

Maria Jimena Amaya Gutiérrez

**O Ca^{2+} NUCLEAR REGULA A
FUNCIONALIDADE DE
CARDIOMIÓCITOS**

Orientadora: Prof^a. Maria de Fátima Leite

Professora Associada – Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

**Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Maria Jimena Amaya Gutiérrez

O Ca^{2+} NUCLEAR REGULA A FUNCIONALIDADE DE CARDIOMIÓCITOS

Tese 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 Doutor.

Orientadora: Prof^a. Maria de Fátima Leite

**Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2010**

“É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós,
onde os sentimentos não precisam de motivos, nem os desejos de razão.
O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos
de quem sabe ver.”

Gabriel Garcia Márquez

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

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

Howard Hughes Medical Institute (HHMI)

National Institutes of Health (NIH)

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais Rafael Amaya e Mercedes Gutiérrez de Amaya, porque sempre me acompanham com apoio e amor incondicionais e por ter me ensinado a sonhar e a acreditar que é possível alcançar qualquer objetivo.

Às minhas irmãs Ana Paula e Maria Mercedes, por ser minha maior fonte de inspiração e pelo seu carinho incansável em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Maria de Fátima Leite, por abrir as portas do seu laboratório para aprender o que é ser cientista, pelo incentivo para descobrir coisas novas, e de maneira muito especial, pela sua amizade.

À Leonor Tapias da Mata Machado, pelo imenso apoio e amizade, e por ser a principal responsável pela minha entrada no mundo da ciência.

À Profa. Silvia Guatimosim, pela sua colaboração e disponibilidade excepcionais para a realização deste trabalho e também pela sua amizade.

Ao Prof. Alfredo Miranda de Góes, pelo seu incentivo e sábios ensinamentos.

Ao Prof. Luiz Armando de Marco, pelo seu imenso apoio durante o a minha pós-graduação, sua ajuda foi essencial muito obrigada!

À Michele Rodrigues e Dawidson Gomes, pela sua grande ajuda desde Yale em todos os momentos que precisamos.

À Carla Jeane Aguiar, pela sua constante ajuda na realização dos experimentos para este projeto.

A todos os meus amigos do Calcium Lab, pelo verdadeiro companheirismo.

Aos membros do Laboratório Eletrocel e do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pela sua grande atenção.

De forma muito especial agradeço a Deus, por ter me guiado durante esta importante etapa da minha vida, que me fez crescer como pessoa e como profissional, e abriu meus olhos para perseguir novos projetos.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1 Sinalização de Ca²⁺ intracelular.....	2
1.2 Sinalização de Ca²⁺ em cardiomiócitos.....	4
1.3 Sinalização de Ca²⁺ nuclear.....	5
2. Objetivos.....	8
3. Materiais e Métodos.....	10
3.1 Animais.....	11
3.2 Cultura primária de cardiomiócitos neonatais.....	11
3.3 Imagens Fluorescentes em células vivas.....	12
3.4 Isolamento e eletrofisiologia de miócitos ventriculares adultos.....	13
3.5 Construções adenovirais de Parvalbumina-DsRed.....	13
3.6 Imunofluorescência.....	14
3.7 Extração nuclear e citosólica.....	15
3.8 Western Blot.....	15
3.9 Análise estatística.....	16
4. Resultados.....	17
4.1 Cardiomiócitos neonatos contêm maquinaria especializada de sinalização de Ca²⁺ nuclear.....	18
4.2 O Tamponamento de Ca²⁺ altera o transiente global de Ca²⁺ em cardiomiócitos.....	22

4.3 O tamponamento de Ca^{2+} nuclear induz aumento da área nuclear.....	28
5. Discussão.....	35
6. Referências Bibliográficas.....	43
7. Anexos.....	57

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Analysis of Variance	Análise de Variância
ANP	Atrial Natriuretic Peptide	Peptídeo Atrial Natriurético
APD	Action Potencial Duration	Duração do Potencial de Ação
ARA-C	Cytosine β -D-arabinofuranoside	Citosina β -D-arabinofuranoside
BSA	Bovine Serum Albumin	Albumina de Soro Bovino
Ca ²⁺	Calcium	Cálcio
[Ca ²⁺ _i]	Intracellular Calcium Concentration	Concentração intracelular de Cálcio
CaCl ₂	Calcium Chloride	Cloreto de Cálcio
CamK	Calcium-Calmodulin dependent kinase	Kinase dependente de Cálcio-Calmodulina
CICR	Calcium Induced Calcium Release	Liberação de Cálcio Induzida por Cálcio
CRE	Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element	Elemento de resposta ao Adenosina Monofosfato cíclico
CsA	Cyclosporin A	Ciclosporina A
DAG	Dyacylglycerol	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-phenilindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Meio Modificado de Dulbecco
DsRed	Red Fluorescent Protein	Proteína Fluorescente Vermelha
ECC	Excitation-Contraction coupling	Acoplamento Excitação-Contração
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	Ácido etilenodiamino tetraacético
EGF	Epidermal Growth Factor	Fator de Crescimento Epidermal
Elk-1	Ets Like gene-1	Gene Ets Like-1
ET-1	Endothelin-1	Endotelina-1

FBS	Fetal Bovine Serum	Soro Fetal Bovino
Fluo-4/AM	Fluo-4 aceto-methyl-ester	Fluo-4 aceto-metil-éster
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution	Solução Salina Tamponada Hanks
HDAC	Hystone Deacetylase	Histona Deacetilase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hidroxietyl)-1-ácido piperazineetanesulfônico
InsP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate	Inositol 1,4,5-trisfosfato
InsP ₃ R	Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor	Receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato
KCl	Potassium Chloride	Cloreto de Potássio
KOH	Potassium Hydroxide	Hidróxido de Potássio
mg	miligram	miligrama
MgCl ₂	Magnesium Chloride	Cloreto de Magnésio
mL	mililiter	mililitro
mM	milimolar	milimolar
MOI	Multiplicity of Infection	Multiplicidade de Infecção
mRFP	Monomeric Red Fluorescent Protein	Proteína Fluorescente Vermelha Monomérica
ms	milisecods	milisegundos
µg	microgram	micrograma
µL	microliter	microlitro
µm	micrometer	micrômetro
µM	micromolar	micromolar
NaCl	Sodium Chloride	Cloreto de Sódio
NaF	Sodium Fluoride	Fluoreto de Sódio
NaH ₂ PO ₄	Sodium Phosphate	Fosfato de Sódio
NaOH	Sodium Hydroxide	Hidróxido de Sódio

NCX	Sodium-Calcium Exchanger	Trocador de Sódio-Cálcio
NES	Nuclear Exclusion Sequence	Sequência de Exclusão Nuclear
NLS	Nuclear Localization Sequence	Sequência de Localização Nuclear
nm	nanometer	nanômetro
nM	nanomolar	nanomolar
PBS	Phosphate Buffered Saline	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reação em Cadeia da Polimerase
phe	Phenylephrine	Fenilefrina
PLC	Phospholipase C	Fosfolipase C
PMR1/ATPC1	P-Type Calcium ATPase transporter	Transportador Cálcio ATPase do tipo P
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride	fenilmetanesulfonilfluoreto
PV	Parvalbumin	Parvalbumina
RACK	Receptor of Activated C Kinase	Receptor de Proteína Kinase C Ativada
RN	Neonatal Rats	Ratos Neonatos
RTK	Receptor Tyrosine Kinase	Receptor de Tirosina Kinase
RyR	Ryanodine Receptor	Receptor de Rianodina
SERCA	Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase	Cálcio ATPase do Retículo Sarco-Endoplasmático
SRE	Serum Response Element	Elemento de Resposta ao Soro
TBST	Tris Buffered Saline - Tween	Tampão Salino de Tris - Tween
TEF/TEAD	Transcription Enhancer Factor	Fator Aumentador de Transcrição
U.A	Arbitrary Units	Unidades Arbitrárias

Lista de Figuras

Figura 1: Mecanismo de ativação de InsP₃Rs via receptores acoplados a proteína G.....	3
Figura 2: O núcleo de cardiomiócitos neonatos contém o retículo nucleoplasmático.....	19
Figura 3: Cardiomiócitos neonatos expressam InsP₃R-II e RyR-II no retículo nucleoplasmático.....	21
Figura 4. O tamponamento de Ca²⁺ nuclear ou citosólico atenua a amplitude e aumenta a frequência dos transientes globais de Ca²⁺ em cardiomiócitos neonatos.....	24
Figura 5. O tamponamento de Ca²⁺ nuclear ou citosólico diminui a expressão do RyR-II em cardiomiócitos neonatos.....	26
Figura 6. O tamponamento de Ca²⁺ nuclear influencia a atividade elétrica de miócitos ventriculares adultos.....	27
Figura 7. Cardiomiócitos neonatos infectados com Ad-PV-NLS mostram aumento da área nuclear.....	29
Figura 8. O tamponamento de Ca²⁺ nuclear altera a expressão de calcineurina e a localização de NFAT em cardiomiócitos neonatos.....	31
Figura 9. O tamponamento de Ca²⁺ nuclear leva à redistribuição de ANP em cardiomiócitos neonatos.....	34

Resumo

No coração, os sinais de cálcio (Ca^{2+}) citosólico são eventos bem caracterizados que participam na ativação da maquinaria contrátil celular. Em contraste, a contribuição da sinalização de Ca^{2+} nuclear na funcionalidade e excitabilidade das células cardíacas ainda não foi diretamente abordada. Neste trabalho, examinamos as consequências funcionais do tamponamento de Ca^{2+} nuclear em cardiomiócitos de ratos neonatos. Foi demonstrado que cardiomiócitos contêm um retículo nucleoplasmático, e que estas extensões intranucleares do retículo sarcoplasmático expressam receptores de rianodina (RyRs) e receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP_3Rs), indicando uma possível forma de regulação ativa do Ca^{2+} nuclear. Construções adenovirais codificando a proteína quelante de Ca^{2+} parvalbumina (PV) foram direcionadas para o núcleo com uma sequência de localização nuclear (Ad-PV-NLS) ou para o citoplasma com uma sequência de exclusão nuclear (Ad-PV-NES). Foi observada uma diminuição na amplitude dos transientes globais de Ca^{2+} e na expressão de RyR-II, assim como um aumento na frequência de batimentos celulares após tamponamento tanto do Ca^{2+} citosólico, quanto do nuclear. Quando o Ca^{2+} nuclear foi tamponado foi observado aumento da área nuclear, aumento na expressão de calcineurina, translocação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) para o núcleo e redistribuição subcelular do peptídeo atrial natriurético (ANP). Além disso, houve prolongamento da duração do potencial de ação (APD) em miócitos ventriculares adultos sob condições de tamponamento de Ca^{2+} nuclear. Estes resultados sugerem que os níveis de Ca^{2+} nuclear têm um papel fundamental na regulação de proteínas específicas assim modulando a funcionalidade de cardiomiócitos. A sinalização de Ca^{2+} nuclear e as estruturas que a controlam constituem um novo aspecto regulatório no coração.

Abstract

In the heart, cytosolic Ca^{2+} signals are well-characterized events that participate in the activation of cell contraction machinery. In contrast, nuclear Ca^{2+} signaling contribution to cardiomyocyte function and excitability remains elusive. Here, we examined functional consequences of buffering nuclear Ca^{2+} in neonatal cardiomyocytes. We report that cardiomyocytes contain a nucleoplasmic reticulum, and that these intranuclear extensions of the sarcoplasmic reticulum express both ryanodine receptors (RyRs) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (InsP_3Rs), providing a possible way for active regulation of nuclear Ca^{2+} . Adenovirus constructs encoding the Ca^{2+} buffer protein parvalbumin (PV) were targeted to the nucleus with a nuclear localization signal (Ad-PV-NLS) or to the cytoplasm with a nuclear exclusion signal (Ad-PV-NES). A decrease in the amplitude of global Ca^{2+} transients and RyR-II expression, as well as an increase in cell beating rate were observed for both cytosolic and nuclear Ca^{2+} buffering. When nuclear Ca^{2+} buffering was imposed nuclear enlargement, increased calcineurin expression, NFAT translocation to the nucleus and subcellular redistribution of atrial natriuretic peptide (ANP) were observed. Furthermore, prolongation of action potential duration (APD) occurred in adult ventricular myocytes under nuclear Ca^{2+} buffering. These results suggest that nuclear Ca^{2+} levels underlie the regulation of specific protein targets and thereby modulate cardiomyocyte function. The local nuclear Ca^{2+} signaling and the structures to control it constitute an important and novel regulatory motif in the heart.

1. Introdução

1.1 Sinalização de Ca²⁺ intracelular

O Ca²⁺ é um segundo mensageiro versátil que pode regular múltiplas funções celulares simultaneamente tais como contração, secreção, transcrição, divisão e morte celular [1;2]. Embora não seja estabelecido como um único segundo mensageiro coordena tal diversidade de efeitos celulares, evidências sugerem que diferentes padrões espaciais de sinais de Ca²⁺ que podem ocorrer dentro de uma célula determinam sua especificidade e complexa ação regulatória [1].

A principal organela responsável por armazenar e liberar Ca²⁺ em muitos tipos celulares é o retículo endoplasmático (RE) [3]. O RE contém dois tipos de canais especializados de Ca²⁺: os receptores de rianodina (RyRs) e os receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP₃Rs), sendo que cada família destes canais de Ca²⁺ apresenta três diferentes isoformas (1, 2 e 3) em mamíferos [4-7]. As estruturas destes dois tipos de canais de Ca²⁺ apresentam uma grande homologia nas regiões que podem formar o poro dos mesmos; também apresentam grande semelhança pois formam estruturas oligoméricas por associação de suas quatro subunidades [8-10].

Os RyRs são ativados principalmente por Ca²⁺, o que resulta no fenômeno de liberação de Ca²⁺ induzida por Ca²⁺ (CICR) [2]. Este processo pode ser desencadeado por duas maneiras: através do acoplamento entre canais operados por voltagem com os canais liberadores do RE, como acontece em miócitos cardíacos e neurônios; [1] ou através da ação conjunta dos próprios canais liberadores de Ca²⁺ presentes no RE, criando ondas de Ca²⁺ que transmitem a sinalização através das células [11]. Por outro lado, os InsP₃Rs são ativados pelo InsP₃ (Figura 1), mas podem ser modulados pelo Ca²⁺ e por proteínas kinases [12].

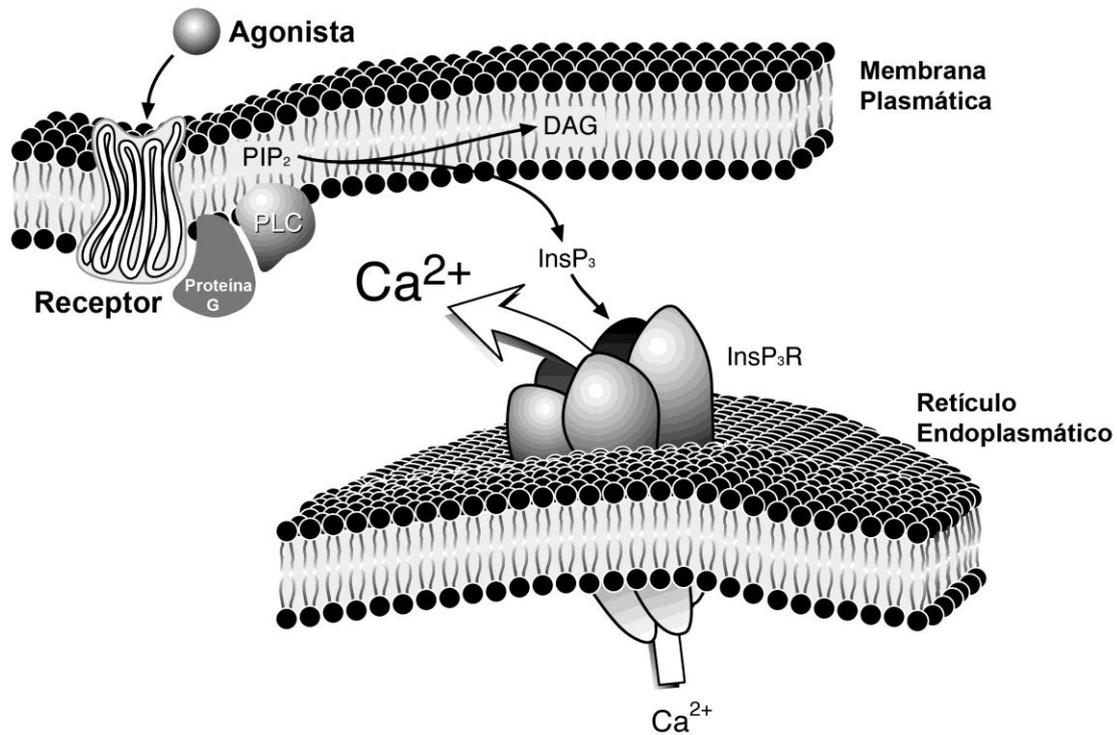


Figura 2: Mecanismo de ativação de InsP₃Rs via receptores acoplados a proteína G
 A ligação de um hormônio ao seu receptor de membrana acoplado a proteína G ativa a fosfolipase C (PLC), que por sua vez induz a hidrólise de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) para formar diacilglicerol (DAG) e InsP₃. Os InsP₃ difundem-se pelo citosol e ligam-se aos InsP₃Rs presentes na membrana do RE promovendo assim a liberação de Ca²⁺ para o citosol [12].

Assim como existem vários mecanismos para induzir a liberação de Ca²⁺ de compartimentos intracelulares, existem também vários mecanismos para retornar o Ca²⁺ intracelular a níveis basais. A extrusão do Ca²⁺ para o espaço extracelular envolve duas famílias de proteínas: o trocador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) e o Ca²⁺ ATPase da membrana plasmática [13]. Além disso, o Ca²⁺ pode ser recaptado para o RE por uma família de Ca²⁺ ATPases do retículo sarco-endoplasmático (SERCA). A recaptação pela mitocôndria é mediada pelo Ca²⁺ “uniporter” mitocondrial enquanto a recaptação pelo Golgi é mediada pelo transportador - Ca²⁺ ATPase do tipo P (PMR1/ATP2C1). Além de captar Ca²⁺, a mitocôndria pode também liberá-lo através do trocador Na⁺-H⁺/ Ca²⁺ e em algumas circunstâncias, pelo poro de permeabilidade transitória [13].

Como descrito, existe uma grande variedade de estoques intracelulares de Ca^{2+} que podem auxiliar na compartimentalização e na especificidade das respostas celulares controladas pelo Ca^{2+} [3;13]. Neste trabalho estudamos o papel do Ca^{2+} nuclear na funcionalidade de cardiomiócitos.

1.2 Sinalização de Ca^{2+} em cardiomiócitos

O Ca^{2+} tem um papel fundamental na biologia dos miócitos cardíacos, tanto nas suas propriedades elétricas quanto mecânicas, sendo a sua participação no processo de acoplamento excitação-contração (ECC) em condições fisiológicas já bem conhecida [14-16].

No processo básico do acoplamento excitação-contração, após o disparo de um potencial de ação, o transiente de Ca^{2+} , um aumento tempo-dependente da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}_i]$), é o responsável por ativar a contração. O transiente de Ca^{2+} é dividido em dois componentes: o influxo de Ca^{2+} e a liberação de Ca^{2+} [15]. Quando o potencial de ação despolarizante passa pelo coração a cada batimento, os canais de Ca^{2+} operados por voltagem do tipo-L se abrem e permitem o influxo de uma pequena quantidade de Ca^{2+} . Este sinal de Ca^{2+} é amplificado pelos RyRs que estão próximos aos canais operados por voltagem, através da liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} . O Ca^{2+} se difunde dos RyRs para os filamentos de actina e miosina e inicia-se então a contração celular [15].

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 [15].

O Ca^{2+} em cardiomiócitos também está envolvido no desenvolvimento de condições como disfunção contrátil e arritmias, que são características da insuficiência

cardíaca e hipertrofia [14;17-19]. Por exemplo, já foi demonstrado que os InsP_3Rs possuem um papel fundamental no desenvolvimento da inotropia e dos sinais de Ca^{2+} pró-arrítmicos em miócitos ventriculares estimulados com Endotelina-1 (ET-1) [20]. Além disso, mutações específicas nos canais de Ca^{2+} do tipo-L causam múltiplas arritmias que podem levar à morte súbita [21]. Alterações das subunidades regulatórias do RyR também estão envolvidas na ciclagem defeituosa de Ca^{2+} em corações com insuficiência [22]. Também, estudos recentes têm observado que o Ca^{2+} proveniente de IP_3Rs , assim como o Ca^{2+} associado ao acoplamento excitação-contração está envolvido na ativação de vias de sinalização pro-hipertroóficas [17;18;23;24].

1.3 Sinalização de Ca^{2+} nuclear

Os padrões de sinalização de Ca^{2+} podem variar em diferentes regiões da célula e já foi extensivamente demonstrado que os aumentos de Ca^{2+} no núcleo têm efeitos biológicos específicos, que diferem dos efeitos do aumento do Ca^{2+} citosólico [25-31]. 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 [32;33]. 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 [34-37]. Este mecanismo explica o aumento do Ca^{2+} nuclear observado sob certas condições, mas isto não explica a regulação independente de sinais de Ca^{2+} citosólicos e nucleares.

Um estudo realizado em cardiomiócitos mostrou a presença de sinais de Ca^{2+} localizados que ocorrem espontaneamente no núcleo, e que são distintos dos sinais de

Ca^{2+} citosólicos, exibindo diferente cinética de decaimento [38]. Além disso, foi observado um grande compartimento interconectado de armazenamento de Ca^{2+} formado pelo retículo sarcoplasmático e o envelope nuclear no citosol de cardiomiócitos ventriculares [39].

A caracterização do retículo nucleoplasmático favoreceu a idéia da existência de um sistema independente de sinalização de Ca^{2+} no núcleo celular [29;40]. O retículo nucleoplasmático é uma organela nuclear de armazenamento de Ca^{2+} , contínua ao lúmen do retículo endo/sarcoplasmático. Esta especializada organela já foi indentificada em células hepáticas e de músculo esquelético, e expressa InsP_3Rs e RyRs funcionais, permitindo que o Ca^{2+} nuclear regule funções celulares independentemente do aumento do Ca^{2+} citosólico [29;40].

A sinalização de Ca^{2+} nuclear regula diretamente importantes funções celulares tais como translocação de proteínas kinases [29] e transcrição gênica [25;26;28;41]. Evidências sugerem que os sinais de Ca^{2+} nuclear e citosólico afetam a expressão de genes de maneira distinta. Por exemplo, vias de sinalização ativadas por Ca^{2+} citosólico ativam o elemento de resposta ao soro (SRE), enquanto o Ca^{2+} nuclear controla a expressão de genes através do elemento de resposta ao adenosina monofosfato cíclico (CRE) [25]. Além disso, já foi demonstrado que o Ca^{2+} nuclear e não o citosólico é requerido na ativação transcricional do gene Ets Like-1 (Elk-1) induzida pelo Fator de crescimento epidermal (EGF) [28] e na regulação do fator aumentador de transcrição (TEF/TEAD) [31]. O Ca^{2+} nuclear também está envolvido no processo de proliferação celular, o que já foi demonstrado em células SkHep-1 e em células estelares hepáticas [42;43].

Estudos recentes do nosso grupo mostraram que a sinalização de Ca^{2+} induzida por receptores de tirosina kinase (RTKs), como c-MET, ocorre 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 [44]. 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 [45]. Assim, estudos recentes têm explorado cada vez mais a complexidade dos sinais de Ca^{2+} nuclear. Neste estudo investigamos especificamente como o Ca^{2+} nuclear influencia as funções de cardiomiócitos.

1. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar o papel do Ca^{2+} nuclear na funcionalidade de cardiomiócitos

Objetivos específicos

Investigar o efeito do tamponamento seletivo de Ca^{2+} nuclear e citosólico sobre a funcionalidade e excitabilidade de cardiomiócitos.

Investigar a participação do Ca^{2+} nuclear no controle das funções de cardiomiócitos.

2. 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 protocolo de número 16/2006 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

Cardiomiócitos neonatais foram isolados de corações de 12 ratos Wistar de 3 a 5 dias de idade. Os ratos foram sacrificados por decapitação e submetidos a toracotomia mediana. O coração foi transferido imediatamente para um tubo de 50 mL cônico contendo Solução Salina Balanceada Hanks (HBSS) á 4°C. Para o isolamento 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, obtida da Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ), 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 unidades/mL, Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ), por 30 a 40 minutos e então dissociados mecanicamente com uma Pipeta sorológica. As células foram ressuspendidas em meio mínimo essencial de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 unidades/mL penicillina, 100 µg/mL streptomina e 0,25 µg/mL de anfotericina-b. Os cardiomiócitos foram plaqueados em garrafas de cultura

ou lamínulas de 22 x 22 mm pré-tratadas com fibronectina (10 µg/mL), e incubados a 37° C em uma incubadora de 5% CO₂. Dois dias depois do plaqueamento, as células foram lavadas com DMEM e tratadas por 24 horas com meio de cultura completo, agora incluindo 20 µg/mL citosina B-D-arabinofuranoside (ARA-C). O ARA-C incorpora ao DNA e inibe a replicação do mesmo por formar complexos de clivagem com a topoisomerase I resultando em fragmentação do DNA, porém não inibe a síntese de RNA [46], diminuindo assim a contaminação da cultura por outras células que não forem cardiomiócitos. As células foram usadas em experimentos no quarto 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 Imagens Fluorescentes em células vivas

As células foram incubadas com 100 nM da sonda ER-tracker por 30 minutos a temperatura ambiente, 6 µM de Fluo-4/AM por 30 minutos a 37° C, ou 6 µM de Mag-Fluo-4/AM por 60 minutos a 37°C [29;30;47]. O Mag-Fluo-4/AM foi incubado sob condições que permitiram a compartimentalização da sonda [29]. Lamínulas contendo as células foram transferidas para uma câmara de perfusão construída sob medida no stage de um microscópio confocal Bio-Rad MRC-1024 (Hercules, CA), e foram observadas usando uma objetiva de imersão a óleo com aumento de 63X e 1,4 de NA (apertura numérica). O ER-Tracker foi excitado a 790 nm por excitação de dois fótons [29]. O Fluo-4/AM e o O Mag-Fluo-4/AM foram excitados a 488 nm usando um laser de Criptônio/Argônio. Imagens confocais foram adquiridas perto do meio do núcleo, pelo menos a 2 µm do limite superior ou inferior identificados por scannig confocal em série. Transientes globais de Ca²⁺ foram medidos no citosol; o line scan foi posicionado evitando a área nuclear.

3.4 Isolamento e eletrofisiologia de miócitos ventriculares adultos

Miócitos ventriculares foram isolados de ratos adultos (250g) por tratamento enzimático como descrito previamente [48]. Medidas de potencial de ação foram feitas a 35°C usando microeletrodos de “patch” de baixa resistência e um amplificador Axopatch 200A ou Axopatch-200B (Axon Instruments). A solução no interior da pipeta consistiu dos seguintes componentes (em mM): 130 KCl, 10 NaCl, 5 MgATP, 1 MgCl₂ e 10 mM HEPES; pH 7,2 (com KOH). A solução extracelular continha (em mM): 140 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂, 0,33 NaH₂PO₄, 1,8 CaCl₂ e 10 glucose; pH 7,4 (com NaOH). As células foram estimuladas (1 Hz) aplicando um pulso “clamp” breve (2-5 ms) de corrente despolarizante. Depois de aplicado, as células alcançaram o limiar e geraram um potencial de ação.

3.5 Construções adenovirais de Parvalbumina-DsRed

Construções codificando a proteína fluorescente vermelha DsRed fusionada à parvalbumina (PV-NLS, PV-NES, PVNLS-CD) foram desenhadas como descrito anteriormente [28]. Estas construções foram amplificadas por PCR e subclonadas em pShuttle-CMV (Bert Vogelstein, John Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD) por análise de restrição enzimática usando XhoI e XbaI para gerar pShuttle-CMV-PV-NLS-DsRed, pShuttle-CMV-PV-NES-DsRed, e pShuttle-CMV-PV-NLS-CD-DsRed. Células AdEasier-1 [49], derivadas da bactéria BJ5183 contendo o plasmídeo “backbone” pAdEasy-1, foram transformadas com pShuttle-CMV-PV-NLS-DsRed, etc. para gerar adenovirus recombinantes (pAd-PV-NLS-DsRed, etc.) que foram testados para resistência à canamicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) e submetidos a análise com a enzima de restrição PacI. Os adenovirus de Parvalbumina foram amplificados em células HEK-293, e

purificados como descrito anteriormente [49]. No quarto dia de cultura, 100 MOI de cada construção adenoviral foram diluídos em meio de cultura completo (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino e incubados nas células por 1 hora. O volume de meio de cultura usado para diluir as construções correspondeu a 60% do volume total normalmente usado para plaquear as células. Posteriormente, o volume foi completado para 100% . Os experimentos foram realizados 48 horas depois da infecção.

3.6 Imunofluorescência

Imunofluorescência confocal foi realizada como descrito previamente [29]. Resumidamente, cardiomiócitos plaqueados em lamínulas foram rapidamente lavados com 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 a temperatura ambiente em PBS 1% BSA contendo um dos seguintes anticorpos primários: anti- InsP₃R tipo II (1:100), anti-RyR-II (1:100), anti- α -actinina (1:200), anti-ANP (1:100), ou anti-NFATc3 (1:50). Posteriormente, as células foram lavadas três vezes (5 minutos cada) em PBS e incubadas por 1 hora em PBS 1% BSA contendo anticorpo secundário conjugado ao Alexa 488 (1:500) e Alexa 555 (1:500) da Molecular Probes (Eugene, OR) por 1 h . Algumas células, como indicado, foram marcadas com DAPI (1:100) por 1 h. 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). Imagens foram obtidas usando um microscópio confocal Bio-Rad MRC-1024 (Hercules, CA) e um microscópio confocal Zeiss LSM 510

Meta (Thornwood, NY) usando uma objetiva de imersão a óleo com aumento de 63X e 1,4 de NA (abertura numérica). Para detectar Alexa 488 usou-se excitação a 488 nm e observação a 505-550 nm, para Alexa 555 usou-se uma excitação de 543 nm e observação a 560-610 nm, e para DAPI usou-se excitação a 258 nm e observação a 461 nm.

3.7 Extração nuclear e citosólica

Separação de extratos de proteínas nucleares e citosólicas de cardiomiócitos foi realizada de acordo com as instruções da Pierce (Rockford, IL). A pureza da preparação foi verificada como descrito anteriormente [29;40].

3.8 Western Blot

Cardiomiócitos foram coletados como descrito acima e 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 [50], e 35 μg de extrato citosólico ou nuclear foram diluídos (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 gradiente de SDS-PAGE (sódio dodecil lauril sulfato-eletroforese em gel de poliacrilamida) em concentração de 4-20% (Bio Rad, Hercules, CA) para detectar Hsp90 e Oct-1. Para detectar RyR-II e $\text{InsP}_3\text{R-II}$ as proteínas nucleares e citosólicas foram separadas por SDS-PAGE 5%. Para detectar RyR-II no extrato total de proteína, 35 μg

foram separados por SDS-PAGE 15%. Para detectar ANP e calcineurina, 30 µg de extrato total de proteína foram separados por SDS-PAGE 15%. Todos esses reagentes foram obtidos da Amersham (Buckinghamshire, UK). Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA), as quais foram corada posteriormente com solução de Ponceau (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) para verificar a qualidade da transferência. Em seguida as mesmas foram colocadas por 1 hora em solução de bloqueio (Tampão salino de Tris contendo 0,2% de Tween 20 (TBST) e 5% de leite desnatado) e posteriormente incubadas com um dos seguintes anticorpos por 2 horas a temperatura ambiente: anti-Hsp90 (1:1000), anti-Oct-1 (1:1000), anti-RyR (1:1000), anti-InsP₃R tipo II (1:200), anti-Na⁺/K⁺ ATPase (1:1000) , anti-calcineurina (1:2000) anti-ANP (1:200), e anti-actina (1:2000). Depois de lavadas com TBST, 15 minutos por quatro vezes, as membranas foram incubadas em anticorpos secundários conjugados à peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000, ou Goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000) a temperatura ambiente por 1 hora e lavados novamente com TBST. A imunodeteção foi realizada usando reação de quimioluminescência.

3.9 Análise estatística

Todos os dados representam pelo menos três experimentos independentes e foram expressos pela média ± erro padrão da média. 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 $p < 0,05$ (representados por *) indicam diferença estatisticamente significativa.

4. Resultados

4.1 Cardiomiócitos neonatos contêm maquinaria especializada de sinalização de Ca^{2+} nuclear.

O retículo nucleoplasmático é uma estrutura reticular dentro do núcleo que armazena Ca^{2+} e o libera no nucleoplasma através dos InsP_3Rs ou pelos RyRs [29;40]. Para detectar a presença do retículo nucleoplasmático em cardiomiócitos neonatos, as células foram incubadas com a sonda marcadora de retículo endoplasmático ER-Tracker, e posteriormente examinadas usando microscopia de dois fótons [29]. Imagens confocais de células contraíndo espontaneamente foram adquiridas perto do meio do núcleo, pelo menos a 2 μm do limite superior ou inferior identificados por scannig confocal em série. A observação de planos focais em sequência através do núcleo verificou que esta estrutura reticular está no interior do núcleo (*Fig. 2A*). Para determinar se estas estruturas armazenam Ca^{2+} , como foi observado previamente em células SkHep-1 e C2C12, os cardiomiócitos foram incubados com a sonda de baixa afinidade ao Ca^{2+} Mag-Fluo-4/AM, ($K_d = 22 \mu\text{M}$) [29]. Assim como o ER-Tracker, a fluorescência do Mag-Fluo-4 também detectou uma rede intranuclear fina e ramificada de armazenamento de Ca^{2+} (*Fig. 2B*).

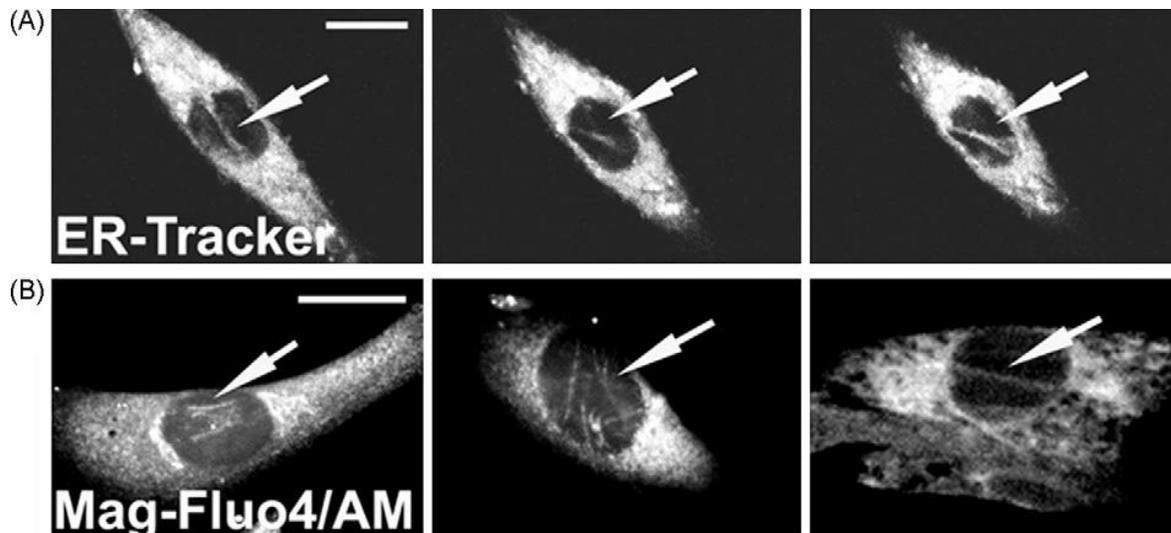


Figura 2. O núcleo de cardiomiócitos neonatos contém o retículo nucleoplasmático. (A) Três planos focais em sequência de um cardiomiócito marcado com a sonda ER-Tracker foram visualizados por microscopia de dois-fótons. As imagens mostram a presença de estruturas reticulares atravessando o núcleo da célula (setas). Barra de escala = 10 µm. (B) Diferentes campos de cardiomiócitos marcados com Mag-Fluo-4/AM foram visualizados por microscopia confocal. Imagens mostram a presença de estoques de Ca^{2+} no núcleo das células (setas). Barra de escala = 10 µm.

Dois canais intracelulares de liberação de Ca^{2+} já foram descritos em cardiomiócitos, os RyRs e os InsP_3R . Enquanto o RyR-II é o principal canal de liberação de Ca^{2+} encontrado no retículo sarcoplasmático [15], a distribuição do InsP_3R -II em cardiomiócitos já foi reportada no retículo sarcoplasmático e na região nuclear [18;51;52]. Para verificar se estes canais de Ca^{2+} são expressos dentro do núcleo de cardiomiócitos neonatos, frações de proteínas nucleares e citosólicas foram analisadas por Western Blot. Hsp90 e Oct-1 foram usados como marcadores para verificar a pureza das frações citosólicas e nucleares respectivamente (Fig. 3A) [29;40]. Foi observado que RyR-II e InsP_3R -II são expressos não somente no citosol, mas também no núcleo (Fig. 3B). A distribuição nuclear destes canais intracelulares de Ca^{2+} foi investigada por imunofluorescência confocal e RyR-II e InsP_3R -II foram detectados no interior do núcleo

de cardiomiócitos (*Fig. 3C*, setas). Para confirmar se o InsP₃R-II é expresso em cardiomiócitos e não em fibroblastos contaminantes da cultura, as células foram marcadas com InsP₃R-II e α -actinina (*Fig. 3C*). Além disso, as células foram marcadas com RyR-II e InsP₃R-II e foi observado que no retículo nucleoplasmático de cardiomiócitos, estes canais intracelulares de Ca²⁺ não co-localizam (*Fig.3C*). Em conjunto, estes resultados mostram que existe uma estrutura altamente elaborada de armazenamento de Ca²⁺ dentro do núcleo que expressa RyR-II e InsP₃R-II.

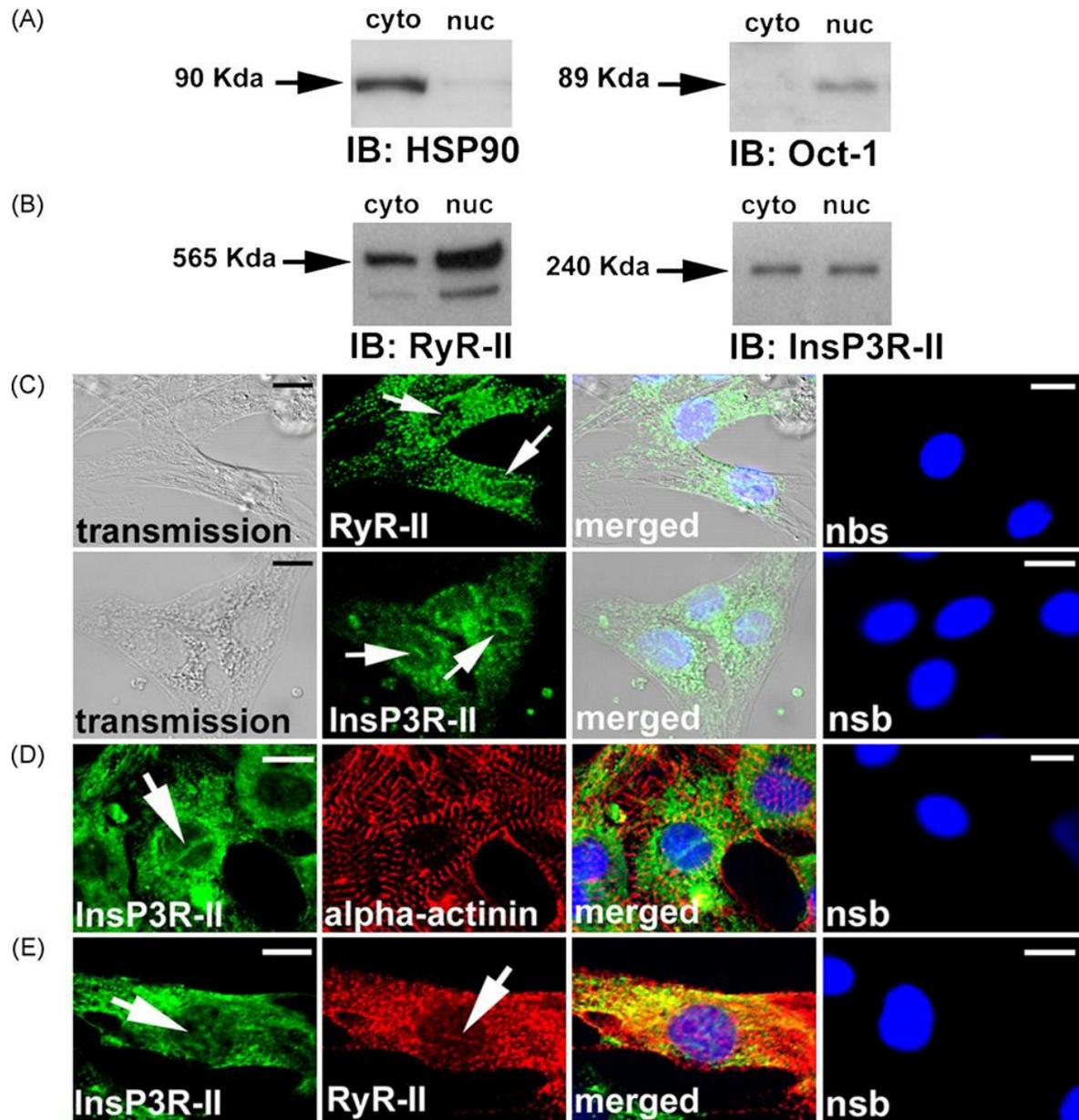


Figura 3. Cardiomiócitos neonatos expressam $\text{InsP}_3\text{R-II}$ e RyR-II no retículo nucleoplasmático. (A) Frações citosólicas e nucleares marcadas com anticorpos anti-Hsp90 e anti-Oct-1. Hsp90 foi encontrado só na fração citosólica e Oct-1 foi expresso só no extrato nuclear. (B) Distribuição do RyR-II e $\text{InsP}_3\text{R-II}$ em frações subcelulares de cardiomiócitos. O RyR-II e $\text{InsP}_3\text{R-II}$ foram expressos no extrato citosólico e nuclear. (C) Imunofluorescência confocal mostra que o RyR-II e $\text{InsP}_3\text{R-II}$ são expressos no núcleo (setas). (D) Cardiomiócitos foram marcados com $\text{InsP}_3\text{R-II}$ (verde) e α -actinina (vermelho) para confirmar se $\text{InsP}_3\text{R-II}$ é expresso em cardiomiócitos. (E) Cardiomiócitos foram marcados com $\text{InsP}_3\text{R-II}$ (verde) e RyR-II (vermelho). Imagens confocais mostram que RyR-II e $\text{InsP}_3\text{R-II}$ não co-localizam no retículo nucleoplasmático. Em C-E: painéis da direita mostram controles negativos. Resultados são representativos de sete experimentos independentes. Os núcleos foram marcados com DAPI. Barra de escala = 10 μm .

4.2 O Tamponamento de Ca^{2+} altera o transiente global de Ca^{2+} em cardiomiócitos.

O uso de proteínas que se ligam ao Ca^{2+} para observar a sinalização de Ca^{2+} tem sido amplamente reportado [28;31;42;53]. O direcionamento da proteína quelante de Ca^{2+} Parvalbumina (PV) para o núcleo (PV-NLS) ou para o citosol (PV-NES) permite o tamponamento seletivo de Ca^{2+} livre no compartimento celular apropriado [28;31;42]. Neste trabalho foi utilizado um vetor adenoviral para as construções de PV [42]. PV foi fusionada à proteína fluorescente vermelha DsRed para monitorar a eficácia da infecção e para confirmar a sua correta localização subcelular. Também foi usada uma forma mutada de PV-NLS (PV-NLS-CD), que tem um dos dois sítios de ligação ao Ca^{2+} (domínio CD) inativado [28]. Este mutante de PV tem um efeito intermediário na inibição de sinais de Ca^{2+} quando comparado ao PV-NLS [28;42]. Usando estes adenovirus, foi visto que aproximadamente 90% das células foram infectadas (dados não mostrados). Também foi observada a correta localização da PV no núcleo ou no citosol de cardiomiócitos infectados com NLS e NES, respectivamente (*Fig. 4A*). A localização de PV-NLS-CD foi idêntica à de PV-NLS (dados não mostrados). Em conjunto, estes dados mostram que é possível expressar PV seletivamente e eficientemente em compartimentos celulares específicos em cardiomiócitos.

É amplamente aceito que o Ca^{2+} tem um papel fundamental no acoplamento excitação-contração (ECC) [15;54;55]. Para elucidar se o Ca^{2+} nuclear pode influenciar os transientes globais de Ca^{2+} , cardiomiócitos neonatos foram marcados com a sonda sensível ao Ca^{2+} Fluo-4/AM, e visualizados por microscopia confocal. Os transientes globais de Ca^{2+} foram medidos no citosol e o line scan foi posicionado evitando a área nuclear. Os painéis superiores da *Fig. 4B-E* mostram imagens representativas de “line-scanning”

adquiridas de cardiomiócitos contraindo espontaneamente sob condições controle, ou infectados com Ad-PV-NES, Ad-PV-NLS, ou Ad-PV-NLS-CD. Debaixo de cada line scanning há uma representação gráfica de cada célula selecionada. Como já era esperado, o tamponamento de Ca^{2+} citosólico reduziu a amplitude dos transientes globais de Ca^{2+} [56]. Foi observada uma diminuição de 72% no pico do transiente de Ca^{2+} em células infectadas com Ad-PV-NES quando comparadas ao controle (U.A. = 100 em 55 controles vs. $27,7 \pm 5,3$ em 47 Ad-PV-NES; $p < 0,05$). Surpreendentemente, o tamponamento de Ca^{2+} nuclear também causou uma diminuição na amplitude dos transientes globais de Ca^{2+} em 49% (U.A. = 100 em 55 controles vs. $51 \pm 11,7$ em 50 Ad-PV-NLS) quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Em contraste, a frequência de batimentos foi 96% mais alta em células infectadas com Ad-PV-NES (batimentos/seg = $0,18 \pm 0,01$ em 55 controles vs. $0,35 \pm 0,05$ em 47 Ad-PV-NES) e 44% mais alta em células infectadas com Ad-PV-NLS (batimentos/seg = $0,18 \pm 0,01$ em 55 controles vs. $0,26 \pm 0,04$ em 50 Ad-PV-NLS) quando comparadas a cardiomiócitos controle ($p < 0,05$). Apesar de que o Ad-PV-NLS-CD não afetou significativamente a frequência de batimentos dos cardiomiócitos, teve um efeito intermediário na amplitude dos transientes globais de Ca^{2+} , diminuindo o sinal em 36% (U.A. = 100 em 55 controles vs. $64,3 \pm 18,5$ em 14 Ad-PV-NLS-CD) quando comparado a células controle ($p < 0,05$). Os gráficos de barras (*Fig. 4F-G*) sumarizam estes dados.

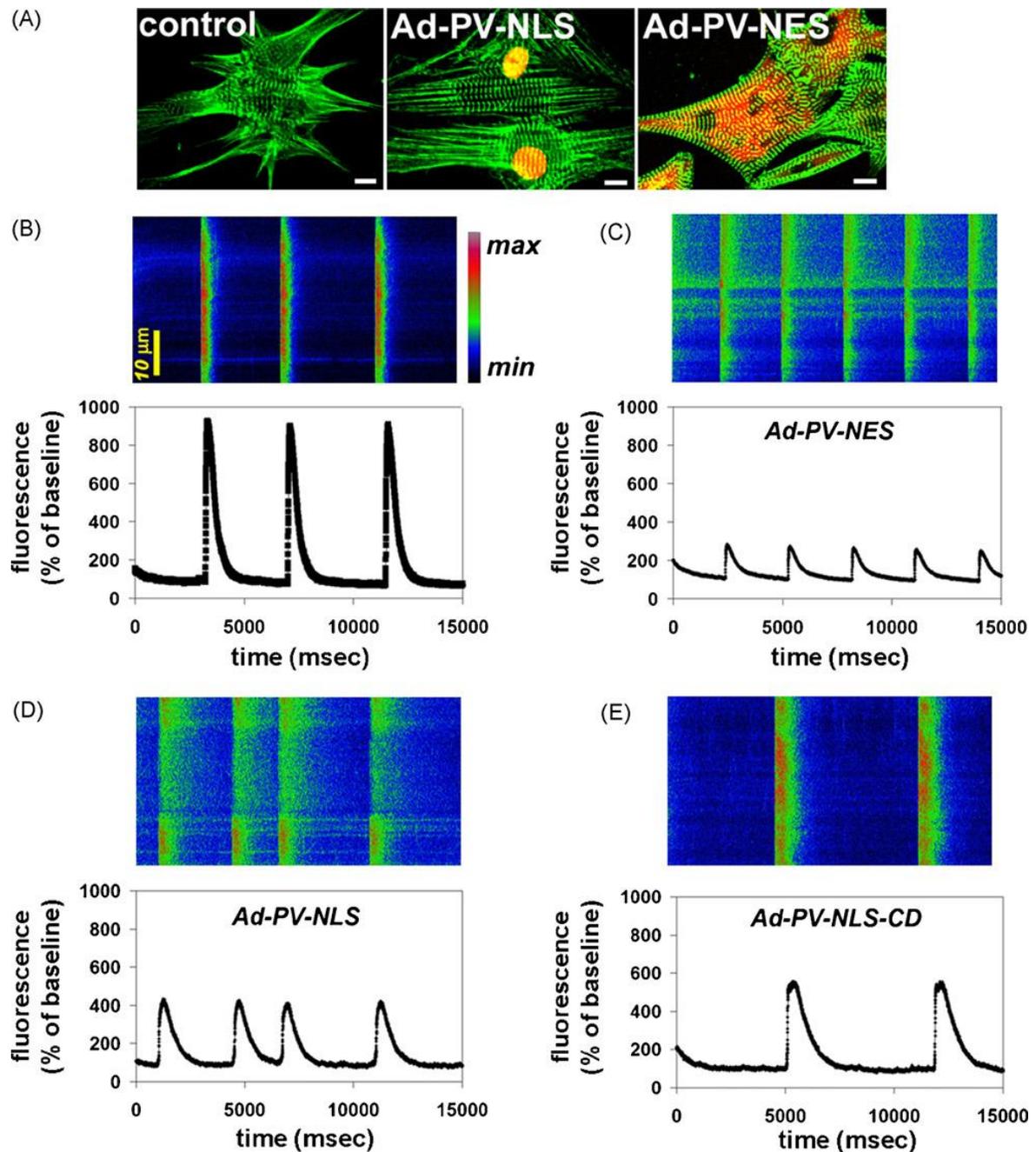


Figura 4. O tamponamento de Ca^{2+} nuclear ou citosólico atenua a amplitude e aumenta a frequência dos transientes globais de Ca^{2+} em cardiomiócitos neonatos. (A) Imagens representativas das construções de PV em cardiomiócitos. A cor vermelha demonstra a distribuição subcelular de PV, a cor verde indica a marcação de α -actinina em cardiomiócitos. Barra de escala = 10 μ m. (B-E) Transientes globais de Ca^{2+} em cardiomiócitos. As células foram examinadas 48 horas após a infecção com a construção adenoviral respectiva e comparadas ao controle (células não infectadas). O Ca_i^{2+} foi monitorado com Fluo-4/AM usando o line scanning da microscopia confocal. O line scan foi posicionado no citosol evitando a área nuclear. (continua).

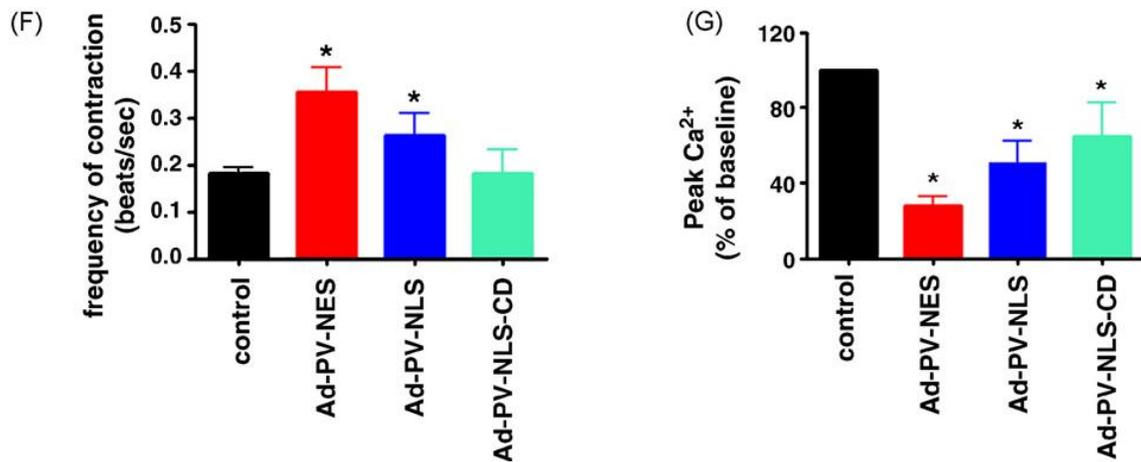


Figura 4 (continuação). O tamponamento de Ca²⁺ nuclear ou citosólico atenua a amplitude e aumenta a frequência dos transientes globais de Ca²⁺ em cardiomiócitos neonatos. As imagens foram pseudocoloridas segundo a escala de cores no painel B. O gráfico debaixo de cada painel representa o percentual de aumento na fluorescência relativo à linha de base. Ad-PV-NES e Ad-NLS-NLS atenuam a amplitude dos transiente globais de Ca²⁺, mas aumentam a frequência de contração. Cardiomiócitos expressando o mutante CD da PV no núcleo também mostraram uma atenuação na amplitude do sinal de Ca²⁺, mas não houve uma mudança significativa na frequência de contração. **(F)** Sumário dos efeitos do tamponamento de Ca²⁺ citosólico ou nuclear na frequência de contração. **(G)** Sumário dos efeitos do tamponamento de Ca²⁺ citosólico ou nuclear na amplitude do transiente de Ca²⁺. Os resultados são representativos de cinco experimentos independentes.

Para verificar o mecanismo pelo qual tais alterações nos transientes de Ca²⁺ ocorreram, foram analisados os níveis de expressão do RyR-II em cardiomiócitos nas diferentes condições de tamponamento de Ca²⁺. A Fig. 5 mostra que tanto o tamponamento do Ca²⁺ citosólico quanto do Ca²⁺ nuclear, causou uma diminuição nos níveis de expressão do RyR-II em 28,2% e 26,7%, respectivamente (U.A. = 100 em 3 controles vs. 73,25 ± 0,47 em 3 Ad-PV-NLS vs. 71,72 ± 7,25 em 3 Ad-PV-NES; p < 0,05) (Fig. 5A e B) (n = 3 experimentos).

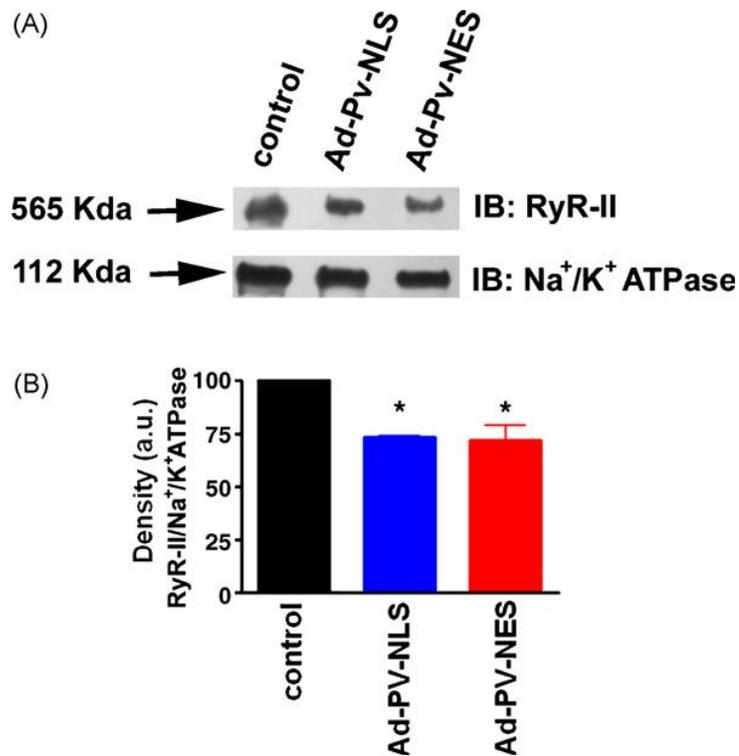


Figura 5. O tamponamento de Ca²⁺ nuclear ou citosólico diminui a expressão do RyR-II em cardiomiócitos neonatos. (A) Western Blots representativos de RyR-II e Na⁺/K⁺ ATPase em cardiomiócitos controle e infectados com Ad-PV-NLS e Ad-PV-NES. A Na⁺/K⁺ ATPase foi usada como controle interno. (B) Análise densitométrica. A expressão de RyR-II teve uma diminuição de 26,7% e de 28,2% quando o Ca²⁺ nuclear ou citosólico foi tamponado, respectivamente (P < 0,05; n = 3 experimentos).

Para investigar se o tamponamento de Ca²⁺ nuclear também afeta as propriedades do potencial de ação, miócitos ventriculares adultos, isolados a fresco, foram utilizados (Fig. 6). De forma similar aos cardiomiócitos neonatos, os adultos apresentam o retículo nucleoplasmático como mostrado em células incubadas com Mag-Fluo-4/AM (Fig. 6A). Também foi observado que Ad-PV-NES e Ad-PV-NLS são expressos no compartimento correto (Fig. 6B). Potenciais de ação foram medidos em cardiomiócitos através da técnica de patch clamp de células inteiras, estimulados a 1 Hz. Figuras representativas das medidas de potencial de ação para células controle e infectadas com Ad-PV-NES e Ad-PV-NLS são mostradas na Figura 6C. Foi observada um prolongamento de aproximadamente 34% na duração do potencial de ação (APD) em células infectadas

com Ad-PV-NLS, quando comparadas com células controle (APD 90% = $20,23 \pm 1,48$ ms em 16 controles vs. $27,19 \pm 1,71$ ms em 23 Ad-PV-NLS; $p < 0,05$) (Fig. 6D). Apesar de que houve uma tendência para uma APD mais longa em cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NES, os dados não foram significativamente diferentes do controle. Em conjunto, as Fig. 4-6 mostram que o tamponamento de Ca^{2+} nuclear e cistólico pode controlar eventos celulares similares como a diminuição na amplitude dos transientes globais de Ca^{2+} e a expressão do RyR-II, assim como o aumento na frequência de batimentos; ou eventos celulares distintos como o aumento na duração do potencial de ação.

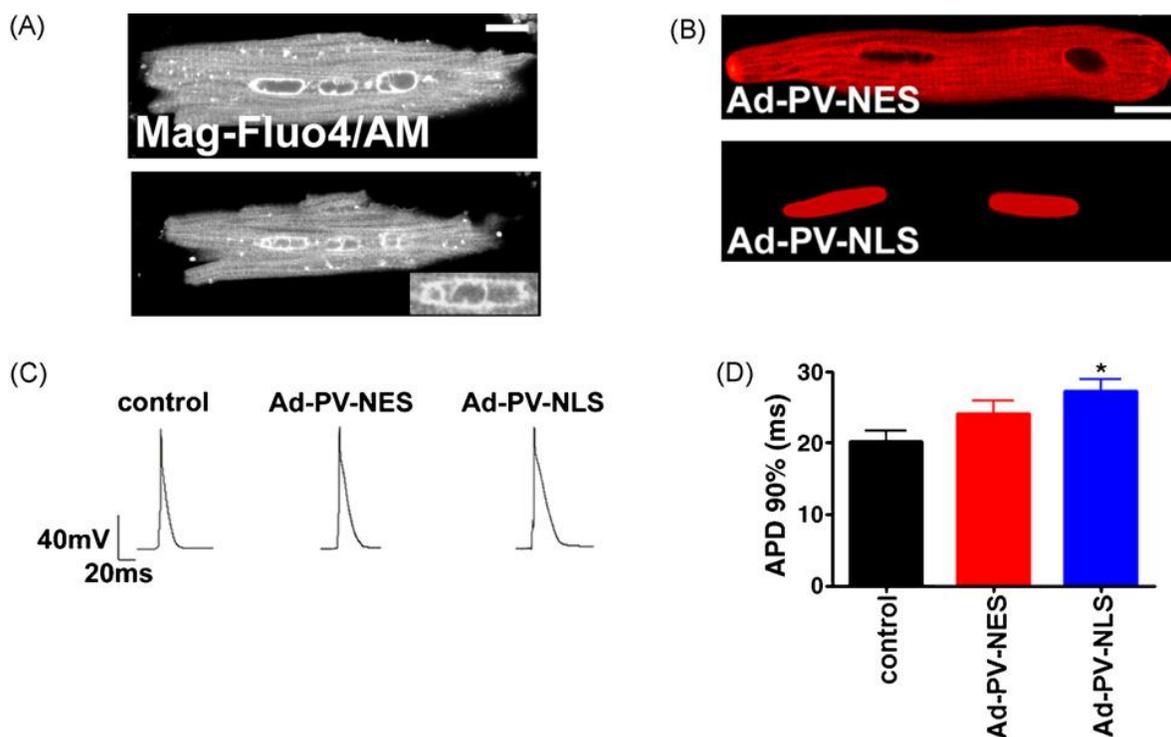


Figura 6. O tamponamento de Ca^{2+} nuclear influencia a atividade elétrica de miócitos ventriculares adultos. (A) Dois planos focais de um cardiomiócito adulto marcado com Mag-Fluo-4/AM mostrando o retículo nucleoplasmático. Barra de escala = 10 μ m. (B) Imagens representativas das construções de PV em cardiomiócitos adultos. Barra de escala = 10 μ m. (C) Amostras de potenciais de ação medidos em células controle e infectadas com Ad-PV-NES e Ad-PV-NLS. Medidas da duração do potencial de ação (APD) foram feitas por patch-clamp em cardiomiócitos estimulados a 1 Hz. (D) O gráfico de barras mostra a média da APD a 90% da repolarização em cada grupo experimental. A APD é significativamente maior em cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS ($p < 0,05$).

4.3 O tamponamento de Ca^{2+} nuclear induz aumento da área nuclear.

Surpreendentemente, quando os cardiomiócitos neonatos foram infectados com Ad-PV-NLS, foi observado aumento da área nuclear (*Fig. 7A e B*). Este efeito não foi visto em células infectadas com Ad-PV-NES (dados não mostrados). Posteriormente, foi investigado se o aumento da área nuclear observado foi resultado de suprerexpressão de proteína no núcleo ou do tamponamento de Ca^{2+} nuclear. Para isso, foram usados cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS-CD marcados com α -actinina (verde) e DAPI (azul), e sua área nuclear foi comparada à área nuclear de células controle e infectadas com Ad-PV-NLS. Foi observado que a área nuclear de cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS foi aproximadamente o dobro da área nuclear em células controle (número de megapixels = $1,19 \pm 0,13$ em 23 controles vs. $2,17 \pm 0,39$ em 35 Ad-PV-NLS), ($p < 0,05$). Não houve diferença na área nuclear de células infectadas com Ad-PV-NLS-CD comparadas ao controle (número de megapixels = $1,19 \pm 0,13$ em 23 controles vs. $1,56 \pm 0,06$ em 13 Ad-PV-NLS-CD) (*Fig. 7A e B*).

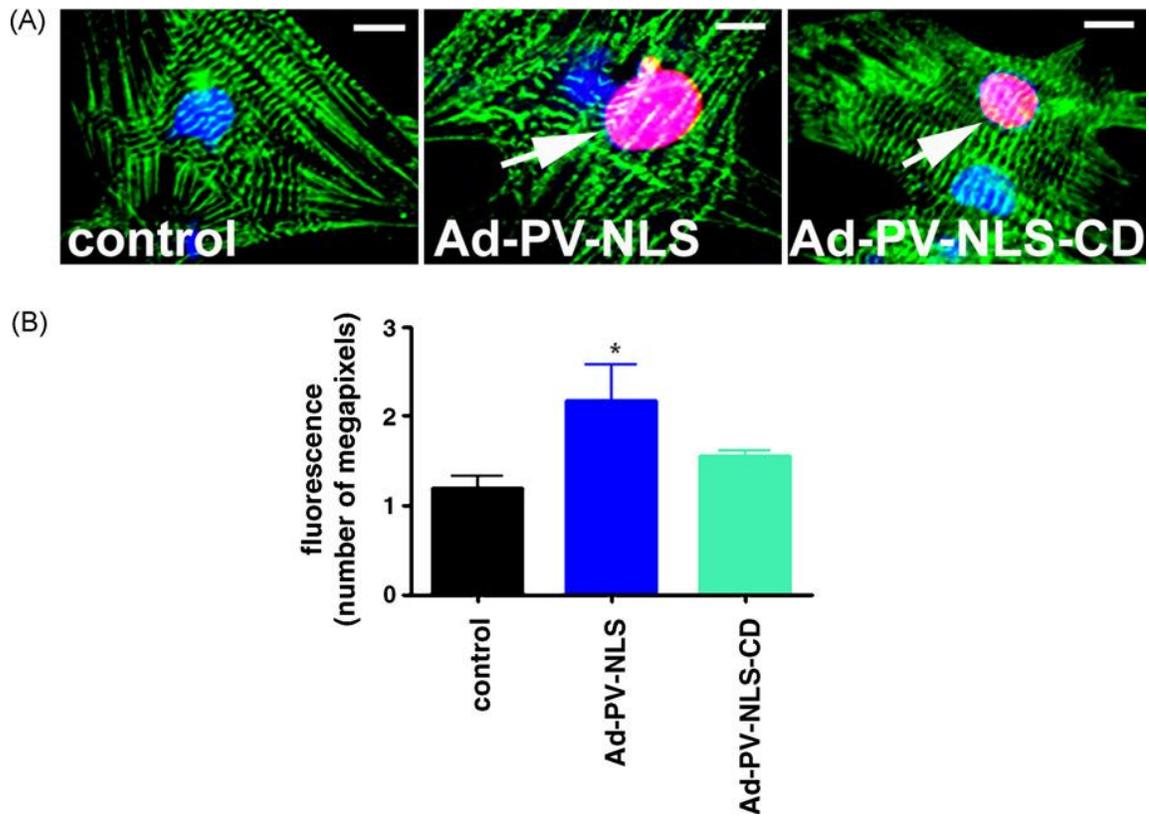


Figura 7. Cardiomiócitos neonatos infectados com Ad-PV-NLS mostram aumento da área nuclear. (A) Imagens representativas mostrando o aumento da área nuclear em cardiomiócitos neonatos infectados com Ad-PV-NLS (vermelho) marcados com DAPI (azul) e α -actinina (verde). Barra de escala = 10 μ m. (B) O gráfico de barras mostra a média da área nuclear medida em cardiomiócitos marcados com DAPI. Após 48 horas de infecção com Ad-PV-NLS, o tamanho do núcleo aumentou para aproximadamente o dobro do das células controle (não infectadas) ($p < 0,05$). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Para ter uma visão mais detalhada das vias de sinalização envolvidas no aumento da área nuclear, foram investigados os níveis de expressão de um marcador de estresse celular como a fosfatase dependente de cálcio-calmodulina, calcineurina [57;58]. Foi encontrado que em cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS, a expressão de calcineurina foi 115% mais alta do que em células controle (U.A. = 100 em 5 controles vs. $215,2 \pm 27,76$ em 5 Ad-PV-NLS; $p < 0,05$) (Fig. 8A e B) ($n = 5$ experimentos). Os níveis de expressão da calcineurina não foram alterados em células infectadas com Ad-PV-NLS-CD (dados não

mostrados). Para confirmar se o aumento da área nuclear resultou da ativação da calcineurina, células controle e infectadas com Ad-PV-NLS com o inibidor de calcineurina Ciclosporina A (CsA - 1 μ M) [59]. O tratamento com CsA preveniu o aumento da área nuclear em cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS (*Fig.8C e D*). O gráfico de barra da *Fig. 8D* mostra que a área nuclear aumentou em células infectadas com Ad-PV-NLS. No entanto, o tratamento com CsA preveniu esse aumento na área nuclear. Além disso, o tratamento com CsA em células controle não afetou sua área nuclear (número de megapixels = 1,70 \pm 0,04 em 64 controles vs. 1,79 \pm 0,03 em 55 controles + CsA) (*Fig 8C e D*) Posteriormente foi analisada a localização de NFAT, que é um efetor transcricional “downstream” da calcineurina [58]. Na resposta hipertrófica, a calcineurina causa a desfosforilação de NFAT e a sua subsequente translocação para o núcleo [58;60]. A *Fig. 8E* mostra a localização nuclear de NFAT em células infectadas com Ad-PV-NLS. Além disso, foi encontrado um maior número de células infectadas com Ad-PV-NLS com NFAT no núcleo comparado a células infectadas com Ad-PV-NLS-CD (% de células com NFAT nuclear: 24,4 \pm 2,16 em 46 controles vs. 27,3 \pm 2,6 em 19 Ad-PV-NLS-CD vs. 83 \pm 4,2 em 61 Ad-PV-NLS) (*Fig. 8F*). Células controle tratadas com fenilefrina (phe) foram usadas como controle positivo para a translocação de NFAT para o núcleo [61]. Como esperado, o tratamento com phe levou a uma maior porcentagem de células controle com NFAT nuclear (% de células com NFAT nuclear: 24,4 \pm 2,16 em 46 controles vs. 66,7 \pm 6,6 em 38 controles + phe) (*Fig. 8F*) [61]. Posteriormente, foram investigados os efeitos da CsA na localização celular de NFAT em cardiomiócitos controle e infectados com Ad-PV-NLS (*Fig. 8G*) A *Fig. 8H* mostra uma maior porcentagem de células infectadas com Ad-PV-NLS com NFAT nuclear (% de células com NFAT nuclear = 20,0 \pm 3,6 em 84 controles vs. 75,5 \pm 3,6 em 115 Ad-PV-NLS; p < 0,05). Por outro lado, o tratamento com CsA em

cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS preveniu a translocação de NFAT e não alterou a sua localização em células controle (% de células com NFAT nuclear = $20,0 \pm 3,6$ em 84 controles vs. $19,56 \pm 1,8$ em 145 controles + CsA) (Fig 8G e H).

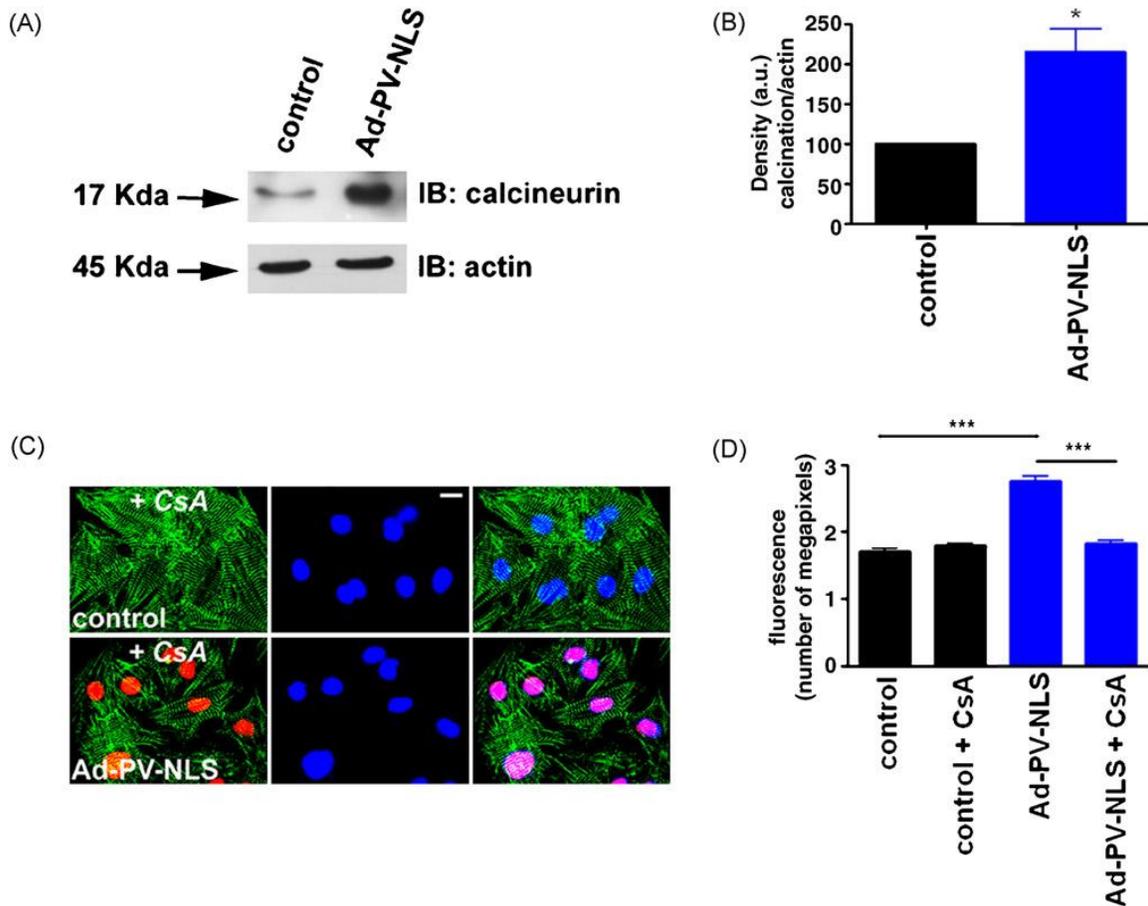


Figura 8. O tamponamento de Ca^{2+} nuclear altera a expressão de calcineurina e a localização de NFAT em cardiomiócitos neonatos. (A) Western Blots representativos de calcineurina e actina em cardiomiócitos controle e infectados com Ad-PV-NLS. A actina foi usada como controle interno. (B) Análise densitométrica mostrando que cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS têm um aumento de 115% na expressão de calcineurina comparado a células controle ($p < 0,05$; $n = 5$ experimentos). (C) Imagens representativas de cardiomiócitos neonatos controle e infectados com Ad-PV-NLS (vermelho) marcados com DAPI (azul) e α -actinina (verde) mostrando o efeito do tratamento com Ciclosporina A (CsA) na área nuclear. Barra de escala = 10 μ m. (D) Média da área nuclear medida em cardiomiócitos marcados com DAPI. O tratamento com CsA não afetou células controle, mas preveniu o aumento da área nuclear em cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS (controle, $n = 64$ células; controle + CsA, $n = 55$ células; Ad-PV-NLS, $n = 49$ células; Ad-PV-NLS + CsA, $n = 62$ células; $p < 0,05$). (continua).

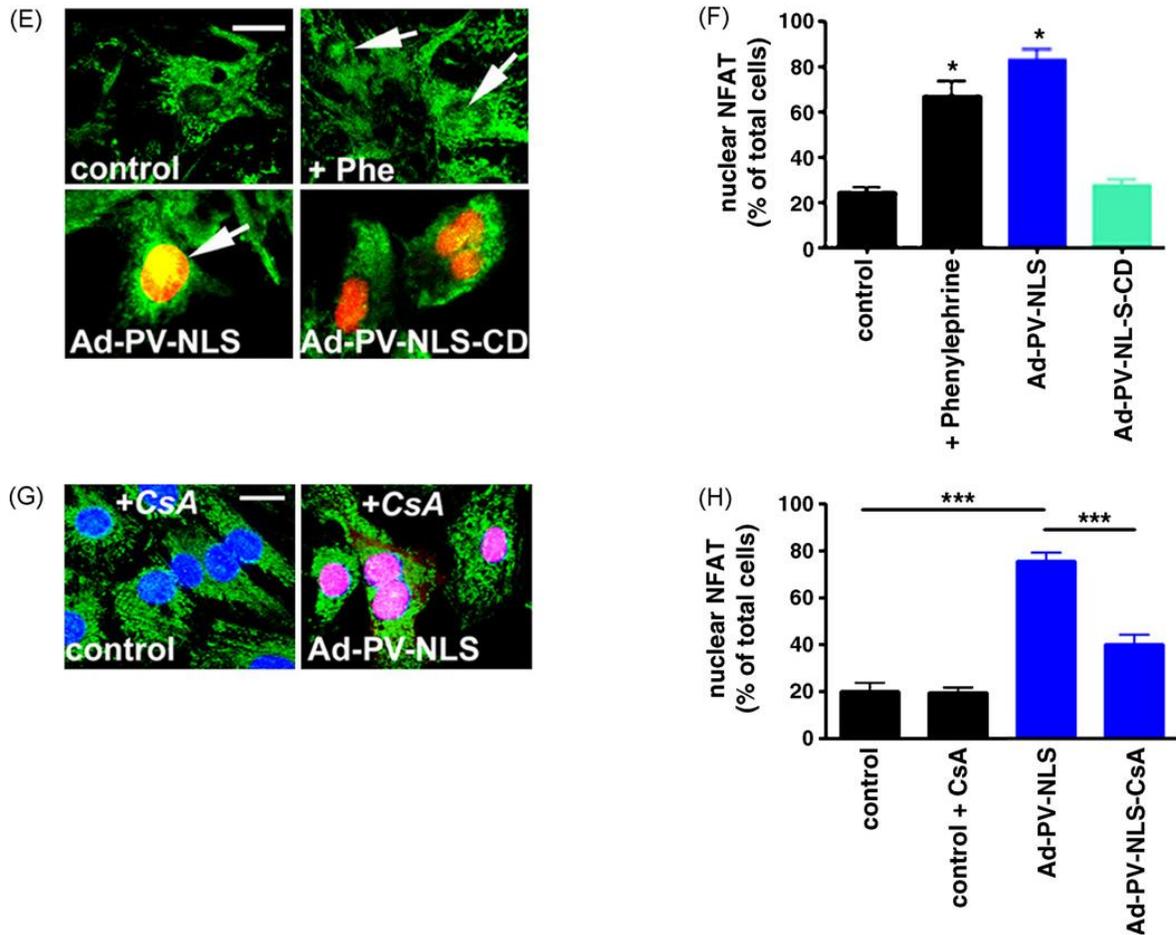


Figura 8 (continuação). O tamponamento de Ca^{2+} nuclear altera a expressão de calcineurina e a localização de NFAT em cardiomiócitos neonatos.

(E) O tamponamento de Ca^{2+} nuclear causa a translocação de NFAT para o núcleo (ver seta no painel inferior esquerdo). Os painéis superiores mostram uma célula controle, e uma célula controle tratada com fenilefrina (Phe) marcadas com NFAT (verde). Os painéis inferiores mostram imagens sobrepostas de células infectadas com Ad-PV-NLS e Ad-PV-NLS-CD (vermelho) marcadas com NFAT (verde). A marcação amarela forte no núcleo indica a alta translocação de NFAT para o núcleo. Barra de escala = 10 μm. **(F)** Porcentagem de células mostrando a localização nuclear de NFAT. O tamponamento de Ca^{2+} nuclear e o tratamento de células controle com phe levou à localização nuclear de NFAT em uma porcentagem maior de células comparado ao controle e a células infectadas com Ad-PV-NLS-CD (controle, n = 46 células; controle + phe, n = 38 células; Ad-PV-NLS, n = 61 células; Ad-PV-NLS-CD, n = 19 células; p < 0,05). **(G)** Imagens sobrepostas de células controle e infectadas com Ad-PV-NLS (vermelho) marcadas com NFAT (verde) e DAPI (azul) tratadas com CsA. Barra de escala = 10 μm. **(H)** Porcentagem de células com localização nuclear de NFAT. O tratamento com CsA não afetou a localização de NFAT em células controle. A localização nuclear de NFAT foi reduzida significativamente em células infectadas com Ad-PV-NLS e tratadas com CsA (controle, n = 84 células; controle + CsA, n = 145 células; Ad-PV-NLS, n = 115 células; Ad-PV-NLS + CsA, n = 165 células; p < 0,001).

Também foram investigados os níveis de expressão de outro marcador de estresse celular, o ANP em células infectadas com Ad-PV-NLS [62]. Os níveis de expressão de ANP não foram alterados em nenhuma das células infectadas. No entanto, o agente hipertrofico phe aumentou a expressão de ANP em células controle como era esperado (n = 5 experimentos) (*Fig. 9A*) [61]. A fenilefrina também levou à redistribuição dos grânulos de ANP, em células controle, da região perinuclear para a periferia celular (*Fig. 9B*). Posteriormente, foi investigado se o tamponamento de Ca^{2+} nuclear causaria redistribuição dos grânulos de ANP. Foi observado que de forma similar ao tratamento com phe, os cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS também tiveram os grânulos de ANP espalhados pela célula (*Fig 9C*). Em conjunto, estes resultados mostram que o tamponamento de Ca^{2+} nuclear é suficiente para causar aumento da área nuclear em cardiomiócitos neonatos. O aumento da área nuclear foi acompanhado por um aumento na expressão de calcineurina, translocação de NFAT para o núcleo e realocização subcelular de ANP em cardiomiócitos.

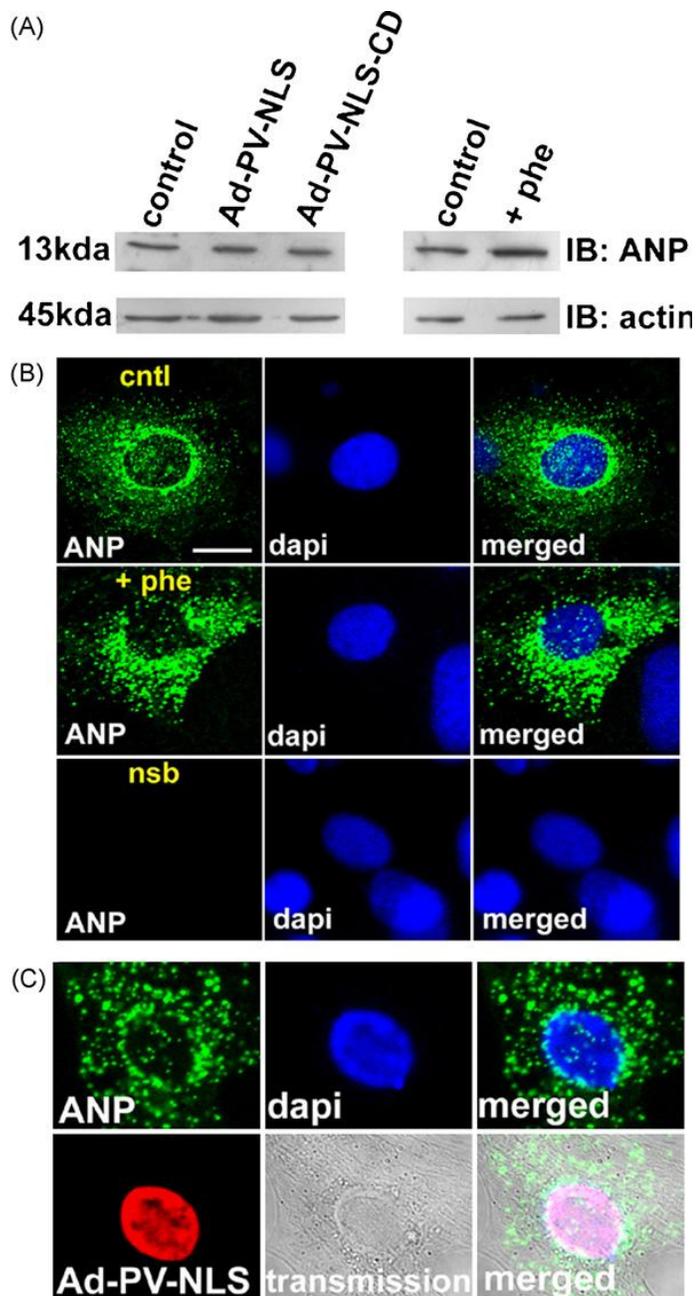


Figura 9. O tamponamento de Ca^{2+} nuclear leva à redistribuição de ANP em cardiomiócitos neonatos. (A) Os níveis de expressão de ANP não foram alterados em nenhuma das células infectadas. (B) Os grânulos de ANP (verde) foram predominantemente localizados na região perinuclear que contém o complexo de Golgi. A adição de fenilefrina (painéis do meio) resultou em um aumento na expressão de ANP e na redistribuição dos grânulos de ANP comparado ao controle (painéis superiores). O DAPI (azul) foi usado para marcar os núcleos. Os painéis inferiores mostram um controle negativo. (C) O tamponamento de Ca^{2+} nuclear resultou na redistribuição dos grânulos de ANP pela célula. O painel superior direito mostra uma imagem sobreposta de ANP (verde) e DAPI (azul). O painel inferior direito mostra uma imagem transmitida (cinza) e uma imagem sobreposta de ANP (verde) e Ad-PV-NLS (vermelho). Barra de escala = 10 μ m.

5. Discussão

O Ca^{2+} livre dentro do núcleo tem efeitos biológicos específicos que diferem dos efeitos do aumento de Ca^{2+} citosólico [25-31;42;63]. Sob certas circunstâncias, o Ca^{2+} pode se espalhar passivamente do citosol para o interior do núcleo através do poro nuclear [37;64]. No entanto, múltiplos estudos têm mostrado que a introdução de mensageiros mobilizadores de Ca^{2+} em núcleos isolados ou em núcleos de células intactas, gera sinais de Ca^{2+} independentes das mudanças na concentração do Ca^{2+} citosólico [29;36;65-69]. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que o núcleo contém o retículo nucleoplasmático, uma estrutura de sinalização de Ca^{2+} contínua ao retículo endo/sarcoplasmático e ao envelope nuclear, capaz de liberar Ca^{2+} no nucleoplasma de forma independente ao citosol [29;40]. Invaginações do retículo endoplasmático e do envelope nuclear que penetram no interior do núcleo têm sido observadas em múltiplos tipos celulares de mamíferos e de plantas [29;70-72]. Neste estudo, foi mostrada pela primeira vez a presença do retículo nucleoplasmático em cardiomiócitos. Tanto miócitos neonatos quando adultos apresentaram esta estrutura. A presença de tal subcompartimento nuclear de sinalização de Ca^{2+} poderia ter considerável importância, já que suas invaginações nucleares poderiam formar regiões ricas em Ca^{2+} dentro do núcleo, permitindo a regulação de funções celulares especializadas.

A expressão nuclear de RyRs e de InsP_3Rs tem sido demonstrada em uma grande variedade de células, incluindo cardiomiócitos neonatos de rato [29;40;63;66;73-75]. Além disso, é amplamente sabido que o núcleo possui a capacidade de produzir ligantes que ativam estes receptores [65;76]. Tem sido observado que no núcleo de células não excitáveis, o Ca^{2+} liberado do InsP_3R regula seletivamente a atividade kinase [29], transativação de Elk-1 [28], e a ativação do fator aumentador de transcrição (TEF/TEAD) [31]; estes eventos são diferentes dos controlados pelos InsP_3Rs citosólicos. Além disso,

aumentos de Ca^{2+} nuclear e não de Ca^{2+} citosólico são essenciais para ativar fatores de transcrição como CRE [25]. A presença de um variante de splicing do RyR foi observada no retículo nucleoplasmático de cardiomiócitos HL-1 [77]. No entanto, esta é a primeira vez que a presença do RyR-II e do $\text{InsP}_3\text{R-II}$ é demonstrada no retículo nucleoplasmático de um tipo celular. É importante notar que estes dois canais não co-localizam no núcleo de cardiomiócitos, provavelmente devido às suas diferentes funções na célula. A funcionalidade do InsP_3R e do RyR no retículo nucleoplasmático têm sido demonstrada em células SkHep-1 e C2C12, respectivamente [29;40]. Além disso, o envolvimento da sinalização de Ca^{2+} perinuclear dependente de InsP_3 no processo de acoplamento excitação-transcrição foi demonstrado em miócitos cardíacos [18]. No entanto, um papel específico para estes canais no núcleo de cardiomiócitos ainda não foi definido.

Muitos tipos celulares co-expressam RyR e InsP_3R [78;79]. Em células que co-expressam estes dois canais intracelulares, a sinalização de Ca^{2+} pode resultar da ativação de cada canal, ou da liberação coordenada de Ca^{2+} dos dois [78]. É possível que o InsP_3R e o RyR dentro do núcleo interajam para regular o Ca^{2+} livre no nucleoplasma, assim como podem interagir para regular padrões de sinalização de Ca^{2+} no citosol. Conseqüentemente, este pool localizado de Ca^{2+} nuclear e as estruturas que o controlam constituem um novo aspecto regulatório de Ca^{2+} no coração.

Dos íons envolvidos no correto funcionamento do coração, o Ca^{2+} é considerado talvez o mais importante [15]. A alteração da homeostase do Ca^{2+} nos miócitos é uma das principais causas de disfunção contrátil e arritmias em condições patofisiológicas [55]. Já foi demonstrado, em diversos tipos celulares, que o aumento de Ca^{2+} nuclear desencadeia efeitos biológicos específicos que diferem dos efeitos desencadeados em consequência do aumento de Ca^{2+} citosólico [25-29;31;42;63]. No entanto, é demonstrado neste trabalho que

em cardiomiócitos, o Ca^{2+} nuclear e citosólico podem controlar eventos celulares não só de maneira distinta, mas também de forma similar. Estes dados indicam que pode haver mudanças específicas a cada tipo celular em como o Ca^{2+} nuclear e citosólico regulam uma determinada função celular. Foi observado que sob condições de tamponamento de Ca^{2+} nuclear ou citosólico, cardiomiócitos neonatos apresentaram uma frequência de batimentos aumentada, transientes globais de Ca^{2+} atenuados e níveis de expressão do RyR-II diminuídos. A observada atenuação na amplitude dos transientes globais de Ca^{2+} poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela diminuição nos níveis de expressão do RyR-II em células infectadas com Ad-PV-NLS e Ad-PV-NES. Da mesma forma, os níveis de expressão de outras proteínas envolvidas na regulação de Ca^{2+} poderiam estar alteradas também explicando o aumento observado na frequência de batimentos espontâneos. Por outro lado, foi demonstrado que o tamponamento de Ca^{2+} nuclear e não do citosólico, causou prolongamento na duração do potencial de ação (APD) em cardiomiócitos ventriculares adultos. Estes dados indicam que os níveis de Ca^{2+} nuclear são altamente controlados em cardiomiócitos. De fato, existe a hipótese de que um sensor luminal de Ca^{2+} está presente no retículo sarcoplasmático de cardiomiócitos, permitindo que as células auto regulem a concentração de Ca^{2+} presente dentro do retículo sarcoplasmático [80]. Neste contexto, um sensor de Ca^{2+} nuclear poderia estar presente também no retículo nucleoplasmático, para que, caso a disponibilidade de Ca^{2+} nuclear esteja reduzida, a célula tente compensá-la aumentando a APD ou alterando a expressão e/ou função de canais de membrana envolvidos no acoplamento excitação-contração.

A via de sinalização da calcineurina/NFAT é estimulada após elevações na concentração de Ca^{2+} intracelular, que leva a ativação da fosfatase dependente de cálcio-calmodulina, calcineurina. Isto provoca a desfosforilação do NFAT, que contém um sinal

de localização nuclear que permite que seja translocado para o núcleo onde se liga ao DNA regulando a transcrição de genes pró-hipertroóficos [58;60]. Neste trabalho foi observado que sinais de Ca^{2+} nuclear regulam esta via de sinalização na célula cardíaca. Dois grupos de dados suportam esta observação: (i) Células infectadas com Ad-PV-NLS apresentaram níveis de expressão da calcineurina aumentados, e (ii) células infectadas com Ad-PV-NLS tiveram aumento na localização nuclear de NFAT. É importante notar que foi investigada a expressão da subunidade B da calcineurina, a qual está diretamente envolvida na ativação da calcineurina [81]. Neste sentido, o tamponamento de Ca^{2+} nuclear causa aumento na expressão de calcineurina B resultando na ativação da calcineurina e consequente translocação de NFAT para o núcleo. De fato, estudos têm mostrado que a ativação e translocação do NFAT pode ocorrer mais rapidamente quando a calcineurina é superexpressa em cardiomiócitos e que isto pode ocorrer na ausência de Ca^{2+} quando a calcineurina é constitutivamente ativa [82-84]. O tamponamento de Ca^{2+} nuclear também causou aumento da área nuclear. O tratamento com CsA em cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS preveniu a localização nuclear de NFAT e o aumento da área nuclear, o que confirma o envolvimento da via da calcineurina/NFAT no aumento da área nuclear observado. Esta observação gera uma pergunta intrigante: Qual é o papel específico da via calcineurina/NFAT no aumento da área nuclear em cardiomiócitos infectados com Ad-PV-NLS? Uma hipótese é que a translocação de NFAT para o núcleo e a ativação de genes específicos pode ser o mecanismo pelo qual o aumento da área nuclear ocorreu quando o Ca^{2+} nuclear foi tamponado [60]. Estes resultados implicam um novo papel para o Ca^{2+} nuclear na modulação da via de sinalização do NFAT em células cardíacas. A via da calcineurina/NFAT tem sido amplamente documentada no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca [58;60]. Desta maneira, outras perguntas poderiam ser formuladas: O aumento da

área nuclear está relacionado à hipertrofia cardíaca? Caso sim, como? A hipertrofia nuclear tem sido observada em cardiomiócitos de corações humanos com cardiomiopatia dilatada e após infarto do miocárdio [85-87]. O aumento no tamanho nuclear pode se dever à atividade sintética alterada e este defeito parece afetar não só proteínas da maquinaria contrátil, mas também o citoesqueleto e outras proteínas [86;88]. Além disso, acreditava-se que o aumento na área nuclear resultava em apoptose de cardiomiócitos com cardiomiopatia dilatada. No entanto, foi constatado que pode resultar da atividade aumentada de reparo de DNA [85]. As alterações nucleares são eventos primários no desenvolvimento da hipertrofia celular e as outras alterações celulares são consequência do distúrbio na função nuclear [86]. Já que o núcleo é o principal alvo de infecções cardiovirais e o lugar de alteração da expressão gênica, é provável que as mudanças nucleares estejam implicadas no desenvolvimento e progressão de tais condições patológicas [86;87].

Uma das principais funções dos peptídeos natriuréticos tais como o ANP é prevenir a hipertrofia [62]. Sua distribuição é preferencialmente perinuclear em condições fisiológicas e o aumento da sua expressão é observado na presença de agentes hipertróficos [17;89;90]. Neste trabalho foi observado que os níveis de expressão de ANP não foram alterados com o tamponamento de Ca^{2+} nuclear. Uma observação similar foi constatada em um estudo recente, no qual foi usada uma construção similar à PV-NLS, porém contendo a proteína neuronal de ligação ao Ca^{2+} calbindina (CB), direcionada para o núcleo com uma sequência de localização nuclear e fusionada à proteína fluorescente vermelha monomérica (mRFP) [17]. Foi verificado que o tamponamento de Ca^{2+} nuclear aboliu a expressão de ANP induzida por Endotelina-1 (ET-1) [17]. No presente trabalho o tamponamento de Ca^{2+} nuclear causou redistribuição subcelular de ANP da região perinuclear para a periferia

celular, o que foi observado também quando cardiomiócitos foram tratados com o agonista hipertrófico fenilefrina [61]. A redistribuição de grânulos de ANP já tem sido demonstrada. Por exemplo, já foi observado que monensina induz a translocação de grânulos de ANP por microtúbulos para a periferia celular através da modificação da interação entre os microtúbulos e os grânulos de ANP [91]. A redistribuição de ANP induzida por monensina foi prevenida pelo pré-tratamento com nocodazol, que fragmentou os microtúbulos e dispersou os complexos de Golgi e os grânulos de ANP pelo citoplasma. Se a distribuição de grânulos de ANP observada após o tamponamento de Ca^{2+} nuclear está relacionada com o rearranjo de microtúbulos e se isto leva a um aumento na secreção de ANP são aspectos que ainda devem ser estudados.

Na literatura, diversos estudos têm discutido como cardiomiócitos podem discriminar sinais de Ca^{2+} pro-hipertróficos dos aumentos cíclicos de Ca^{2+} associados ao acoplamento excitação-contração [17;23;24]. Tem sido sugerido que mudanças no formato, frequência ou amplitude dos transientes globais de Ca^{2+} associados ao acoplamento excitação-contração induzidas por estresse/sobrecarga, podem codificar informação que induz a transcrição gênica hipertófica. Isto ocorre pela ativação da via da calcineurina/NFAT [1;23;24].

Uma idéia que tem ganhado apoio recente é que sinais de Ca^{2+} originados por mecanismos diferentes aos do acoplamento excitação-contração controlam a transcrição hipertófica. Por exemplo, foi demonstrado que sinais vindos dos IP3Rs perinucleares ativam a via da calcineurina/NFAT e também outra via hipertrófica conhecida, a da proteína kinase II dependente de Ca^{2+} -Calmodulina/Histona Deacetilase (CamK-II/HDAC5) [17;18]. Os resultados do presente trabalho mostram evidências de que os sinais de Ca^{2+} nuclear também regulam componentes da via de sinalização da

calciuerina/NFAT em cardiomiócitos. Os mecanismos pelos quais o Ca^{2+} pode controlar a transcrição de genes hipertróficos com tanta especificidade no ruído dos sinais globais de Ca^{2+} associados a cada batimento ainda são controversos [17]. Estudos mais detalhados são necessários para determinar como o cardiomiócito codifica os sinais de Ca^{2+} pro-hipertróficos.

Em conjunto, os resultados deste trabalho mostram como a sinalização de Ca^{2+} nuclear contribui para a regulação ativa da funcionalidade e excitabilidade de cardiomiócitos. Quando o Ca^{2+} nuclear foi tamponado, foram observadas alterações nos transientes globais de Ca^{2+} , propriedades elétricas, e na expressão-distribuição de marcadores hipertróficos. Desta forma, o núcleo responde a alterações dos níveis de Ca^{2+} manifestando aumento da área, com o objetivo de manter sua homeostase. Certamente, mais investigações serão necessárias para esclarecer a contribuição nuclear na funcionalidade de cardiomiócitos assim como na hipertrofia cardíaca. Esta pode ser uma via significativa para desenvolver novas técnicas terapêuticas.

Assim como o Ca^{2+} controla funções essenciais em cardiomiócitos, também tem um papel importante em outros sistemas celulares. Isto foi verificado em estudos adicionais realizados durante o período deste programa de doutorado (Anexos). Em um deles foi demonstrado que tanto o Ca^{2+} nuclear quanto o citosólico controlam a proliferação de células estelares hepáticas na fase G2/M [43]. No outro trabalho foi demonstrado que o receptor de proteína kinase C ativada (RACK) de *Plasmodium falciparum*, quando expresso em células de mamífero, é capaz de inibir sinais de Ca^{2+} mediados por InsP_3 , sendo este um potencial mecanismo para a sobrevivência do parasita nas células do hospedeiro [92]. Estes dados complementam as evidências atuais comprovando a importância e versatilidade deste segundo mensageiro na função de diversos sistemas celulares.

6. Referências Bibliográficas

1. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 517-529.
2. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995; **80**: 259-268.
3. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002; **32**: 235-249.
4. Berridge MJ. The AM and FM of calcium signalling. *Nature* 1997; **386**: 759-760.
5. Taylor CW, Genazzani AA, Morris SA. Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 1999; **26**: 237-251.
6. Wojcikiewicz RJ. Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types. *J Biol Chem* 1995; **270**: 11678-11683.
7. Rossi D, Sorrentino V. Molecular genetics of ryanodine receptors Ca²⁺-release channels. *Cell Calcium* 2002; **32**: 307-319.
8. Mignery GA, Sudhof TC, Takei K, De Camilli P. Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* 1989; **342**: 192-195.
9. Takeshima H. Primary structure and expression from cDNAs of the ryanodine receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1993; **707**: 165-177.

10. Shah PK, Sowdhamini R. Structural understanding of the transmembrane domains of inositol triphosphate receptors and ryanodine receptors towards calcium channeling. *Protein Eng* 2001; **14**: 867-874.
11. Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002; **32**: 235-249.
12. Leite MF, Nathanson MH. Ca²⁺ Signaling in the liver. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA (Eds.). *The liver: Biology and Pathobiology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2001: pp. 537-554.
13. Nowycky MC, Thomas AP. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3715-3716.
14. Frey N, McKinsey TA, Olson EN. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat Med* 2000; **6**: 1221-1227.
15. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; **415**: 198-205.
16. Molkenin JD. Dichotomy of Ca²⁺ in the heart: contraction versus intracellular signaling. *J Clin Invest* 2006; **116**: 623-626.
17. Higazi DR, Fearnley CJ, Drawnel FM et al. Endothelin-1-stimulated InsP3-induced Ca²⁺ release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes. *Mol Cell* 2009; **33**: 472-482.

18. Wu X, Zhang T, Bossuyt J et al. Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* 2006; **116**: 675-682.
19. Vega RB, Bassel-Duby R, Olson EN. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. *J Biol Chem* 2003; **278**: 36981-36984.
20. Proven A, Roderick HL, Conway SJ et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *J Cell Sci* 2006; **119**: 3363-3375.
21. Splawski I, Timothy KW, Decher N et al. Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 8089-8096.
22. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 2000; **101**: 365-376.
23. Cooling MT, Hunter P, Crampin EJ. Sensitivity of NFAT cycling to cytosolic calcium concentration: implications for hypertrophic signals in cardiac myocytes. *Biophys J* 2009; **96**: 2095-2104.
24. Houser SR, Molkenin JD. Does contractile Ca²⁺ control calcineurin-NFAT signaling and pathological hypertrophy in cardiac myocytes? *Sci Signal* 2008; **1**: e31.

25. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 1997; **385**: 260-265.
26. Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S, Bading H. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium* 1998; **23**: 131-134.
27. Carrion AM, Link WA, Ledo F, Mellstrom B, Naranjo JR. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* 1999; **398**: 80-84.
28. Puskas T, Wu JJ, Zimmerman TL et al. Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J Biol Chem* 2002; **277**: 27517-27527.
29. Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 440-446.
30. Leite MF, Thrower EC, Echevarria W et al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 2975-2980.
31. Thompson M, Andrade VA, Andrade SJ et al. Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **301**: 267-274.
32. Lee MA, Dunn RC, Clapham DE, Stehno-Bittel L. Calcium regulation of nuclear pore permeability. *Cell Calcium* 1998; **23**: 91-101.

33. Perez-Terzic C, Pyle J, Jaconi M, Stehno-Bittel L, Clapham DE. Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear Ca²⁺ stores. *Science* 1996; **273**: 1875-1877.
34. Brini M, Murgia M, Pasti L, Picard D, Pozzan T, Rizzuto R. Nuclear Ca²⁺ concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J* 1993; **12**: 4813-4819.
35. Allbritton NL, Oancea E, Kuhn MA, Meyer T. Source of nuclear calcium signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 12458-12462.
36. Hennager DJ, Welsh MJ, DeLisle S. Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate levels can control nuclear Ca²⁺ concentration. *J Biol Chem* 1995; **270**: 4959-4962.
37. Lipp P, Thomas D, Berridge MJ, Bootman MD. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J* 1997; **16**: 7166-7173.
38. Yang Z, Steele DS. Characteristics of prolonged Ca²⁺ release events associated with the nuclei in adult cardiac myocytes. *Circ Res* 2005; **96**: 82-90.
39. Wu X, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected Ca²⁺ store throughout cardiac myocyte. *Circ Res* 2006; **99**: 283-291.
40. Marius P, Guerra MT, Nathanson MH, Ehrlich BE, Leite MF. Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 2006; **39**: 65-73.

41. Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H. CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* 1998; **281**: 1505-1509.
42. Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF et al. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem* 2007.
43. Soliman EM, Rodrigues MA, Gomes DA et al. Intracellular calcium signals regulate growth of hepatic stellate cells via specific effects on cell cycle progression. *Cell Calcium* 2009; **45**: 284-292.
44. Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF et al. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem* 2008; **283**: 4344-4351.
45. Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, Leite MF, Nathanson MH. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 2008; **48**: 1621-1631.
46. Pourquier P, Takebayashi Y, Urasaki Y, Gioffre C, Kohlhagen G, Pommier Y. Induction of topoisomerase I cleavage complexes by 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) in vitro and in ara-C-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 1885-1890.
47. Leite MF, Hirata K, Pusch T et al. Molecular basis for pacemaker cells in epithelia. *J Biol Chem* 2002; **277**: 16313-16323.

48. Guatimosim S, Sobie EA, dos Santos CJ, Martin LA, Lederer WJ. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**: C1327-C1339.
49. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 2509-2514.
50. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
51. Lipp P, Laine M, Tovey SC et al. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol* 2000; **10**: 939-942.
52. Perez PJ, Ramos-Franco J, Fill M, Mignery GA. Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; **272**: 23961-23969.
53. Teruel MN, Chen W, Persechini A, Meyer T. Differential codes for free Ca(2+)-calmodulin signals in nucleus and cytosol. *Curr Biol* 2000; **10**: 86-94.
54. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**: 11-21.
55. Guatimosim S, Dilly K, Santana LF, Saleet JM, Sobie EA, Lederer WJ. 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* 2002; **34**: 941-950.

56. Coutu P, Metzger JM. Optimal range for parvalbumin as relaxing agent in adult cardiac myocytes: gene transfer and mathematical modeling. *Biophys J* 2002; **82**: 2565-2579.
57. Hallhuber M, Burkard N, Wu R et al. Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. *Circ Res* 2006; **99**: 626-635.
58. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998; **93**: 215-228.
59. Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 1999; **96**: 611-614.
60. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 2003; **17**: 2205-2232.
61. King KL, Winer J, Phillips DM, Quach J, Williams PM, Mather JP. Phenylephrine, endothelin, prostaglandin F₂α and leukemia inhibitory factor induce different cardiac hypertrophy phenotypes in vitro. *Endocrine* 1998; **9**: 45-55.
62. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 2000; **35**: 19-24.
63. Luo D, Yang D, Lan X et al. Nuclear Ca²⁺ sparks and waves mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Calcium* 2007.

64. Fox JL, Burgstahler AD, Nathanson MH. Mechanism of long-range Ca²⁺ signalling in the nucleus of isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1997; **326 (Pt 2)**: 491-495.
65. Adebajo OA, Anandatheerthavarada HK, Koval AP et al. A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 409-414.
66. Gerasimenko O, Gerasimenko J. New aspects of nuclear calcium signalling. *J Cell Sci* 2004; **117**: 3087-3094.
67. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV, Petersen OH. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell* 1995; **80**: 439-444.
68. Malviya AN, Rogue P, Vincendon G. Stereospecific inositol 1,4,5-[³²P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87**: 9270-9274.
69. Santella L, Kyojuka K. Effects of 1-methyladenine on nuclear Ca²⁺ transients and meiosis resumption in starfish oocytes are mimicked by the nuclear injection of inositol 1,4,5-trisphosphate and cADP-ribose. *Cell Calcium* 1997; **22**: 11-20.
70. Collings DA, Carter CN, Rink JC, Scott AC, Wyatt SE, Allen NS. Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *Plant Cell* 2000; **12**: 2425-2440.

71. Fricker M, Hollinshead M, White N, Vaux D. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1997; **136**: 531-544.
72. Lui PP, Kong SK, Fung KP, Lee CY. The rise of nuclear and cytosolic Ca²⁺ can be uncoupled in HeLa cells. *Pflugers Arch* 1998; **436**: 371-376.
73. Chamero P, Manjarres IM, Garcia-Verdugo JM, Villalobos C, Alonso MT, Garcia-Sancho J. Nuclear calcium signaling by inositol trisphosphate in GH(3) pituitary cells. *Cell Calcium* 2007.
74. Gerasimenko JV, Maruyama Y, Yano K et al. NAADP mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. *J Cell Biol* 2003; **163**: 271-282.
75. Laflamme K, Domingue O, Guillemette BI, Guillemette G. Immunohistochemical localization of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to the nucleus of different mammalian cells. *J Cell Biochem* 2002; **85**: 219-228.
76. Humbert JP, Matter N, Artault JC, Koppler P, Malviya AN. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 478-485.

77. George CH, Rogers SA, Bertrand BM et al. Alternative Splicing of Ryanodine Receptors Modulates Cardiomyocyte Ca²⁺ Signaling and Susceptibility to Apoptosis. *Circ Res* 2007.
78. Leite MF, Burgstahler AD, Nathanson MH. Ca²⁺ waves require sequential activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors in pancreatic acini. *Gastroenterology* 2002; **122**: 415-427.
79. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003; **421**: 634-639.
80. Lukyanenko V, Viatchenko-Karpinski S, Smirnov A, Wiesner TF, Gyorke S. Dynamic regulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) content and release by luminal Ca(2+)-sensitive leak in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 2001; **81**: 785-798.
81. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1483-1521.
82. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; **357**: 695-697.
83. Goldfeld AE, Tsai E, Kincaid R et al. Calcineurin mediates human tumor necrosis factor alpha gene induction in stimulated T and B cells. *J Exp Med* 1994; **180**: 763-768.

84. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 1992; **357**: 692-694.
85. Kanoh M, Takemura G, Misao J et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999; **99**: 2757-2764.
86. Scholz D, Diener W, Schaper J. Altered nucleus/cytoplasm relationship and degenerative structural changes in human dilated cardiomyopathy. *Cardioscience* 1994; **5**: 127-138.
87. Herget GW, Neuburger M, Plagwitz R, Adler CP. DNA content, ploidy level and number of nuclei in the human heart after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1997; **36**: 45-51.
88. Beltrami CA, Finato N, Rocco M et al. The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**: 291-305.
89. Aronow BJ, Toyokawa T, Canning A et al. Divergent transcriptional responses to independent genetic causes of cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics* 2001; **6**: 19-28.
90. Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN et al. 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* 1990; **265**: 20555-20562.

91. Iida H, Barron WM, Page E. Monensin turns on microtubule-associated translocation of secretory granules in cultured rat atrial myocytes. *Circ Res* 1988; **62**: 1159-1170.

92. Sartorello R, Amaya MJ, Nathanson MH, Garcia CR. The plasmodium receptor for activated C kinase protein inhibits Ca(2+) signaling in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **389**: 586-592.

7. Anexos



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 16/2006**, relativo ao projeto intitulado "*Decifrando vias de sinalização de Ca²⁺ no núcleo e no citosol do cardiomiócito: compartimentalização versus função*", que tem como responsável **Silvia Carolina Guatimosin Fonseca**, está 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 **28/ 06/2006**.

Este certificado expira-se em **28/ 06 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 16/2006**, related to the project entitled "*Decoding nuclear and cytosolic Ca²⁺ signals in the cardiomyocyte: compartmentalization versus function*", under the supervision of **Silvia Carolina Guatimosin Fonseca**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 28, 2006**.

This certificate expires in **June 28, 2011**.

Belo Horizonte, 28 de Junho de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027
www.ufmg.br/prpq/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](#)