nuclear e citosólico sobre a via Cn/NFAT estimulada por Isoproterenol..... 37

Figura 16: Vias de sinalização hipertrófica no cardiomiócito em resposta a estímulos neuro-hormonais 45

Resumo

O cálcio (Ca^{2+}) controla uma grande variedade de funções celulares abrangendo respostas de curta duração como contração e secreção, bem como respostas de longa duração como transcrição, divisão e morte celular. Embora não seja estabelecido como um único segundo mensageiro coordena tal diversidade de efeitos celulares, evidências sugerem que padrões espaciais, temporais e de concentração de sinais de Ca^{2+} podem determinar sua especificidade. Por outro lado, o acoplamento excitação-contração (AEC) em cardiomiócitos envolve principalmente a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR) através dos RyRs tipo II. Os RyRs como principal canal de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SR), possuem ampla expressão em cardiomiócitos. Além dos RyRs, vários estudos têm mostrado a presença de InsP_3 Rs e sua funcional capacidade de liberação de Ca^{2+} do SR em miócitos cardíacos. No entanto o papel do InsP_3 no coração ainda é matéria de especulação. Estudos recentes têm sugerido a participação da sinalização de InsP_3 na hipertrofia cardíaca. Com a finalidade de explorar esta questão, utilizamos construções moleculares para manipular seletivamente a sinalização de InsP_3 nuclear (InsP_3 -Spongi-NLS) e citosólico (InsP_3 -Spongi-NES) que são capazes de tamponar seletivamente o InsP_3 no núcleo e no citosol respectivamente. Neste trabalho foi demonstrado que a resposta hipertrófica induzida por Endotelina-1 (ET-1), dependente da liberação de Ca^{2+} induzida por InsP_3 (IICR) em cardiomiócitos é completamente abolida quando o InsP_3 nuclear é tamponado e parcialmente inibida com o tamponamento do InsP_3 citosólico. A resposta hipertrófica também foi induzida por Isoproterenol (ISO) e foi abolida tanto pelo tamponamento do InsP_3 nuclear quanto InsP_3 citosólico. Estes efeitos mediados por InsP_3 envolvem a participação das vias Cn/NFAT e CaMK/HDAC. Estes resultados mostram que sinalização de InsP_3 nuclear é fundamental para indução de hipertrofia. Além disso, demonstramos que o InsP_3 citosólico e nuclear podem ter funções específicas em vias hipertróficas distintas .

1. Introdução

1.1 Aspectos básicos da sinalização do Ca^{2+} intracelular

O Ca^{2+} controla uma grande variedade de funções celulares abrangendo respostas de curta duração como contração e secreção, bem como respostas de longa duração como transcrição, divisão e morte celular (1, 2). Embora não seja estabelecido como o único segundo mensageiro que coordena tal diversidade de efeitos celulares, evidências sugerem que padrões espaciais, temporais e de concentração de sinais de Ca^{2+} podem determinar sua especificidade (2, 19,32,38).

A organela primariamente responsável por estocar e liberar Ca^{2+} em muitas células é o retículo endoplasmático (RE). O RE contém canais especializados de Ca^{2+} que podem ser divididos em duas famílias: os receptores de rianodina (RyRs) e os receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP₃Rs). Cada uma destas famílias parece conter três diferentes isoformas em mamíferos. Estes canais de Ca^{2+} formam grandes estruturas oligoméricas por associação de suas quatro subunidades. As estruturas dos RyRs e InsP₃Rs apresentam uma grande homologia, e esta homologia é marcante nas regiões que podem formar o poro destes canais (3, 4, 5).

Os RyRs são ativados pelo próprio Ca^{2+} e este processo de Ca^{2+} induzindo a liberação de Ca^{2+} (CICR) pode ser desencadeado por duas maneiras: (1) através do acoplamento entre canais operados por voltagem com os canais liberadores do RE, como acontece em miócitos cardíacos e neurônios; (2) ou através da união dos próprios canais liberadores de Ca^{2+} presentes no RE, criando ondas de Ca^{2+} que transmitem a sinalização através das células (6). Por outro lado, os InsP₃Rs, que também constituem uma família de canais responsáveis pela mobilização dos estoques de Ca^{2+} intracelular, requerem a presença de InsP₃ para serem estimulados (Figura 1), mas podem ser modulados pelo Ca^{2+} e por proteínas cinases (7)

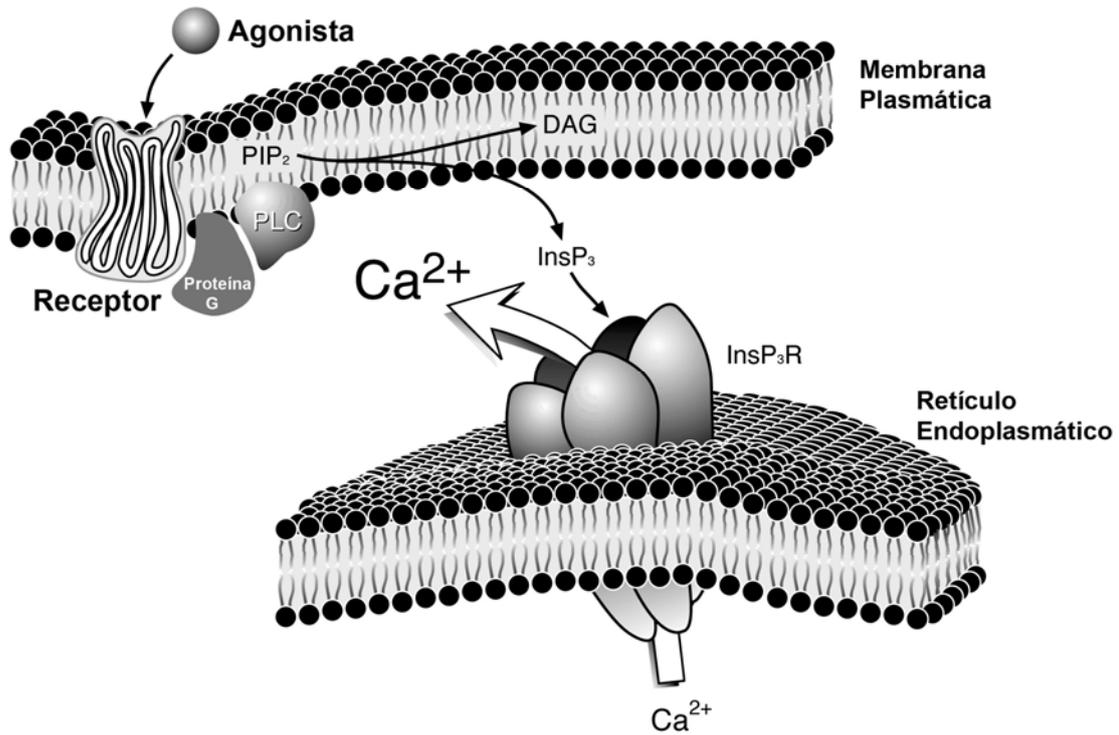


Figura 1: Mecanismo de ativação de InsP_3Rs via receptores acoplados a proteína G
 Os receptores de membrana acoplados a proteína G, quando ativados por ligantes, induzem a hidrólise de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) para formar diacilglicerol (DAG) e InsP_3 , através da fosfolipase C (PLC). Os InsP_3 ligam-se aos InsP_3Rs , presentes na membrana do RE e induzem a liberação de Ca^{2+} para o citosol (7).

Assim como existem vários mecanismos para induzir a liberação de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares, existem também vários mecanismos para retornar o Ca^{2+} intracelular a níveis basais. A extrusão do Ca^{2+} para o espaço extracelular envolve o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e o Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática. Além disso, o Ca^{2+} pode ser recaptado para o RE por uma família de Ca^{2+} ATPases do retículo sarcoplasmático (SERCA). A recaptação pela mitocôndria é mediada pelo Ca^{2+} “uniporter” mitocondrial enquanto a recaptação pelo Golgi é mediada pelo transportador - Ca^{2+} ATPase do tipo P (PMR1/ATP2C1). Além de captar Ca^{2+} , a mitocôndria pode também liberá-lo através do trocador $\text{Na}^+-\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ e em algumas circunstâncias, pelo poro de permeabilidade transitória (8).

Como descrito, existe uma enorme variedade de estoques intracelulares de Ca^{2+} que podem auxiliar na compartimentalização e na especificidade das respostas celulares controladas pelo Ca^{2+} . *Os mecanismos através dos quais o Ca^{2+} pode regular diversas funções celulares continuam controversos, desse modo resolvemos estudar o papel seletivo do aumento de Ca^{2+} citosólico ou nuclear na hipertrofia cardíaca.*

1.2 Sinalização de Ca^{2+} em cardiomiócitos

O íon Ca^{2+} tem um papel fundamental tanto nas propriedades elétricas quanto mecânicas dos miócitos cardíacos, sendo a sua participação no processo de acoplamento excitação-contração em condições fisiológicas já bem conhecida. Entretanto, existem alterações significativas na regulação da sinalização de Ca^{2+} em cardiomiócitos que podem estabelecer tanto disfunção contrátil quanto arritmias, que são características da insuficiência cardíaca e hipertrofia (9).

No processo básico do acoplamento excitação-contração (AEC), após o disparo de um potencial de ação, um aumento tempo-dependente da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), chamado transiente de cálcio, é o responsável por ativar a contração. O transiente de Ca^{2+} é dividido em dois componentes: (A) o influxo de Ca^{2+} e (B) a liberação de Ca^{2+} (10). A despolarização inicial promove a abertura dos canais de Ca^{2+} tipo-L, que resulta em influxo de Ca^{2+} , desencadeando uma liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através dos RyR. Isso aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e desencadeia a contração celular (11).

Para que o relaxamento ocorra, o Ca^{2+} precisa ser retirado do citosol. Esse processo é mediado pela: SERCA, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), Ca^{2+} -ATPase sarcolemal, e pelo transportador de Ca^{2+} mitocondrial (11). Na hipertrofia cardíaca, há tipicamente uma diminuição da atividade da SERCA e um aumento da atividade do NCX. Esses

dois efeitos tendem a aumentar a retirada de Ca^{2+} da célula e diminuir o conteúdo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático.

1.3 Sinalização de Ca^{2+} e hipertrofia cardíaca

O coração é um órgão versátil que modifica sua potência de acordo com o aumento da demanda hemodinâmica. Agudamente, isto é alcançado pelo aumento médio de força e contração. Quando existe necessidade prolongada de um aumento da potência cardíaca, pode-se observar uma resposta hipertrófica compensatória (12). Apesar desta resposta compensatória acontecer, por exemplo, em atletas e grávidas, sob certas condições patológicas, a hipertrofia cardíaca pode se tornar descompensada, manifestando-se em diminuída potência cardíaca, o que pode levar a morte (13).

A maior parte das doenças cardíacas acompanha-se de aumento da massa miocárdica. Como os miócitos cardíacos são células com possibilidade extremamente restrita de se dividirem na vida adulta, o processo de aumento da massa miocárdica se dá por hipertrofia. A hipertrofia cardíaca é uma resposta adaptativa do coração a várias condições patológicas como hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio e distúrbios endócrinos. Apesar de diversos estímulos levarem ao desenvolvimento de hipertrofia, a resposta molecular frente a estas variadas situações é geralmente padronizada e determina o aumento do tamanho da célula e da síntese protéica, reestruturação do sarcômero e ativação de protooncogenes. Nas hipertrofias patológicas, alguns aspectos relacionados á resposta hipertrófica são semelhantes às etapas em que ocorre o desenvolvimento do coração durante o período fetal ou perinatal, sendo por isso denominadas “reprogramação fetal” (14). O estímulo hipertrófico resulta em uma reprogramação da expressão de vários genes que codificam proteínas como α -miosina de cadeia pesada (MHC), α - actina esquelética, Fator Natriurético Atrial (ANF) e Fator

Natriurético Cerebral (BNP). A MHC e α -actina esquelética são proteínas contráteis nas quais mudanças de composição determinam alterações na capacidade contrátil do miocárdio, podendo levar a diminuição na velocidade de encurtamento dos sarcômeros observada no miocárdio hipertrofiado.

Além do aumento da expressão de proteínas contráteis, a hipertrofia cardíaca patológica, como citado anteriormente, é também caracterizada por alterações na expressão de genes de proteínas não contráteis, como ANF e BNP, genes relacionados com o metabolismo energético (subunidade M da lactato desidrogenase e subunidade β da creatina quinase), da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e de múltiplas vias intracelulares que envolvem GTPases, quinases ativadas por mitógenos e fatores de transcrição como MEF2, Fator Nuclear de Células T ativado (NFAT), GATA 4 e Histonas Deacetilases (HDACs) (14, 15).

O aumento do Ca^{2+} intracelular pode ativar várias proteínas, e entre estas se encontram proteínas do repertório hipertrófico. Vários fatores humorais como a endotelina I (ET-1), angiotensina II (Ang II) e fenilefrina (FE) desencadeiam hipertrofia cardíaca associada a modificações no repertório da expressão genética. Estes hormônios atuam em receptores de membrana, como por exemplo os receptores β -adrenérgicos (β -AR) e α 1-adrenérgicos (α 1-AR), causando um aumento do Ca^{2+} intracelular e ativação de várias proteínas (16, 17).

A estimulação dos receptores β -adrenérgicos (β -AR) ativa a adenilato-ciclase pela interação com a proteína G estimulatória (Gs), a qual desencadeia cascatas intracelulares que ativam proteínas cinases A (PKA), estimulando também a p38-MPAK14. A estimulação crônica dos β -AR pela administração de isoproterenol (ISO) induz o aumento da massa cardíaca, dos cardiomiócitos, da fibrose miocárdica e da disfunção progressiva, o que culmina com a insuficiência cardíaca. Agudamente, a

ativação dos α_1 -AR aumenta a contratilidade mediada pela ativação da proteína Gq. Esta provoca a ativação da PLC, que estimula hidrólise de fosfatidil inosítois da membrana, gerando dois segundos mensageiros, o DAG e o InsP_3 . O InsP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, e sob condições patológicas pode induzir hipertrofia em cardiomiócitos (Figura 2). Como a hipertrofia se manifesta através de interações sinérgicas entre múltiplas vias de sinalização (18), é possível que o Ca^{2+} coordene vários elementos durante a indução de hipertrofia.

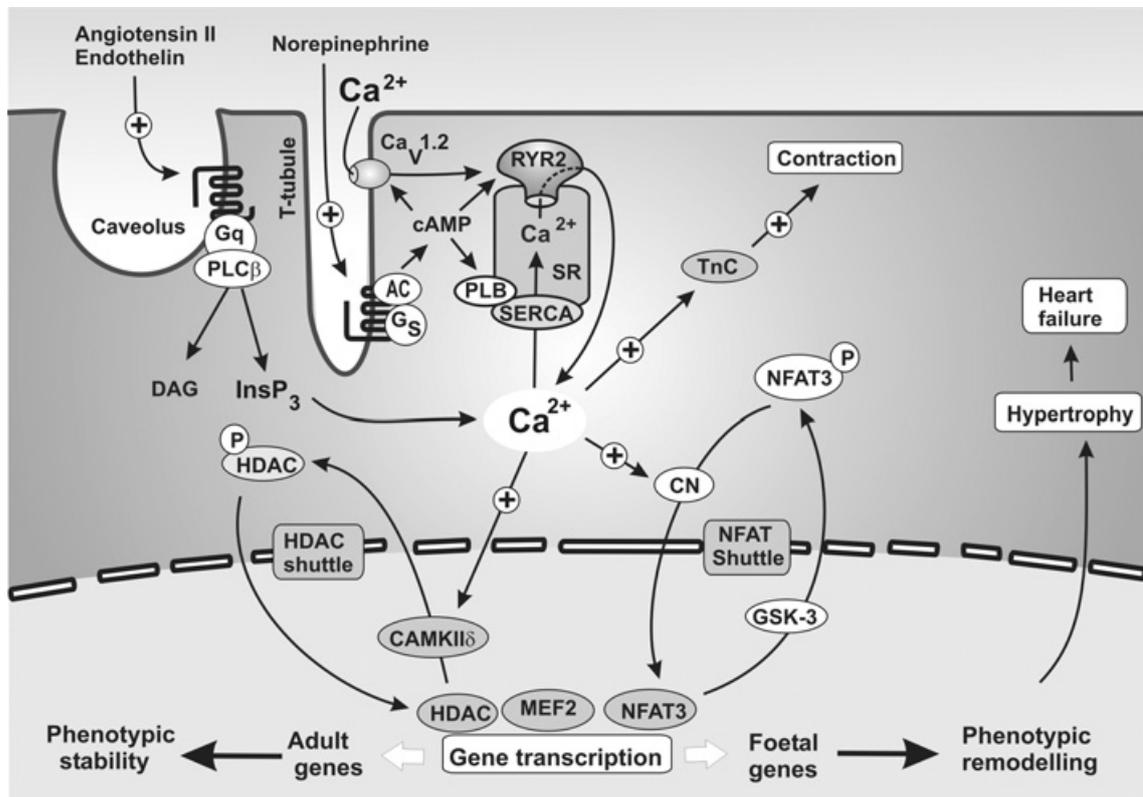


Figura 2: Vias de sinalização hipertrófica no cardiomiócito em resposta a estímulos hormonais

Células cardíacas obtêm sinais de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático através da abertura dos canais RyR tipo 2. A formação de InsP_3 induzida por endotelina ou angiotensina II podem também contribuir para o sistema de sinalização de Ca^{2+} cardíaco. O Ca^{2+} ativa a contração por se ligar a troponina C (TnC), e também ativa a transcrição de genes das vias NFAT e HDAC. O aumento da sinalização de Ca^{2+} , induz a transcrição de genes fetais, resultando em um fenótipo de remodelamento e doença cardíaca. AC, adenilato ciclase; CAMKII δ , Ca^{2+} / proteína kinase II δ dependente de calmodulina; CN, calcineurina; DAG, diacilglicerol; GSK-3 glicogênio kinase sintase 3; MEF2, fator de crescimento do miócito 2; PLB, fosfolipase B; PLC β , fosfolipase C β ; SERCA, Ca^{2+} ATPase do retículo sarco/endoplasmático (19).

Como já mencionado anteriormente, o fator de transcrição NFAT participa de uma das múltiplas vias intracelulares envolvidas no processo hipertrófico. A calcineurina (Cn), que é uma enzima cuja atividade foi caracterizada primeiramente nas células T do Sistema Imunológico, exerce o seu principal papel ativando fatores transcricionais, como o NFAT, via translocação nuclear (20, 21).

A Cn é um heterodímero composto de duas subunidades: Calcineurina A (CnA), subunidade catalítica, que se une à calmodulina e está fortemente associada a uma subunidade reguladora que se liga ao Ca^{2+} e à Calcineurina B (CnB) (22, 23). Em mamíferos, são conhecidas 3 isoformas de CnA ($A\alpha$, $A\beta$ e $A\gamma$) e duas isoformas de CnB (CnB1 e CnB2) (24).

Estudos com roedores, geneticamente modificados, têm demonstrado que a Cn é importante em processos de desenvolvimento vascular e cardíaco e no desenvolvimento, crescimento e diferenciação do músculo esquelético, bem como ativação de linfócitos T (25, 26, 27). Todos estes processos são catalisados juntamente à família de fatores de transcrição NFAT, composta por 4 membros denominados NFATc1-c4, sendo esta via também considerada cálcio-dependente. O envolvimento da atividade da Cn-NFATs na hipertrofia cardíaca já é bem estabelecido (21, 24, 25).

A resposta hipertrófica se manifesta através de interações sinérgicas entre múltiplas vias de sinalização. A fosforilação de HDACs por cinase dependente de calmodulina II (CaMKII), downstream da via $InsP_3/Ca^{2+}/CaM$, também tem sido mostrada como um importante regulador de genes hipertróficos (16). Existem múltiplas HDACs que se dividem em quatro classes baseadas na similaridade de influenciar repressores transcricionais. Classe I (HDACs 1, 2, e 8), classe II (4, 5, 6, 7, 9 e 10), classe III (SirT1-7) e classe IV (HDACs 11). A Classe II se divide em Iia e Iib (19). Esta classe possui a extensão amino-terminal de aproximadamente 500 aminoácidos

altamente conservados e atuam como repressores endógenos da hipertrofia cardíaca. Esta classe é recrutada por elementos regulatórios em genes pro-hipertroficantes através de uma sequência específica de DNA ligada a fatores de transcrição, incluindo MEF-2. A superexpressão ectópica da classe II (HDACs 4, 5, ou 9) em cultura de miócitos ventriculares neonatais suprime a transcrição dependente de MEF-2 e a hipertrofia cardíaca dependente de agonista (19).

Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que o Ca^{2+} nuclear exerce papel importante na alteração da expressão de genes hipertroficantes (28) Um trabalho recente mostrou que ET-1 induz hipertrofia por causar aumento de Ca^{2+} nuclear e consequente ativação da via CnA/ NFAT (12). Em conjunto, estes resultados sugerem que a sinalização de Ca^{2+} mediada por InsP_3 em cardiomiócitos está envolvida na hipertrofia celular. É sabido que cardiomiócitos expressam InsP_3R tanto em região perinuclear quanto nuclear (12, 28). No entanto, o papel relativo de InsP_3 citosólico e nuclear na hipertrofia cardíaca ainda não foi diretamente abordado.

1.4 Sinalização de Ca^{2+} nuclear

Os padrões de sinalização de Ca^{2+} podem variar em diferentes regiões e já foi extensivamente demonstrado que os aumentos do Ca^{2+} no núcleo têm efeitos biológicos específicos, que diferem dos efeitos do aumento do Ca^{2+} citosólico (9, 28, 29, 30, 31, 32, 33). Entretanto, os mecanismos e vias que promovem aumentos localizados nos níveis do Ca^{2+} nuclear ainda não estão totalmente definidos.

O núcleo é um compartimento que possui funções distintas na célula, fisicamente separado do citosol por uma bicamada lipídica, nomeada de envelope nuclear (34, 35). Este envelope contém poros que permitem o transporte de moléculas e íons entre citosol e o núcleo. Foi inicialmente proposto que a sinalização de Ca^{2+}

poderia ocorrer por difusão do Ca^{2+} citosólico para o núcleo através do poro nuclear (36, 37, 38, 39). Este mecanismo explica o aumento do Ca^{2+} nuclear observado sobre certas condições, mas isto não explica a regulação independente de sinais de Ca^{2+} citosólicos e nucleares.

É sabido que o lúmen do envelope nuclear é contínuo com o lúmen do RE (40, 41). Assim, o envelope nuclear é capaz de estocar Ca^{2+} e liberá-lo para o nucleoplasma (42). Uma outra fonte de armazenamento de Ca^{2+} nuclear é o retículo nucleoplasmático, que também é contínuo com o lúmen do RE (33). Já foi demonstrado, tanto em células epiteliais (células hepáticas), quanto em células excitáveis (cardiomiócitos e músculo esquelético), que o retículo nucleoplasmático expressa canais de Ca^{2+} como InsP_3R e/ou RyR , e que estes canais são funcionais (33, 43). Além disso, foi observado que os InsP_3R induzem liberação de Ca^{2+} em núcleo isolado de células de fígado (44) e também em célula intacta, na qual os InsP_3R s citosólicos foram bloqueados (38). Tais observações demonstraram que os sinais de Ca^{2+} podem ser gerados no núcleo independente dos estoques e sinais de Ca^{2+} citosólicos.

Estudos recentes do nosso grupo mostraram que a sinalização de Ca^{2+} induzida por receptores de tirosina cinases (RTKs), como c-MET, ocorrem através da formação direta de InsP_3 no núcleo, sugerindo um elaborado nível de regulação no qual o InsP_3R nuclear pode ser ativado pela produção subcelular de InsP_3 (45). Além disso, já foi demonstrado que o receptor de insulina pode translocar para o núcleo de hepatócitos, e seletivamente hidrolizar PIP_2 nuclear, gerando InsP_3 e induzindo sinais de Ca^{2+} no núcleo. Estes dados mostram que InsP_3 pode ser formado diretamente no núcleo e sugerem papel seletivo de InsP_3 citosólico e nuclear em funções celulares. *Neste estudo investigamos se o InsP_3 nuclear, pode exercer funções distintas e independentes do InsP_3 citosólico em cardiomiócitos.*

2. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar o papel relativo do InsP₃ citosólico e nuclear na hipertrofia cardíaca.

Objetivos Específicos

- Investigar o efeito do tamponamento seletivo do InsP₃ citosólico ou nuclear sobre a resposta hipertrófica induzida por ET-1.
- Investigar a participação do InsP₃ nuclear e citosólico nas vias de sinalização pro-hipertróficas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos neonatos (RN) Wistar de 3 a 5 dias de idade, machos, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG. O modelo experimental de hipertrofia foi realizado com o tratamento crônico com Endotelina-1 e Isoproterenol. O protocolo de número 249/08 para este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais. (Anexo 1)

3.2 Cultura primária de cardiomiócitos neonatais

Para cada experimento, 12 ratos neonatos Wistar foram sacrificados por decapitação e submetidos a toracotomia mediana. O coração ainda contraindo foi colocado imediatamente em um tubo de 50 mL cônico contendo Solução Salina Balanceada Hanks (HBSS) à 4°C. Para obtenção dos cardiomiócitos foi utilizado um Kit para extração de cultura primária de cardiomiócitos obtido da Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ). No fluxo laminar os corações foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 mm³ e lavados com HBSS para remoção de hemácias. Os fragmentos de coração foram colocados em um tubo de 50 mL contendo tripsina 100 µg/mL, diluída em HBSS, homogeneizados delicadamente e incubados à 2-8°C por 16-20hs. Após a incubação com tripsina os pedaços de tecido foram dissociados enzimaticamente com colagenase 300 units/ml, por 30 a 40 minutos e então dissociados mecanicamente com uma Pipeta sorológica. As células foram ressuspendidas em “Dulbeccos’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM), adicionado de 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 0.25 µg/ml anfotericina-b e 10% soro fetal bovino (FBS). Estes reagentes foram adquiridos da Gibco (Grand Island, NY). Para atenuar a contaminação por fibroblastos, foi feito o pré-plaqueamento destas células em

garrafas por 2 horas. Após esta etapa, sobrenadante foi coletado e as células então plaqueadas em garrafas ou lamínulas de 22 x 22 mm pré-tratadas com fibronectina (10 µg/ml), Sigma (St. Louis, MO) e mantidas a 37° C em incubadora de 5% CO₂ por 48 horas. Em seguida o meio de cultura foi trocado por meio de cultura contendo 20 µg/ml de citosina B-D-arabinofuranoside (ARA-C), Sigma (St. Louis, MO). O ARA-C incorpora ao DNA e inibe a replicação celular por formar complexos de clivagem com a topoisomerase I resultando em fragmentação, porém não inibe a síntese de RNA, diminuindo assim a contaminação da cultura por outras células que não forem cardiomiócitos. Os cardiomiócitos foram utilizados no quarto-quinto dia de cultura; havendo neste momento aproximadamente 5-6 x 10⁴ cardiomiócitos por placa de cultura, correspondendo a aproximadamente 95 % da população total de células.

3.3 Transfecção dos cardiomiócitos com as construções para tamponar InsP₃.

As construções para tamponar InsP₃ foram desenvolvidas como descrito anteriormente (45). Resumidamente, o domínio de ligação ao InsP₃ (resíduos 224-605) do receptor de InsP₃ tipo I humano foi fusionado à proteína fluorescente vermelha monomérica (mRFP) e à sequência de localização nuclear, para gerar o vetor de expressão capaz de tamponar o InsP₃ no núcleo (InsP₃ Spongi NLS). A sequência sinal de exclusão nuclear (NES) derivada da MKK1 foi subclonada no domínio de ligação ao InsP₃ fusionado a mRFP para gerar o vetor de expressão capaz de tamponar o InsP₃ no citoplasma (InsP₃ Spongi NES).

Os cardiomiócitos foram transfectados no terceiro dia de cultura com as construções tamponadoras de InsP₃ utilizando 10 µl de Lipofectamina 2000 (Sigma) e 2 µg de DNA por placa de 30 mm de diâmetro (3 x 10⁵ células).

3.4 Western Blot

Os cardiomiócitos foram tratados com ET-1 10nM e após 24 horas foram rapidamente lavados com solução salina tamponada com fosfato sem Ca^{2+} ou Mg^{2+} (PBS). Posteriormente, as proteínas foram solubilizadas em tampão de lise contendo 50 mM pirofosfato de sódio, 50 mM NaF, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 , 10 mM HEPES, pH = 7,4, 0,5% Triton 100, 1:100 de 100 mM PMSF em isopropanol, 1:1000 de 1 mg/mL leupeptina, 1:1000 de 1 mg/mL aprotinina. Todos estes reagentes foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford(46), e diluídas (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão de amostra (4 X Tris HCl/SDS, pH=6,8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0,6% β -mercaptoetanol, azul de Bromofenol) para separação em gel de SDS-PAGE (sódio dodecil lauril sulfato-poliacrilamida) em concentração de 10%. Todos esses reagentes foram obtidos da Amersham (Buckinghamshire, UK). Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, obtida da Bio-Rad (Philadelphia, PA). A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau obtida da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Em seguida a membrana foi lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (Tampão salino de Tris-Tween 20 com 5% de leite desnatado). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas, por 12 horas em uma temperatura de 4°C, com o anticorpo primário específico. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti- β -actina (1:5000), obtido da Sigma (St. Louis, MO), anti-Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) (1:5000) obtido da Affinity BioReagents (Golden, CO). Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão salino de Tris-Tween 20, obtido da Sigma (St. Louis, MO), contendo 0,2% de Tween 20 (TBST, 15 minutos por quatro vezes) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP

1:5000, Goat anti-rabbit IgG-HPR) obtidos da Sigma (St. Louis, MO). As membranas foram novamente lavadas em TBST (15 minutos por quatro vezes). As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus) obtido da Amersham Biotechnology (Buckinghamshire, UK).

3.5 Imunofluorescência

As imunofluorescências foram realizadas como descrito anteriormente (28, 33). Resumidamente, os cardiomiócitos foram transfectados com as construções InsP_3 spongiNLS ou InsP_3 spongiNES e após 48 horas foram rapidamente lavados com PBS. Todas as soluções foram preparadas em PBS. Posteriormente, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4%, durante 15 minutos, e permeabilizadas com solução contendo 0,5% de triton-X. As células foram incubadas com solução de bloqueio (PBS contendo 1% de BSA, 0,5% triton X-100, 5% de soro de cabra) por 1 hora. Após o bloqueio, as células foram incubadas por 2 horas em PBS 1% BSA contendo um dos seguintes anticorpos primários: anti α -actinina (1:200), HDAC5 (1:100), ANP (1:100), overnight à 4°C. Ambos anticorpos foram obtidos da Cell Signaling (Boston, MA). As células foram lavadas três vezes (5 minutos cada) em PBS e incubadas por 1 h em PBS 1% BSA contendo anticorpo secundário conjugado Alexa 488 (1:500), Alexa 633 (1:500) da Molecular Probes (Eugene, OR) e DAPI (1:25). As construções foram observadas através do laser 543. Controles negativos foram incubados apenas com anticorpo secundário. As células foram lavadas novamente com PBS e as lamínulas foram montadas com Hydromount da National diagnostics (Patton Drive, Atlanta). As imagens foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 meta usando a objetiva de imersão à óleo com aumento de 63X (1,4 AN). As imagens de imunofluorescência foram adquiridas mantendo-se a íris sempre inferior a um A.U.

3.6 Análise Estatística

Todos os dados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes e foram expressos pela média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com o Programa PRISM statistical software (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando one-way ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1 O tratamento com ET-1 induz hipertrofia em Cardiomiócitos

A hipertrofia em cardiomiócitos foi induzida através do tratamento com 10nM de ET-1 por 24hs. Após o tratamento foram realizadas imunofluorescências utilizando anticorpo anti- α -actininina conjugado com alexa 633 (em vermelho) para identificação dos miócitos cardíacos e o núcleo foi marcado com Dapi. As imagens foram adquiridas através do microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta. A medida da área de superfície foi realizada utilizando-se o software LSM 5. Observou-se que o tratamento com ET-1 induziu um aumento de $54,3 \pm 6,87\%$ da área de superfície em cardiomiócitos quando comparado ao grupo controle. (Figura 3a-b). Um dos principais marcadores utilizados em respostas hipertróficas é o Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) (47). Este marcador é bem caracterizado pela literatura e tem sua expressão perinuclear é aumentada na presença de ET-1 (12). A expressão do ANP também foi avaliada por imunofluorescência utilizando anticorpo anti-ANP conjugado com alexa-488 (em verde) após tratamento com 10nM de ET-1. As mesmas células foram marcadas com o anticorpo anti- α -actininina conjugado com alexa 633 e a marcação nuclear foi feita com Dapi. O tratamento com ET-1 aumentou a expressão de ANP na região perinuclear (Figura 3d). Este resultado foi confirmado por Western blot no qual foi observado um aumento na expressão do ANP em miócitos cardíacos tratados com ET-1 quando comparado ao grupo controle (Figura 3c).

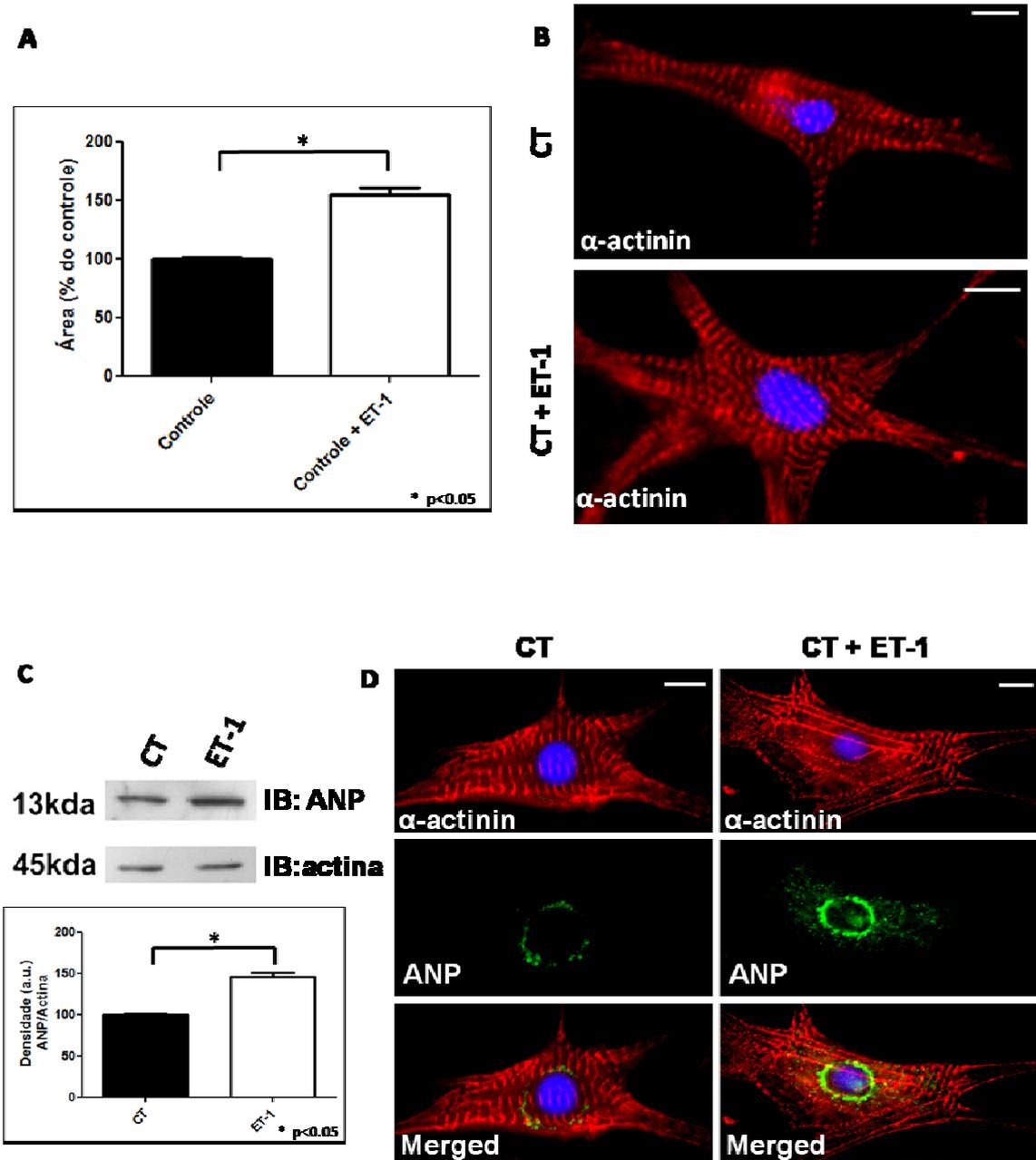


Figura 3: Endotelina-1 induz hipertrofia em cardiomiócitos

(a) Efeito do tratamento com 10nM de ET-1 sobre a medida da área de cardiomiócitos. (b) Imunofluorescência utilizando anti- α -actinina conjugado com alexa 633 (em vermelho) e núcleo marcado com Dapi (Azul). (c) Análises de western blot mostram a expressão do ANP em cardiomiócitos antes e após a estimulação com ET-1. (d) Imagens confocais obtidas após marcação com anti-ANP (verde), anti- α -actinina (vermelho) e Dapi (azul). Todos os grupos têm número de células ≥ 23 e $n=3$ de experimentos realizados em dias diferentes. * $p < 0,05$. Barra = $10\mu\text{m}$

4.2 ET-1 e as vias de Hipertrofia

Como o envolvimento da via Calcineurina/Fator de Células T ativadas (Cn/NFAT) na hipertrofia cardíaca é bem descrito pela literatura, investigou-se a relativa contribuição desta via no desenvolvimento da resposta hipertrófica induzida por ET-1. Através de imunofluorescência foi observada a translocação do NFAT (verde) para o núcleo em cardiomiócitos tratados com 10nM de ET-1 (Figura 4 b). Realizamos também a medida da área de superfície em cardiomiócitos tratados com ciclosporina (CSA), um inibidor da calcineurina Cn, e estimulados com ET-1. Observou-se que o tratamento com ciclosporina (CSA) reduz a hipertrofia induzida por ET-1 em $40,9 \pm 9,36\%$ (Figura 4a).

O processo hipertrófico envolve várias vias de sinalização e a via da Calmodulina Cinase tipo II/ Histona deacetilase tipo 5 (CaMKII/HDAC5) também já foi demonstrada participar deste processo. Para investigar a relativa contribuição desta via na resposta hipertrófica induzida por ET-1 foi realizada imunofluorescência e observou-se translocação de HDAC5 induzida por ET-1 para o citoplasma (Figura 5b). Também foi realizada a medida da área de superfície em cardiomiócitos tratados com Kn 93, um inibidor da CaMKII e seu controle negativo Kn 92 e estimulados com ET-1. Observou-se que o tratamento com Kn 93 reduz a hipertrofia induzida por ET-1 em $49,5 \pm 3,33\%$ (Figura 5a).

Em conjunto, estes resultados mostram que o tratamento com ET-1 induz hipertrofia e promove a translocação de HDAC5 e NFAT em cardiomiócitos. Estas duas vias de sinalização são mediadas por InsP_3 (Figura 4 -5). Para investigar o relativo papel do InsP_3 nuclear e citosólico nestas vias, foram utilizadas construções capazes de tamponar InsP_3 seletivamente no núcleo ou no citosol.

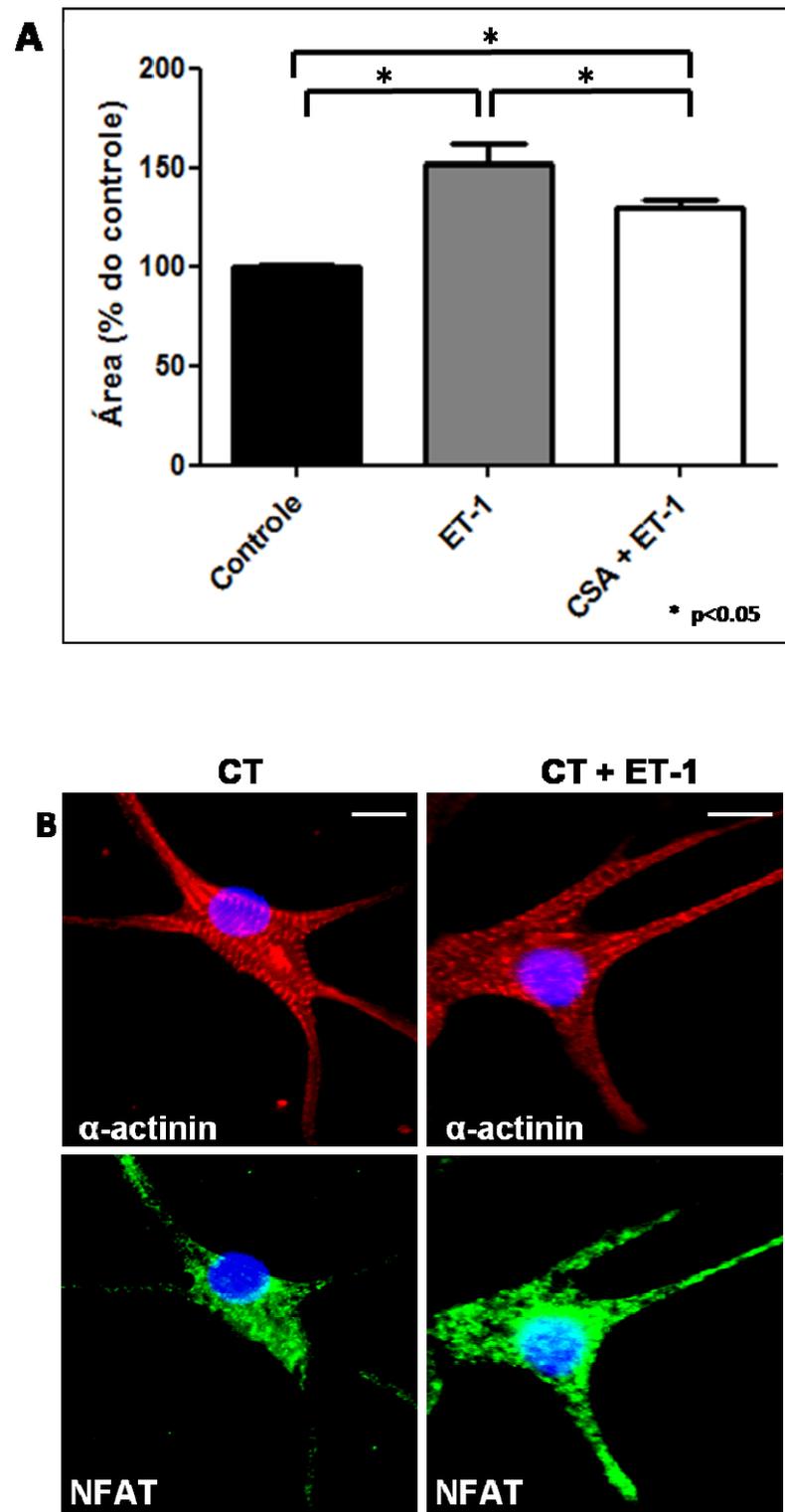


Figura 4: Efeito da Endotelina-1 na via de sinalização Cn/NFAT

(a) Efeito do tratamento com 2 μ M de ciclosporina (CSA) sobre a hipertrofia induzida por 10 nM de ET-1. (b) Translocação de NFAT induzida por 10nM de ET-1. *p <0,05 vs Controle. Núcleo marcado com Dapi em azul. Todos os grupos têm número de células \geq 19. n=3 de experimentos realizados em dias diferentes. Barra =10 μ m

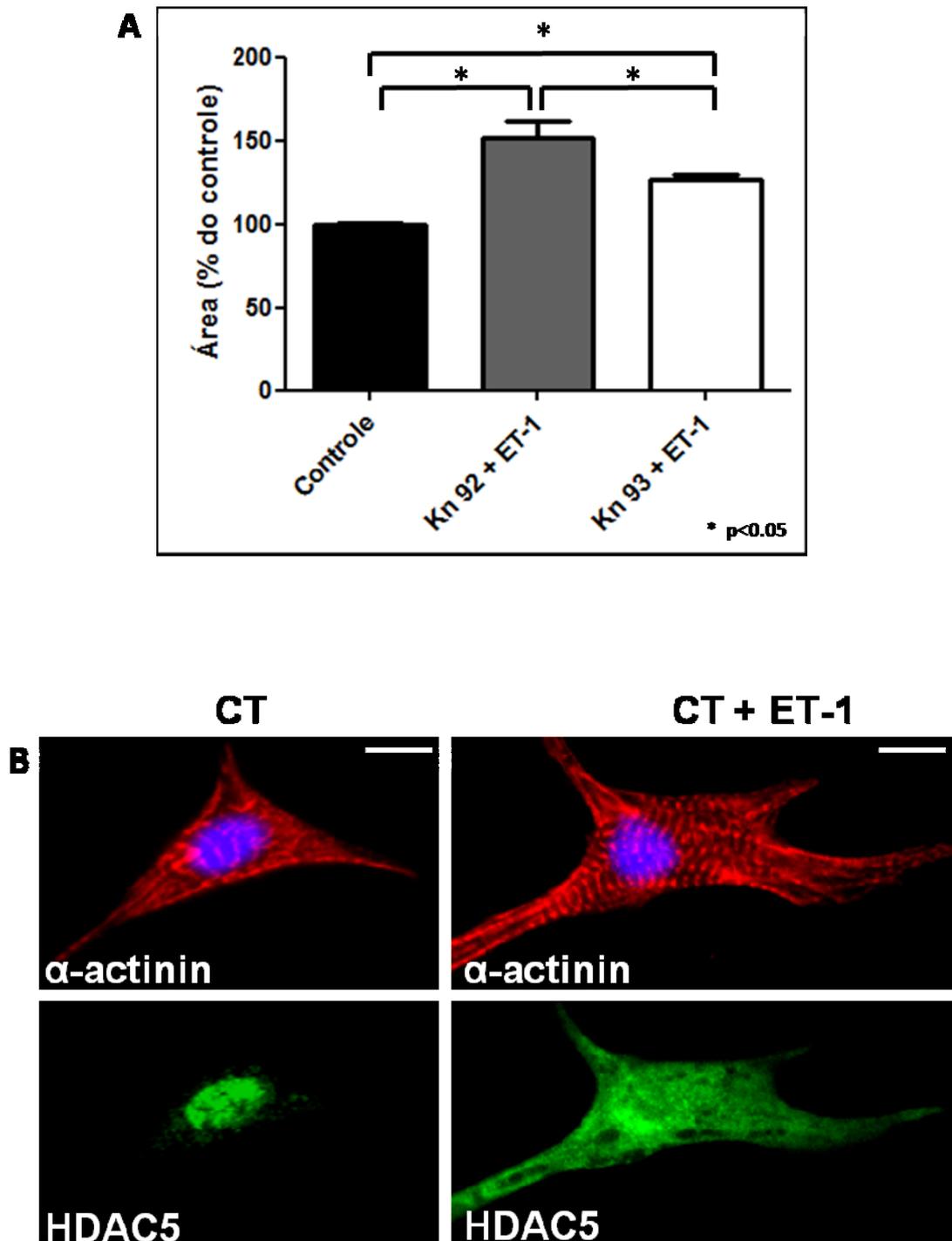


Figura 5: Efeito da Endotelina-1 na via de sinalização CaMKII/HDAC5

(a) Efeito do tratamento com 0,5 μ M de Kn93 sobre a hipertrofia induzida por ET-1 (b) Imagens confocais mostrando translocação de HDAC5 induzida por ET-1. * $p < 0,05$ vs Controle. Núcleo marcado com Dapi em azul. Todos os grupos têm número de células ≥ 15 . $n=3$ de experimentos realizados em dias diferentes. Barra = 10 μ m

4.3 Expressão e localização subcelular das construções tamponadoras de InsP₃ nuclear e citosólico

O domínio de ligação ao InsP₃ (resíduos 224-605) do receptor de InsP₃ tipo I humano foi fusionado à proteína fluorescente vermelha monomérica (mRFP) e à sequência de localização nuclear (NLS), gerando o vetor de expressão que tampona o InsP₃ no núcleo, chamado de InsP₃ spongi NLS. A sequência sinal de exclusão nuclear (NES) derivada da MKK1 foi subclonada no domínio de ligação ao InsP₃ fusionado à mRFP para gerar o vetor de expressão capaz de tamponar o InsP₃ no citoplasma, denominado InsP₃ spongi NES (45). Para demonstrar a especificidade das construções tamponadoras de InsP₃ nuclear e citosólico, a mRFP foi utilizada para observar a localização subcelular em cardiomiócitos. E através de microscopia confocal verificou-se a correta localização subcelular das construções mostrando a especificidade dos sinais de localização utilizados neste modelo celular (Figura 6).

Para verificar o efeito do InsP₃ nuclear e citosólico na resposta hipertrófica foi realizada a transfecção dos cardiomiócitos com as construções tamponadoras de InsP₃, promovendo desta forma o tamponamento seletivo do InsP₃ nuclear ou citosólico. Após 48hs de transfecção, os miócitos cardíacos foram estimulados com ET-1 (10nM) por 24hs. Em seguida foi realizada a medida da área de superfície dos cardiomiócitos individualmente. A figura 7 mostra que o tamponamento do InsP₃ citosólico foi capaz de inibir parcialmente a hipertrofia induzida por ET-1 ($28,3 \pm 6,06\%$). Em seguida realizou-se a análise da expressão de ANP e foi observada uma redistribuição subcelular dos grânulos de ANP da região perinuclear em direção à periferia da célula quando o InsP₃ nuclear foi tamponado.

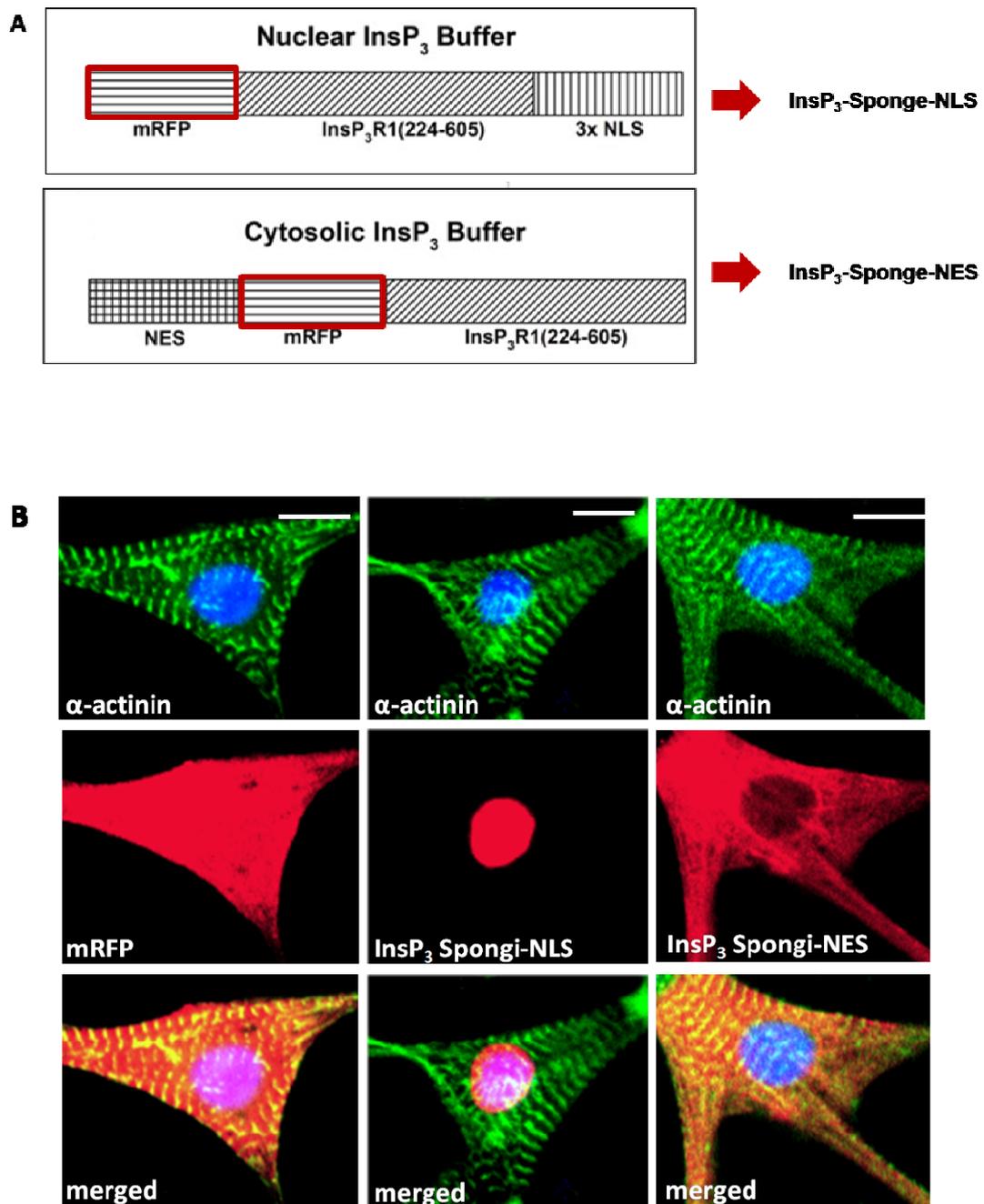


Figura 6: Localização subcelular das construções tamponadoras de InsP₃

(a) Representação esquemática das construções tamponadoras de InsP₃ fusionadas a mRFP e ao sinal de localização nuclear (NLS), ou ao sinal de exclusão nuclear (NES). (b) Construções tamponadoras de InsP₃ corretamente localizadas no núcleo e citosol de cardiomiócitos. Núcleo marcado com Dapi em azul. Como controle, a transfecção foi feita somente com a mRFP, o qual não apresenta efeito tamponante. n=3 de experimentos realizados em dias diferentes Barra =10 μ m.

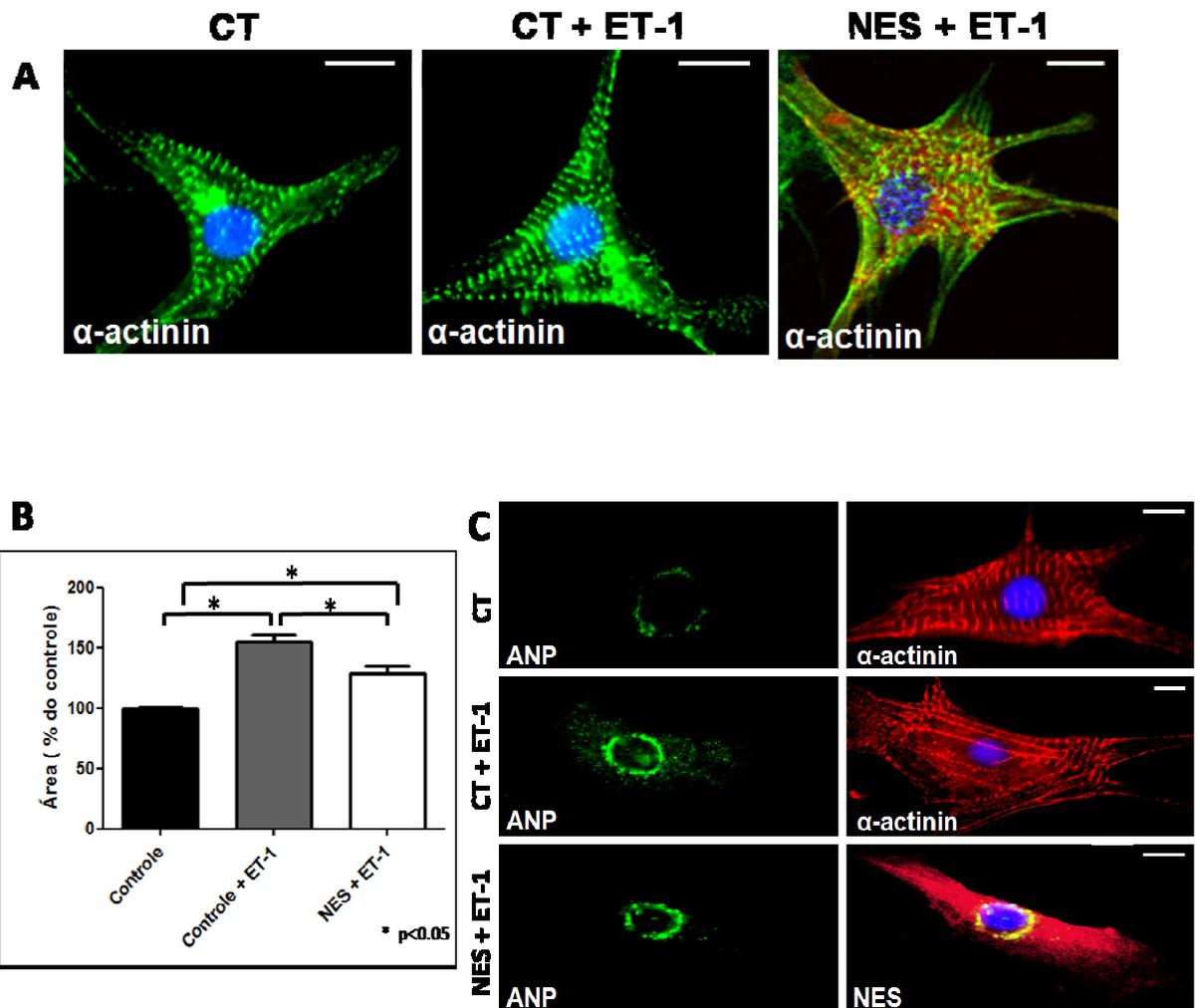


Figura 7: O tamponamento do InsP_3 citosólico inibe parcialmente a resposta hipertrófica induzida por Endotelina-1

(a) Imagens confocais representativas de cardiomiócitos Controle (CT), Controle + ET-1 (CT + ET-1) e transfectado com InsP_3 -Spongi-NES (NES). (b) Efeito do tamponamento do InsP_3 citosólico na medida da área de superfície em cardiomiócitos submetidos ao tratamento com ET-1. (c) Expressão de ANP em cardiomiócitos CT, CT + ET-1 e NES + ET-1. Núcleo marcado com Dapi em azul. Todos os grupos têm número de células ≥ 15 . *p < 0,05 vs controle. n=3 de experimentos realizados em dias diferentes Barra = 10 μm

Para investigar qual a possível via utilizada pelo InsP_3 citosólico para inibir parcialmente a hipertrofia induzida por ET-1 foram realizadas imunofluorescências utilizando anticorpos anti-NFAT ou anti-HDAC5 (verde). O núcleo foi marcado com Dapi e como marcador para cardiomiócitos, foi utilizado o anticorpo anti- α -actininina conjugado com alexa 633 (vermelho). Foi observado que: (a) o tamponamento do InsP_3 citosólico inibe a translocação do NFAT induzida por ET-1, mas (b) não impede a translocação de HDAC5 induzida por ET-1 (Figura 8).

Em seguida foi avaliado o efeito do tamponamento do InsP_3 nuclear sobre a resposta hipertrófica induzida por ET-1. Através da medida da área de superfície foi observado que a hipertrofia induzida por ET-1 é completamente revertida quando o InsP_3 nuclear é tamponado (Figura 9a-b). A expressão de ANP também foi analisada e observou-se uma redistribuição citosólica de ANP (Figura 9c).

Para investigar qual a possível via utilizada pelo InsP_3 nuclear para inibir a hipertrofia induzida por ET-1 foram realizadas imunofluorescências utilizando anticorpo anti- α -actininina conjugado com alexa 633 (vermelho), anti-NFAT ou anti-HDAC5 (verde) e o núcleo foi marcado com Dapi (azul). Foi observado que o tamponamento do InsP_3 nuclear inibe tanto a translocação do NFAT quanto da HDAC5 induzidas por ET-1 (Figura 10 a-b).

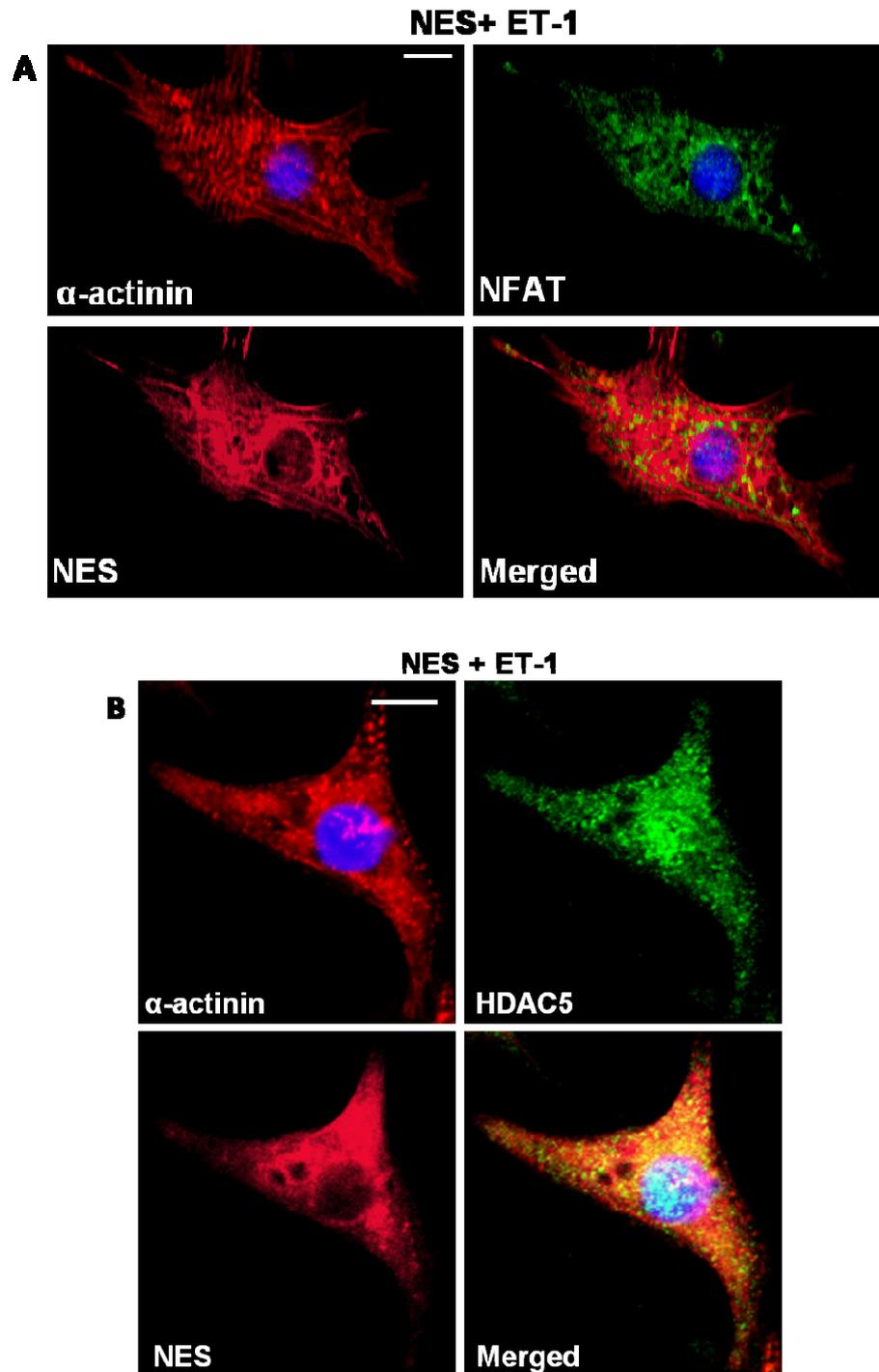


Figura 8: Efeito do tamponamento do InsP_3 citosólico sobre vias hipertróficas estimuladas por Endotelina-1

(a) O tamponamento do InsP_3 citosólico inibe a translocação do NFAT induzida por ET-1. (b) A translocação de HDAC5 induzida por ET-1 é preservada quando o InsP_3 citosólico é tamponado. Núcleo marcado com Dapi em azul. $n=3$ de experimentos realizados em dias diferentes. Barra = $10\mu\text{m}$

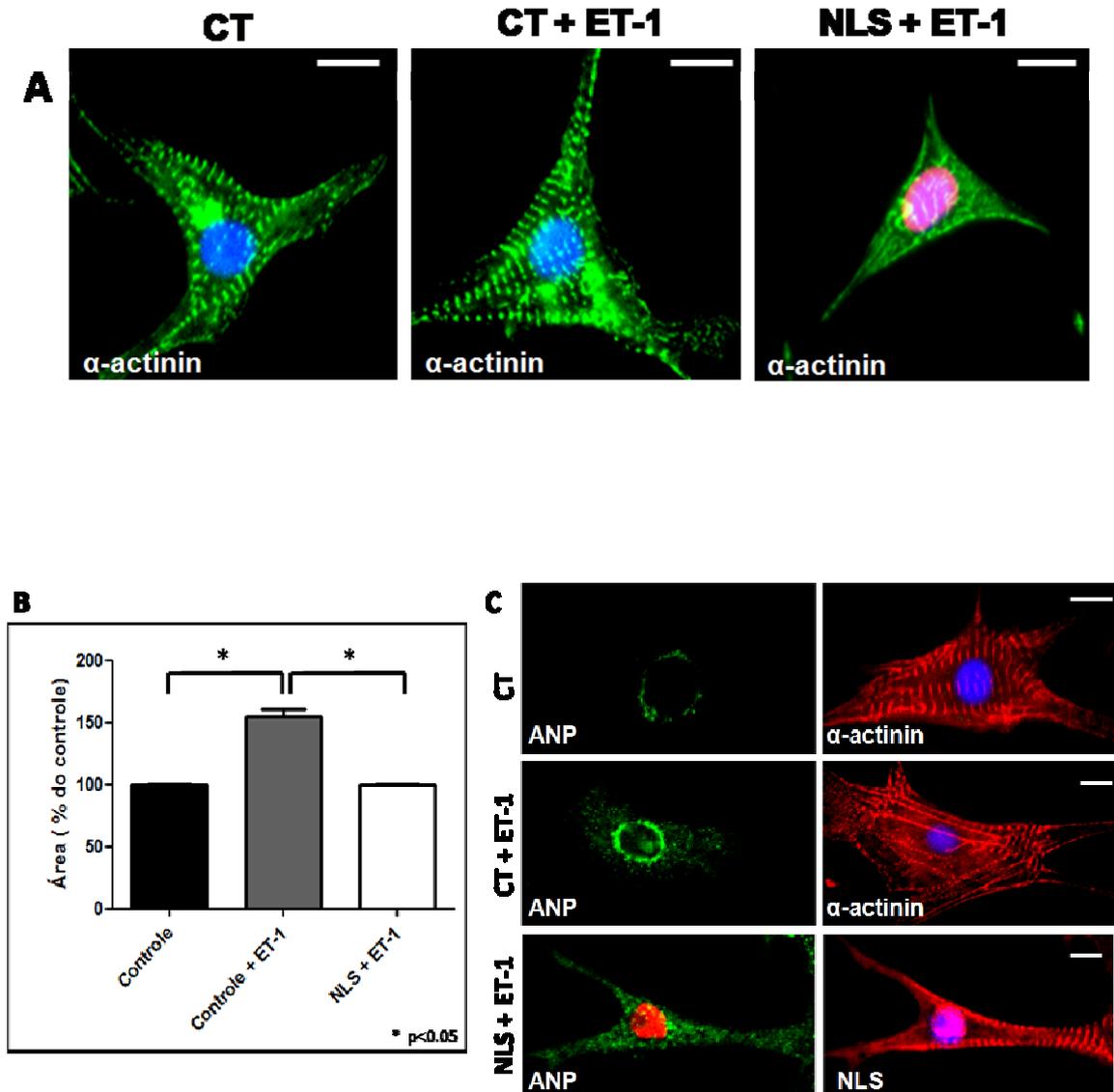


Figura 9: O tamponamento do InsP_3 nuclear inibe a resposta hipertrófica induzida por Endotelina-1

(a) Imagens representativas de cardiomiócitos controle (CT), controle + ET-1 (CT + ET-1) e transfetado com InsP_3 -Spongi-NLS (NLS). (b) Efeito do tamponamento do InsP_3 nuclear na medida da área de superfície em cardiomiócitos submetidos ao tratamento com ET-1. (c) Expressão de ANP em cardiomiócitos CT, CT + ET-1 e NLS + ET-1. Todos os grupos têm número de células ≥ 15 . * $p < 0,05$ vs Controle. Núcleo marcado com Dapi em azul. $n=3$ de experimentos realizados em dias diferentes. Barra = $10\mu\text{m}$

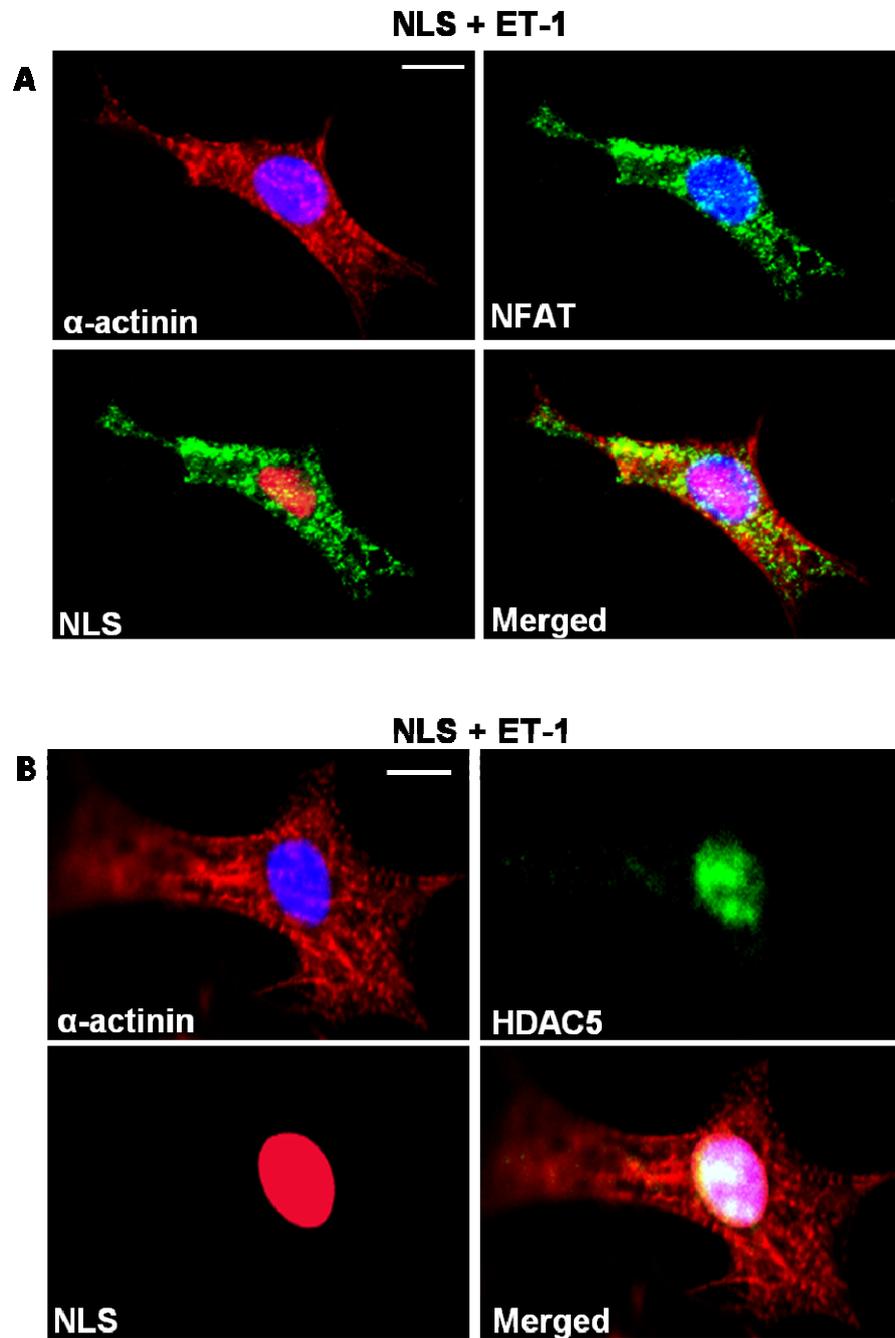


Figura 10: Efeito do tamponamento do InsP₃ nuclear sobre vias hipertróficas estimuladas por Endotelina-1

(a) O tamponamento do InsP₃ nuclear inibe a translocação do NFAT induzida por ET-1.
(b) A translocação de HDAC5 induzida por ET-1 é prevenida quando o InsP₃ nuclear é tamponado. Núcleo marcado com Dapi em azul. Todos os grupos têm número de células ≥ 15 . n=3 de experimentos realizados em dias diferentes. Barra =10 μ m

Para verificar se estas vias utilizadas pelo InsP_3 nuclear e citosólico são específicas para a hipertrofia induzida por ET, os mesmos experimentos citados acima foram repetidos, porém, utilizando-se outro agente pro-hipertrofico, o isoproterenol (ISO). A medida da área de superfície foi realizada em cardiomiócitos isolados como nos experimentos anteriores. Foi observado um aumento na área de $46,8 \pm 7,53\%$. Através de imunofluorescência observou-se um aumento perinuclear da expressão de ANP (Figura 11a-b).

O ISO induz a translocação tanto do NFAT para o núcleo quanto da HDAC5 para o citoplasma (Figura 12). Para verificar o efeito do InsP_3 nuclear e citosólico sobre a resposta hipertrofica induzida por ISO, os cardiomiócitos foram transfectados com as construções tamponadoras de InsP_3 e estimulados com 10nM de ISO por 24hs. Através da medida da área de superfície foi observado que diferentemente da estimulação com ET-1, tanto o tamponamento do InsP_3 nuclear quanto do citosólico, foram capazes de reverter a resposta hipertrofica induzida por ISO (Figura 13). Então para investigar este efeito do InsP_3 nas vias hipertroficas foram realizadas imunofluorescências utilizando anticorpo anti α -actinina conjugado com alexa 633 (vermelho), anti-NFAT e anti-HDAC5 conjugado com alexa 488 (em verde) e o núcleo foi marcado com Dapi e em vermelho claro as construções InsP_3 Spongi NLS e NES. Foi observado que tanto o tamponamento do InsP_3 nuclear quanto citosólico inibem a translocação de HDAC5 e NFAT induzidas por ISO (Figura 14 a-b e Figura 15 a-b).

Os resultados demonstram que resposta hipertrofica induzida por ET-1 envolvendo a via CaMKII/HDAC5 é mediada principalmente pelo InsP_3 nuclear, enquanto a via Cn/NFAT envolve a participação similar de ambos, InsP_3 nuclear e citosólico.

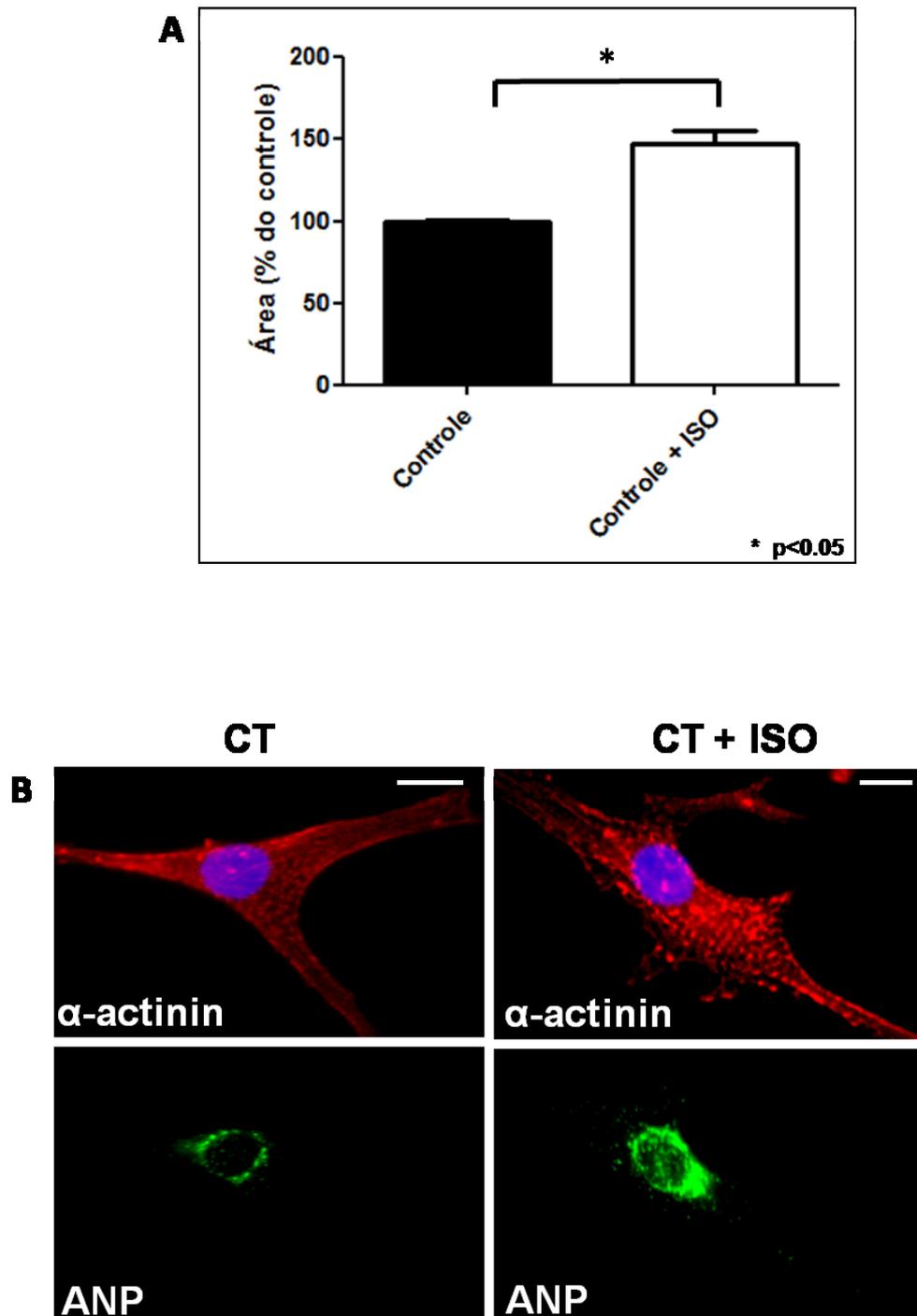


Figura 11: Isoproterenol induz hipertrofia e aumento da expressão de ANP em cardiomiócitos

(a) Efeito do tratamento com ISO 10nM (24hs) sobre a medida da área de superfície em cardiomiócitos. (b) Imagens confocais de cardiomiócitos antes e após a estimulação com ISO. Todos os grupos têm número de células ≥ 20 . * $p < 0,05$ vs Controle. $n=3$ de experimentos realizados em dias diferentes. Núcleo marcado com Dapi em azul. Barra = $10\mu\text{m}$

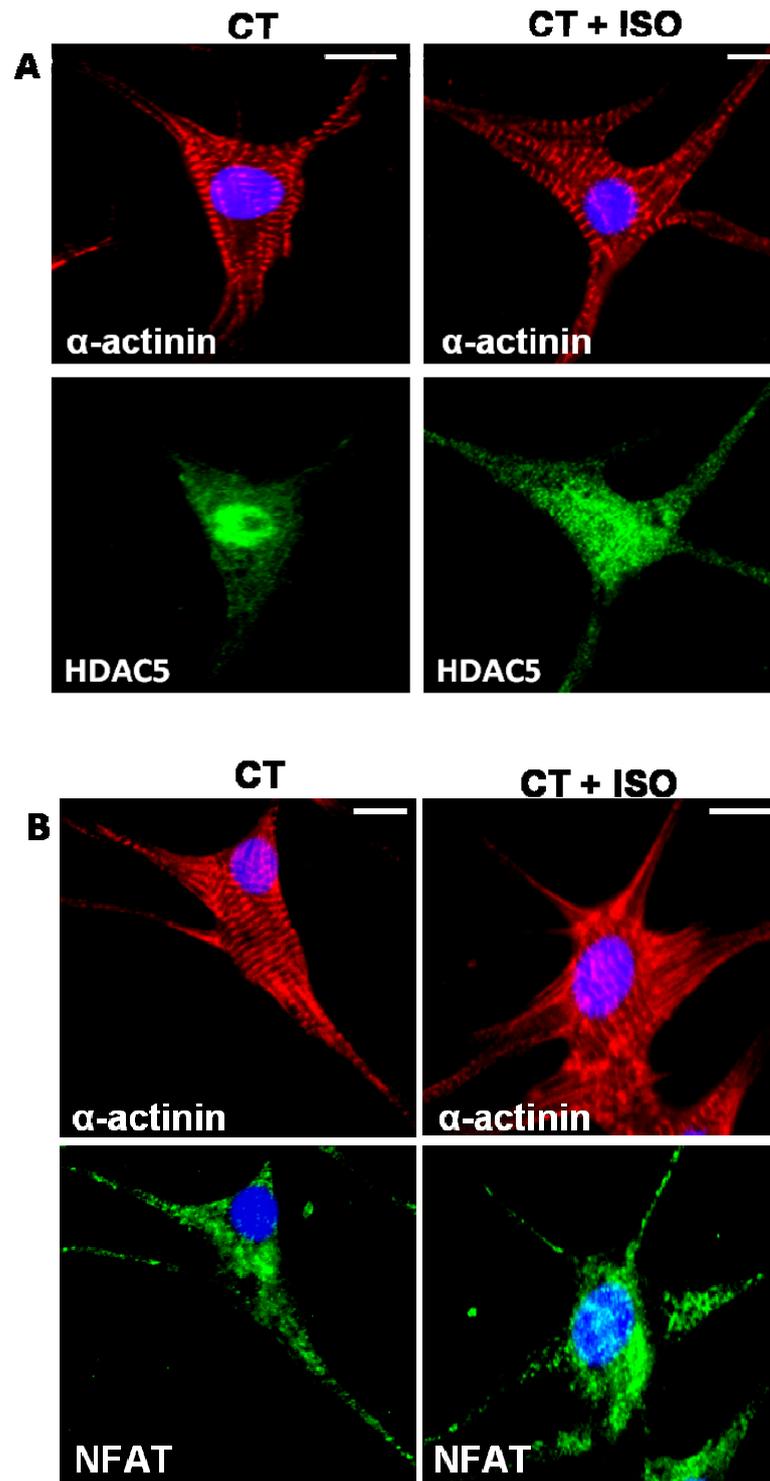


Figura 12: Isoproterenol induz translocação de HDAC5 e NFAT em cardiomiócitos

(a) Imagens confocais de cardiomiócitos antes e após a estimulação com 10nM de ISO (24hs) demonstrando a translocação de (a) HDAC5 e (b) NFAT. Núcleo marcado com Dapi em azul. Todos os grupos têm número de células ≥ 29 . $n=3$ de experimentos realizados em dias diferentes Barra =10 μ m

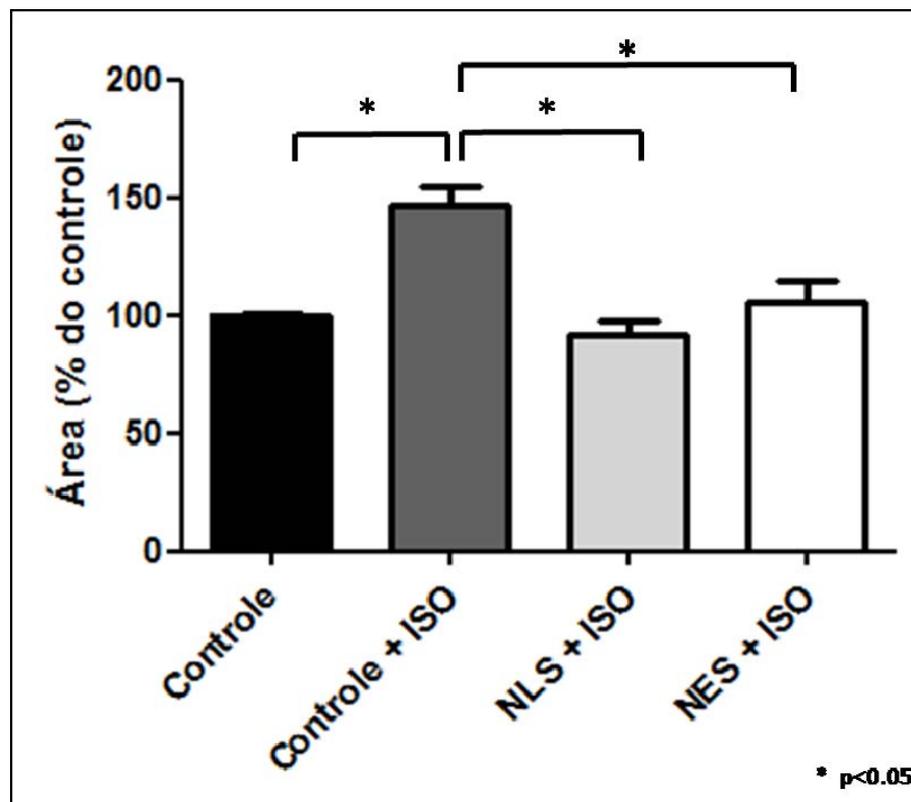


Figura 13: Efeito do tamponamento do InsP_3 nuclear e citosólico sobre a resposta hipertrófica induzida por Isoproterenol

Efeito do tratamento com 10nM de ISO (24hs) sobre a medida da área de superfície em cardiomiócitos tranfectados com as construções e InsP_3 Spongi NLS e NES. Todos os grupos têm número de células ≥ 30 . n=3 de experimentos realizados em dias diferentes *p < 0,05.

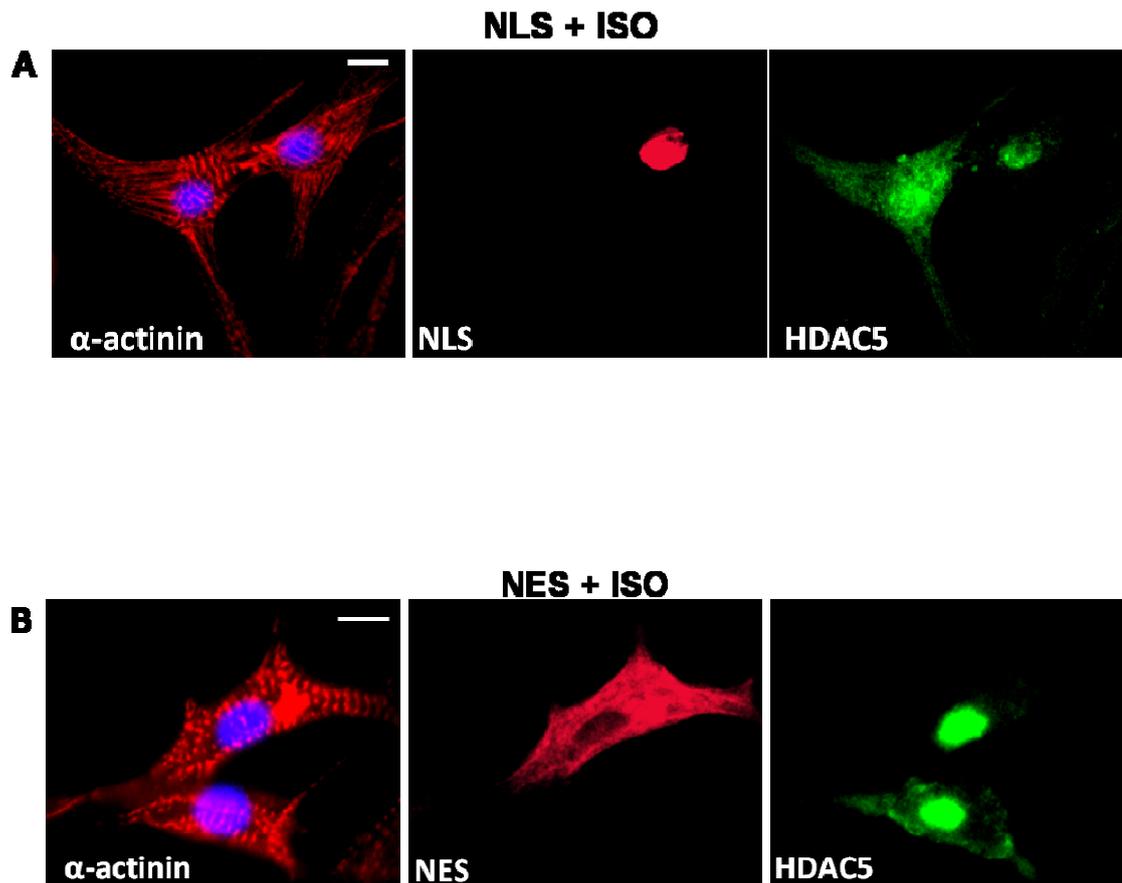


Figura 14: Efeito do tamponamento do InsP₃ nuclear e citosólico sobre a via CaMKII/HDAC5 estimulada por Isoproterenol

(a-b) O tamponamento do InsP₃ nuclear e citosólico inibem a translocação de HDAC5 induzida por ISO. Núcleo marcado com Dapi em azul. Todos os grupos têm número de células ≥ 25 . n=3 de experimentos realizados em dias diferentes. Barra =10 μ m

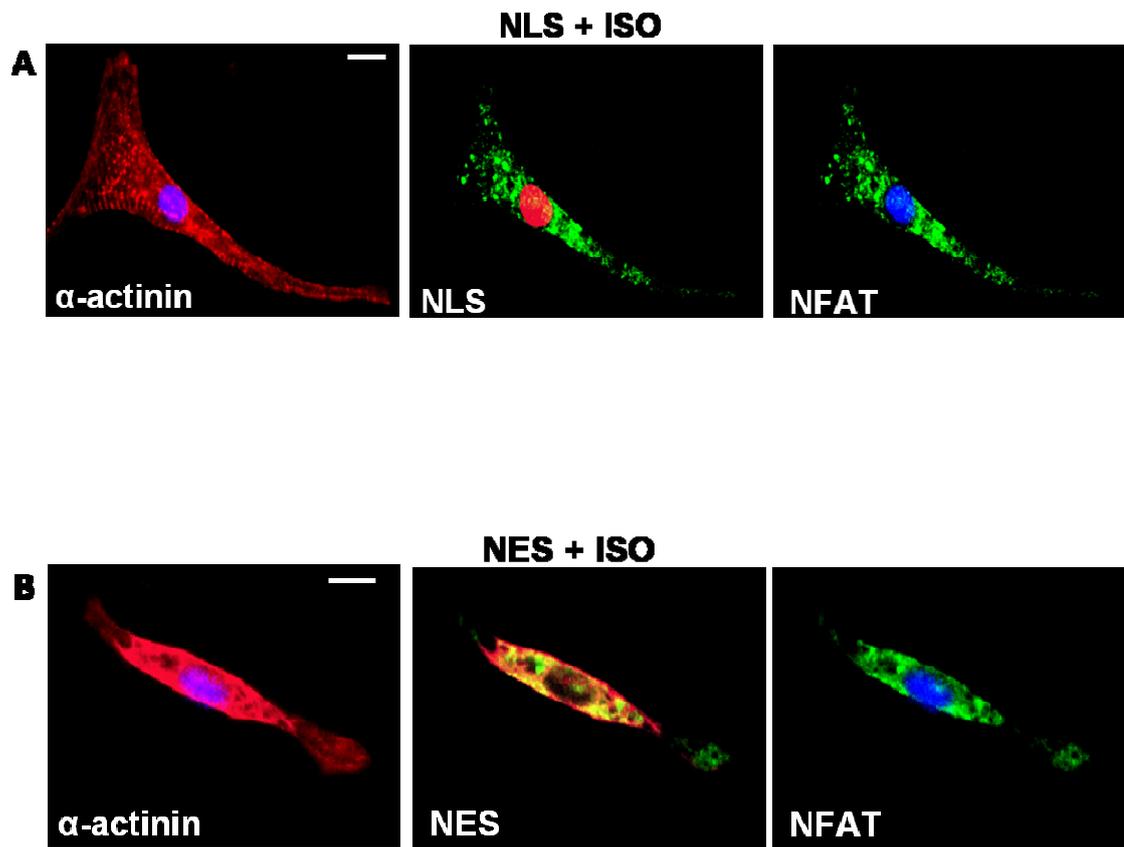


Figura 15: Efeito do tamponamento do InsP_3 nuclear e citosólico sobre a via Cn/NFAT estimulada por Isoproterenol

(a-b) O tamponamento do InsP_3 nuclear e citosólico inibem a translocação de NFAT induzida por ISO. Núcleo marcado com Dapi em azul. Todos os grupos têm número de células ≥ 15 . $n=3$ de experimentos realizados em dias diferentes. Barra = $10\mu\text{m}$

5. Discussão

O acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos envolve principalmente a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através dos RyRs tipo II. Os RyRs como principal canal de liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, possuem ampla expressão em cardiomiócitos. Além dos RyRs, vários estudos têm mostrado a presença de InsP_3Rs e sua funcional capacidade de liberação de Ca^{2+} do SR em miócitos cardíacos (43, 48). Já foi demonstrado que InsP_3 pode ser produzido no núcleo de células epiteliais e que esta produção nuclear de InsP_3 leva ao aumento local de Ca^{2+} independentemente dos níveis de InsP_3 citoplasmáticos (45, 49).

Existem 3 isoformas de InsP_3Rs e diferentes células podem expressar diferentes isoformas no núcleo e no citosol (28). A sensibilidade de InsP_3 varia de acordo com a isoforma (50) e esta diferencial distribuição promove um mecanismo pelo qual o núcleo pode ser mais sensível a liberação de Ca^{2+} induzida por InsP_3 (IICR) que o citosol em certos tipos celulares (28). Com a caracterização do retículo nucleoplasmático evidências mais diretas em favor da existência de um sistema independente de sinalização de Ca^{2+} intranuclear ficou demonstrado (33). O retículo nucleoplasmático é uma organela contínua com o retículo endo/sarcoplasmático e o envelope nuclear. Esta organela funciona como estoque de Ca^{2+} no núcleo das células e expressa InsP_3Rs e/ou RyRs funcionais, ou seja, canais capazes de liberar Ca^{2+} para o nucleoplasma (33, 51), possibilitando a regulação de funções celulares pelo Ca^{2+} nuclear independentemente do aumento de Ca^{2+} citosólico (28, 28, 33, 52).

Em cardiomiócitos, estudos recentes do nosso grupo demonstraram que tanto RyRII quanto InsP_3RII são expressos no retículo nucleoplasmático, (43), sugerindo uma elaborada estrutura de estoque de Ca^{2+} dentro do próprio núcleo. Ficou então demonstrada uma elaborada estrutura de estoque de Ca^{2+} dentro do núcleo de miócitos cardíacos. Além disso, verificou-se que o Ca^{2+} nuclear contribui para ativação e

regulação da função e estabilidade do coração. Quando o Ca^{2+} nuclear foi tamponado foram observadas mudanças no transiente global de Ca^{2+} , propriedades elétricas e redistribuição e expressão de marcadores hipertróficos (43).

Muitos estudos têm vizado o entendimento da via de sinalização de InsP_3 em cardiomiócitos. Evidências mostram que o InsP_3 desempenha um importante papel fisiológico e patológico no coração (12, 53, 54). Entretanto, como a via de sinalização de InsP_3 está envolvida no desenvolvimento e progressão de doenças cardíacas não está completamente esclarecido. Neste trabalho abordamos os mecanismos de discriminação entre o papel do InsP_3 nuclear e citosólico na hipertrofia induzida por agentes pró-hipertróficos.

Algumas linhas de evidências têm estabelecido a liberação de Ca^{2+} induzida por InsP_3 como um dos requisitos para indução de hipertrofia tanto por estímulos que ativam diretamente a produção de InsP_3 , bem como por aqueles que aumentam a atividade dos miócitos através do reforço do acoplamento excitação-contração (12).

Nossos resultados estão de acordo com os dados previamente publicados (12), que mostraram que a hipertrofia induzida por ET-1 é dependente de InsP_3 . Infectando cardiomiócitos com adenovírus que expresam InsP_3 5'-Phos, enzima que metaboliza InsP_3 em InsP_2 , diminuído assim a ação de InsP_3 nas células, foi demonstrado que Ca^{2+} via ação de InsP_3 atua na hipertrofia cardíaca. Nossos dados atuais não só confirmam o papel do InsP_3 na hipertrofia cardíaca, mas expandem estes resultados, demonstrando a contribuição seletiva de InsP_3 citosólico e nuclear no processo hipertrófico. Utilizando as construções moleculares para manipular seletivamente a sinalização de InsP_3 nuclear (InsP_3 -Spongi-NLS) e citosólico (InsP_3 -Spongi-NES), nós demonstramos que a resposta hipertrófica induzida por ET-1, dependente da liberação de Ca^{2+} induzida por InsP_3 em cardiomiócitos, é completamente abolida quando o InsP_3 nuclear é tamponado (Figura

9B). No entanto, o tamponamento do InsP_3 citosólico promoveu uma reversão parcial da hipertrofia nestas células (Figura 7B), indicando que InsP_3 nuclear é um requerimento absoluto para induzir hipertrofia mediada por ET-1.

E sabido que os níveis de expressão de ANP são aumentados após a estimulação com 10nM de ET-1 por 24hs, (13, 55). Nossos dados também confirmam estes resultados e mostram que o tratamento com ET-1 leva a uma redistribuição subcelular dos grânulos de ANP da região perinuclear em direção à periferia da célula (Figura 3D). Quando o InsP_3 citosólico foi tamponado em cardiomiócitos transfectados com InsP_3 -Spongi-NES e estimulados com ET-1, o mesmo padrão de redistribuição dos grânulos de ANP foi observado, porém em menor intensidade (Figura 7C), confirmando a redução do processo hipertrófico. Quando o InsP_3 nuclear foi tamponado pela construção InsP_3 -Spongi-NLS, foi observada uma homogênea redistribuição dos grânulos de ANP por toda a célula (Figura 9C), porém com menor intensidade de fluorescência. Este resultado sugere que a sinalização de Ca^{2+} via ação de InsP_3 nuclear modula a expressão e/ou maquinaria de exocitose de ANP. Neste aspecto, já foi demonstrado que Ca^{2+} pode ligar-se diretamente à estrutura do DNA na sequência TG/AC e modular expressão gênica (56). Outra possibilidade seria um mecanismo compensatório das células, aumentando a expressão de InsP_3R . Assim sendo, mediante estímulo com ET-1, o InsP_3 citosólico estimularia um maior número de InsP_3R , levando a um aumento de Ca^{2+} citosólico e maior secreção de ANP. Uma forma de esclarecer esta questão seria através de experimentos de western e IMF para verificar nível de expressão e localização dos receptores de InsP_3R em cardiomiócitos expressando as construções tamponadoras de InsP_3 no núcleo e no citosol. Além disso, será importante, nestas mesmas condições experimentais, fazer a mensuração do sinal de Ca^{2+} intracelular na presença de ET-1.

Para investigar qual a possível via utilizada pelo InsP_3 nuclear e citosólico para mediar a hipertrofia induzida por ET-1, foram testadas as vias da Cn/NFAT e CaMK/HDAC, que tem sido mostradas mediar a transcrição de genes necessários para resposta hipertrófica (17,19,21,53)

É sabido, por exemplo, que a HDAC5 é um alvo “downstream” da liberação local de Ca^{2+} dependente de InsP_3 e ativação de CaMKII (53). Foi também mostrado que a ativação de InsP_3R é necessária e suficiente para a autofosforilação de CaMKII induzida por ET-1 e exporte nuclear de HDAC5. Ao sair do núcleo, a HDAC5 libera a expressão de MEF2 (53). Foi assim demonstrado como InsP_3 , InsP_3R , CaM, e CaMKII trabalham em conjunto para ativar a translocação de HDAC5 e assim a transcrição de genes pró-hipertróficos em miócitos cardíacos. Como a CaMKII e InsP_3R são super-expressos na insuficiência cardíaca, esta via contribui tanto para o desenvolvimento ou reforço do fenótipo hipertrófico quanto para a insuficiência cardíaca. Nós demonstramos que o exporte nuclear de HDAC5 induzido por ET-1 foi abolido quando o InsP_3 nuclear foi tamponado (Figura 10B), o que não ocorreu com o tamponamento do InsP_3 citosólico (Figura 8B). Estes resultados mostram que o InsP_3 nuclear e citosólico podem mediar a resposta hipertrófica em cardiomiócitos por vias diferentes.

O ISO também estimula a produção de InsP_3 e induz hipertrofia (57). Neste trabalho os efeitos induzidos por 10nM de ET-1 (24hs) e 10nM de ISO (24hs) nas vias hipertróficas mediadas por InsP_3 foram comparados e observou-se que ISO induz hipertrofia, aumenta a expressão de ANP e promove a translocação de HDAC5 em cardiomiócitos de forma similar á ET-1. Entretanto, os efeitos sobre a translocação de HDAC5 quando o InsP_3 nuclear e citosólico foram tamponados diferiram dos efeitos mediados por ET-1. O exporte nuclear de HDAC5 estimulado por ISO foi inibido tanto

pelo InsP₃-Spongi-NLS quanto pelo InsP₃-Spongi-NES (Figura 14A e B). Porque o tamponamento do InsP₃ citosólico foi suficiente para abolir a translocação do HDAC5 induzida por ISO? Recentes estudos mostraram que ISO induz secreção autócrina/parácrina de ET-1 (12). Nossa hipótese é que a concentração de ET-1 secretada pelos cardiomiócios quando as células são estimuladas por ISO é menor que a concentração de ET-1 exógena utilizadas nestes experimentos. Esta hipótese poderá ser abordada, medindo-se a concentração de ET-1 secretada na presença de ISO, nas nossas condições experimentais.

O envolvimento da atividade da via Cn-NFAT na hipertrofia cardíaca é bem estabelecido (12, 25). Foi mostrado que a via Cn/NFAT é ativada de maneira dependente da liberação de Ca²⁺ induzida por InsP₃ por diferentes estímulos hipertróficos como ET-1 e ISO, evidenciando mecanismos pelos quais diversos estímulos podem utilizar o Ca²⁺ para induzir hipertrofia. Os dados deste trabalho estão de acordo com as observações feitas por estes autores. Nós observamos que o tamponamento tanto do InsP₃ nuclear quanto do InsP₃ citosólico inibem a ativação e a translocação de NFAT induzida por ET-1 (Figura 8a e 10a). Foi demonstrado que ISO é capaz de estimular a secreção autócrina e parácrina de ET-1 (12). Nós mostramos que mesmo efeito de ET-1 na via Cn/NFAT foi observado quando a resposta hipertrófica foi induzida por ISO (Figura 15a e b). Estes resultados sugerem que tanto o InsP₃ nuclear quanto citosólico desempenham papel similar na via Cn/NFAT estimulada por diferentes agentes pró-hipertróficos.

Em conjunto, nossos resultados corroboram com trabalhos anteriores (12, 53), no entanto, além disso, mostramos o papel seletivo do InsP₃ nuclear e citosólico, esquematizados na figura 16 que mostra as vias de sinalização hipertróficas no cardiomiócito. Na membrana plasmática, a endotelina-1 ET-1 se liga ao seu receptor

acoplado a proteína G, que ativa PLC, que hidroliza PIP₂ formando DAG e InsP₃. O InsP₃ é então liberado no citosol e se liga aos seus receptores presentes no retículo sarco/endoplasmático, podendo também ser difundido para o núcleo onde se liga ao seu receptor presente no retículo nucleoplasmático. Estudos anteriores mostraram que o InsP₃ também pode ser gerado diretamente no núcleo (49). Uma vez ligados aos seus receptores, InsP₃ promove a liberação de Ca²⁺ que então se difunde pelo citosol e para o núcleo. É sabido que ISO induz a secreção autócrina/parácrina de ET-1, corroborando com este efeito (12). Elevações nas concentrações do Ca²⁺ intracelular levam a ativação da Calcineurina (Cn) que então defosforila NFAT. O NFAT contém um sinal de localização nuclear que permite que ele seja translocado para o núcleo após a defosforilação pela Cn. Uma vez no núcleo, ele se liga ao DNA regulando a transcrição de genes pró-hipertróficos. Nós demonstramos que o tamponamento tanto do InsP₃ nuclear quanto do InsP₃ citosólico inibem a translocação do NFAT prevenindo o seu efeito pró-hipertrófico. O Ca²⁺ intracelular também pode se ligar á calmodulina, formando um complexo Ca²⁺/Calmodulina, que ativa CaMKII, que então fosforila HDAC5. As HDACs removem os grupos acetila, aumentando as cargas positivas das caudas da histona e reforçando a ligação de alta afinidade entre as histonas e a estrutura do DNA. Este processo condensa a estrutura do DNA, prevenindo a transcrição. A fosforilação de HDAC por CaMKII promove sua translocação do núcleo para o citosol, desreprimindo MEF2 e ativando um programa de expressão de genes cardíacos hipertróficos. Nós demonstramos que o tamponamento tanto do InsP₃ nuclear inibe a translocação de HDAC5 induzida por ET-1 prevenindo o seu efeito pró-hipertrófico enquanto o tamponamento do InsP₃ citosólico não previne esta translocação, sustentando o efeito hipertrófico. Quando a resposta hipertrófica foi induzida por ISO

tanto o tamponamento do InsP_3 nuclear, quanto do InsP_3 citosólico foram capazes de inibir a translocação de HDAC5 para o citosol.

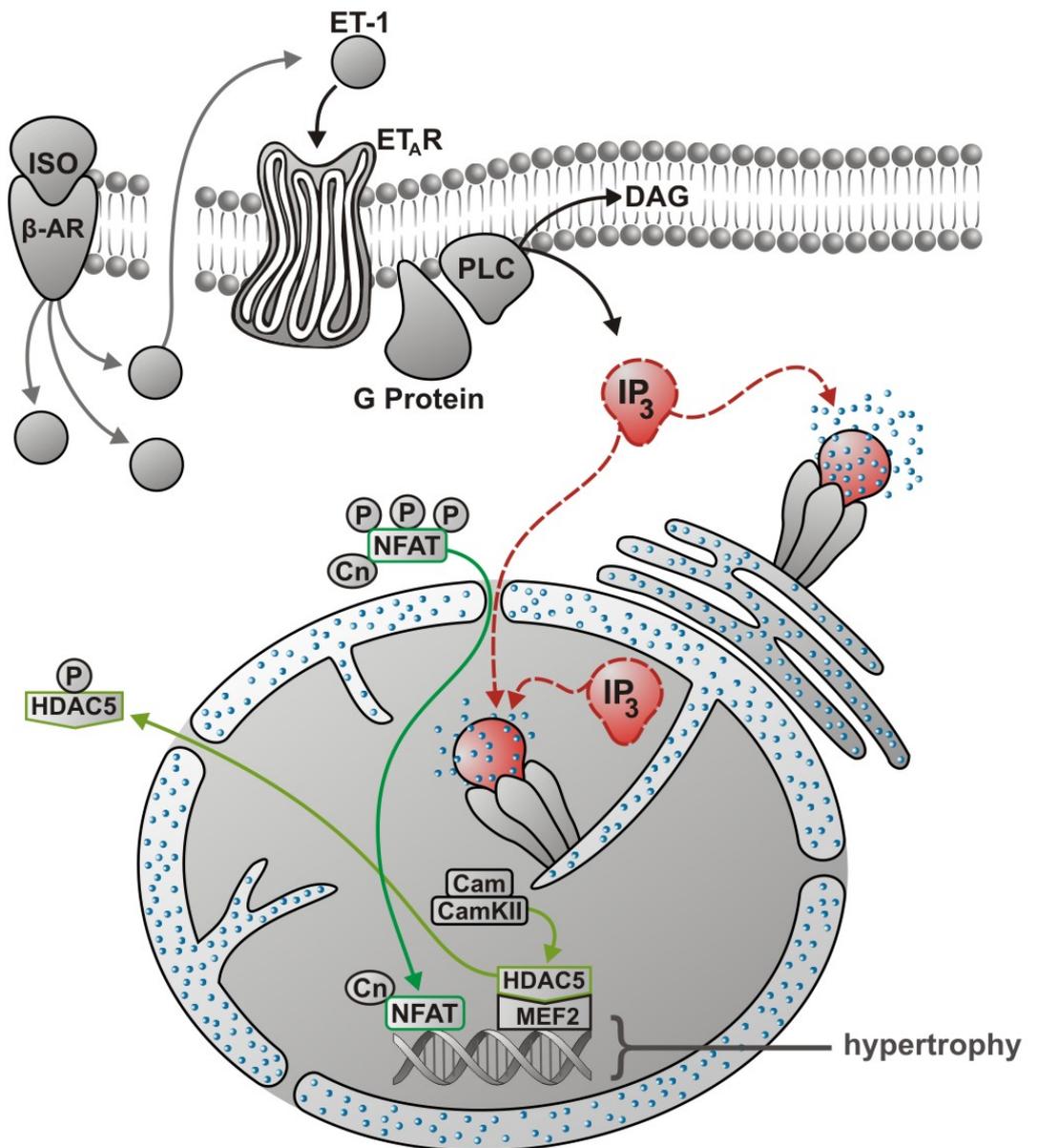


Figura 16: Vias de sinalização hipertrofica no cardiomiócito em resposta a estímulos neuro-hormonais

ET-1, endotelina -1; PLC, fosfolipase C; DAG, diacilglicerol; InsP_3 , inositol 1,4,5, trisfosfato; NFAT, fator nuclear de células T ativadas; Cn, calcineurina; CaM, calmodulina; CaMKII, proteína cinase II dependente de Ca^{2+} e calmodulina; HDAC5, histona deacetilase tipo 5.

6. Sumário e Conclusões

Os resultados deste trabalho de dissertação mostram que a sinalização de InsP_3 é fundamental na indução de hipertrofia. Além disso, nossos resultados mostram que InsP_3 citosólico e nuclear podem ter funções específicas e distintas nas vias hipertróficas. A resposta hipertrófica induzida por ET-1 envolvendo a via CaMKII/HDAC5 é mediada principalmente pelo InsP_3 nuclear, enquanto a via Cn/NFAT envolve a participação similar de ambos, InsP_3 nuclear e citosólico.

Em conjunto, nossos resultados demonstram pela primeira vez que a localização espacial do InsP_3 é relevante para definir vias de sinalização em determinadas funções celulares. Neste trabalho demonstramos a contribuição específica de InsP_3 nuclear e citosólico na hipertrófica cardíaca.

7. Referências Bibliográficas

1. Clapham DE. 1995. Calcium signaling. *Cell* 80:259-68
2. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:517-29
3. Mignery GA, Sudhof TC, Takei K, De Camilli P. 1989. Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 342:192-5
4. Takeshima H. 1993. Primary structure and expression from cDNAs of the ryanodine receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 707:165-77
5. Shah PK, Sowdhamini R. 2001. Structural understanding of the transmembrane domains of inositol triphosphate receptors and ryanodine receptors towards calcium channeling. *Protein Eng* 14:867-74
6. Berridge MJ. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32:235-49
7. Leite MF, Nathanson MH. 2001. Ca²⁺ Signaling in the liver. In *The liver: Biology and Pathobiology*, ed. IM Arias, JL Boyer, FV Chisari, N Fausto, D Schachter, and DA Shafritz, pp. 537-554. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
8. Nowycky MC, Thomas AP. 2002. Intracellular calcium signaling. *J. Cell Sci.* 115:3715-6

9. Thompson M, Andrade VA, Andrade SJ, Pusch T, Ortega JM, Goes AM, Leite MF. 2003. Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:267-74
10. Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Saleet JM, Sobie EA, Lederer WJ. 2002. Local Ca(2+) signaling and EC coupling in heart: Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)](i) transient. *J. Mol. Cell Cardiol.* 34:941-50
11. Bers DM. 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology. (Bethesda.)* 21:380-7
12. Higazi DR, Fearnley CJ, Drawnel FM, Talasila A, Corps EM, Ritter O, McDonald F, Mikoshiba K, Bootman MD, Roderick HL. 2009. Endothelin-1-stimulated InsP3-induced Ca²⁺ release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes. *Mol. Cell* 33:472-82
13. Lorell BH, Carabello BA. 2000. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102:470-9
14. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. 1991. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* 5:3037-46

15. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH, Saad MJ. 2000. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ. Res.* 87:558-65
16. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. 2002. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110:479-88
17. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-28
18. Heineke J, Molkentin JD. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:589-600
19. Berridge MJ. 2006. Remodelling Ca²⁺ signalling systems and cardiac hypertrophy. *Biochem. Soc. Trans.* 34:228-31
20. Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. 1991. Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352:803-7
21. Swoap SJ, Hunter RB, Stevenson EJ, Felton HM, Kansagra NV, Lang JM, Esser KA, Kandarian SC. 2000. The calcineurin-NFAT pathway and muscle fiber-type gene expression. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279:C915-C924

22. Gajewski K, Wang J, Molkenin JD, Chen EH, Olson EN, Schulz RA. 2003. Requirement of the calcineurin subunit gene *canB2* for indirect flight muscle formation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:1040-5
23. Aramburu J, Rao A, Klee CB. 2000. Calcineurin: from structure to function. *Curr. Top. Cell Regul.* 36:237-95
24. Muramatsu T, Kincaid RL. 1992. Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188:265-71
25. Bassel-Duby R, Olson EN. 2003. Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:1133-41
26. Rusnak F, Mertz P. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 80:1483-521
27. Schulz RA, Yutzey KE. 2004. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev. Biol.* 266:1-16
28. Leite MF, Thrower EC, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM, Ehrlich BE, Nathanson MH. 2003. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:2975-80

29. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385:260-5
30. Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S, Bading H. 1998. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium* 23:131-4
31. Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR. 1999. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398:80-4
32. Pust T, Wu JJ, Zimmerman TL, Zhang L, Ehrlich BE, Berchtold MW, Hoek JB, Karpen SJ, Nathanson MH, Bennett AM. 2002. Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J. Biol. Chem.* 277:27517-27
33. Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 5:440-6
34. Lee MA, Dunn RC, Clapham DE, Stehno-Bittel L. 1998. Calcium regulation of nuclear pore permeability. *Cell Calcium* 23:91-101
35. Perez-Terzic C, Pyle J, Jaconi M, Stehno-Bittel L, Clapham DE. 1996. Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear Ca²⁺ stores. *Science* 273:1875-7

36. Brini M, Murgia M, Pasti L, Picard D, Pozzan T, Rizzuto R. 1993. Nuclear Ca^{2+} concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J.* 12:4813-9
37. Allbritton NL, Oancea E, Kuhn MA, Meyer T. 1994. Source of nuclear calcium signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:12458-62
38. Hennager DJ, Welsh MJ, DeLisle S. 1995. Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate levels can control nuclear Ca^{2+} concentration. *J. Biol. Chem.* 270:4959-62
39. Lipp P, Thomas D, Berridge MJ, Bootman MD. 1997. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J.* 16:7166-73
40. Bachs O, Agell N, Carafoli E. 1992. Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1113:259-70
41. Bustamante JO. 1994. Nuclear electrophysiology. *J. Membr. Biol.* 138:105-12
42. Rogue PJ, Humbert JP, Meyer A, Freyermuth S, Krady MM, Malviya AN. 1998. cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:9178-83
43. Guatimosim S, Amaya MJ, Guerra MT, Aguiar CJ, Goes AM, Gomez-Viquez NL, Rodrigues MA, Gomes DA, Martins-Cruz J, Lederer WJ, Leite MF. 2008. Nuclear Ca^{2+} regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium* 44:230-42

44. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. 1995. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell* 80:439-44
45. Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, Gomez MV, Varnai P, Balla T, Bennett AM, Nathanson MH. 2008. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J. Biol. Chem.* 283:4344-51
46. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54
47. Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR. 1990. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 265:20555-62
48. Gomes DA, Leite MF, Bennett AM, Nathanson MH. 2006. Calcium signaling in the nucleus. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 84:325-32
49. Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, Leite MF, Nathanson MH. 2008. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 48:1621-31

50. Newton CL, Mignery GA, Sudhof TC. 1994. Co-expression in vertebrate tissues and cell lines of multiple inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptors with distinct affinities for InsP3. *J. Biol. Chem.* 269:28613-9
51. Hernandez E, Leite MF, Guerra MT, Kruglov EA, Bruna-Romero O, Rodrigues MA, Gomes DA, Giordano FJ, Dranoff JA, Nathanson MH. 2007. The spatial distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms shapes Ca²⁺ waves. *J Biol Chem.* 282:10057-67
52. Mendes CC, Gomes DA, Thompson M, Souto NC, Goes TS, Goes AM, Rodrigues MA, Gomez MV, Nathanson MH, Leite MF. 2005. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280:40892-900
53. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. 2006. Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J. Clin. Invest* 116:675-82
54. Kockskamper J, Zima AV, Roderick HL, Pieske B, Blatter LA, Bootman MD. 2008. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 45:128-47
55. Dietz JR. 2005. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovasc. Res.* 68:8-17

56. Dobi A, Agoston D. 1998. Submillimolar levels of calcium regulates DNA structure at the dinucleotide repeat (TG/AC)_n. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 95:5981-6

57. Taylor PB, Tang Q. 1984. Development of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 62:384-9

8. Anexos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 249/2008**, relativo ao projeto intitulado "**O InsP3 nuclear modula o transiente global de cálcio**", que tem como responsável(is) **Maria de Fátima Leite**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 12/2008**.

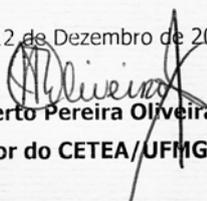
Este certificado expira-se em **10/ 12/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 249/2008**, related to the project entitled "**Nuclear InsP3 modulates calcium transients**", under the supervisors of **Maria de Fátima Leite**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 10, 2008**.

This certificate expires in **December 10, 2013**.

Belo Horizonte, 12 de Dezembro de 2008.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod Cert. v1.0)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)