UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

Carla Jeane Aguiar

SUCCINATO: UMA NOVA MOLÉCULA SINALIZADORA EM CARDIOMIÓCITOS

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Carla Jeane Aguiar

SUCCINATO: UMA NOVA MOLÉCULA SINALIZADORA EM CARDIOMIÓCITOS

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Biofísica, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Leite
Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Guatimosim

BELO HORIZONTE

MINAS GERAIS - BRASIL

2009

SUCCINATO: UMA NOVA MOLÉCULA SINALIZADORA EM CARDIOMIÓCITOS

CARLA JEANE AGUIAR

Tese de Doutorado defendida e aprovada no dia 06 de fevereiro de 2009, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI
UNICAMP

PROF. DR. RÔMULO LEITE
UFOP

PROF. DR. ALVAIR PINTO DE ALMEIDA
UFMG

PROF. DR. JADER DOS SANTOS CRUZ
UFMG

PROFA. DRA. SILVIA CAROLINA GUATIMOSIM FONSECA
UFMG, CO-ORIENTADORA

PROFA. DRA. MARIA DE FÁTIMA LEITE
UFMG, ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 06 de fevereiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que está presente em todos os momentos da minha vida, permitindo que tudo se torne possível.

Aos meus pais, pelo incentivo, amparo e proteção. Aos meus irmãos: Marcos, pelo companheirismo, mão amiga em todo o percurso; Paulo, pela amizade e carinho; Kate, pelos cuidados com Ana Beatriz e pela serenidade. À minha sobrinha Maricota pelos momentos felizes e à Lilo, minha sobrinha e afilhada por colorir minha vida. Á minha filha Ana Beatriz, minha inspiração. Peço desculpas pela ausência. Filha, eu te amo.

À minha orientadora Profa. Maria de Fátima Leite e à co-orientadora Profa. Sílvia Guatimosim pela oportunidade, apoio, ensinamentos, atenção, incentivo e confiança, sem elas tenho certeza de que não conseguiria chegar até aqui, e por me ajudar a conhecer e a desvendar o universo dos cardiomiócitos.

À Profa. Elaine Maria de Souza Fagundes pela doação de uma droga, Profa. Dra. Jin Zhang pela doação do sensor de PKA e ao Prof. Dr. Alvair Pinto de Almeida, ao Alexandre e ao Denis pelo auxílio nos experimentos de coração isolado.

Agradeço em especial aos meus amigos e colegas de laboratório: Mateus, Camila, Bibaulusca, Flavonoide, Sandralina, Vanessa, Gilsolino, Bruno e aos alunos sob orientação da Profa. Silvia Guatimosim, principalmente Marcinha e Éneas pela amizade, pacienciosa colaboração, discussões e pelo trabalho em conjunto.

E finalmente, aos órgãos financiadores Howard Hughes Medical Institute, FAPEMIG, CAPES e CNPQ pela concessão de bolsas e auxílios financeiros para fomento dessa pesquisa e participação em congressos.

RESUMO

O GPR91 é um receptor acoplado a proteína G, que tem sido caracterizado como um receptor de succinato, um intermediário do ciclo de ácido cítrico. Este receptor é expresso em diversos tecidos como rim, fígado e baço. No coração, o papel do succinato ainda é desconhecido. Neste trabalho nós avaliamos a sinalização desencadeada pelo succinato em cardiomiócitos.

Experimentos de RT-PCR e imunofluorescência confirmaram a presença de GPR91 em cardiomiócitos. Demonstramos que o succinato aumenta a amplitude e diminui o tempo de decaimento do transiente global de Ca^{2+}. Além disso, o succinato aumentou os níveis de fosforilação de fosfolambam e do receptor de rianodina, duas bem conhecidas proteínas envolvidas na dinâmica de Ca^{2+} no coração. Estes efeitos foram abolidos pelo pré-tratamento com um inibidor da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), indicando que as mudanças no transiente de Ca^{2+} induzidas pelo succinato são mediadas por sinalização via PKA. Ativação direta da PKA pelo succinato foi confirmada por experimento de FRET.

Além disso, verificamos que o succinato induz aumento no Ca^{2+} mitocondrial, ativa a caspase-3, e diminui a viabilidade de cardiomiócitos. Estes efeitos foram abolidos pelos antagonistas do receptor de inositol 1,4,5-trifosfato , indicando que a liberação de Ca^{2+} a partir do $InsP_3R$ é a sinalização envolvida na morte celular cardíaca induzida pelo succinato. Para investigar o efeito do succinato sobre a função cardíaca, utilizamos a preparação de coração isolado. Estes experimentos revelaram que o succinato diminuiu a tensão sistólica, o fluxo coronariano e a freqüência cardíaca, levando a arritmia e a falência do órgão. E demonstramos também que o tratamento crônico com succinato induz sinalização pro-hipertrófica em cardiomiócitos neonatos. Em conjunto, estas observações revelam um novo papel para o succinato como um modulador da função e viabilidade de cardiomiócitos através da sinalização de Ca^{2+}.

Palavras chave: cálcio, cardiomiócitos, PKA, $InsP_3R$

ABSTRACT

GPR91 is an orphan G-protein-coupled receptor (GPCR) that has been characterized as a receptor for succinate, a citric acid cycle intermediate, in several tissues such as kidney, liver and spleen. In the heart, the role of succinate is unknown. Using a combination of molecular biology and Ca^{2+} imaging techniques we evaluated the signaling pathways triggered by succinate in isolated cardiac cells.

RT-PCR and immunofluorescence experiments confirmed the presence of GPR91 in ventricular cardiomyocytes. We found that succinate increases the amplitude and the rate of decline of global Ca^{2+} transient. Moreover, succinate increases phosphorylation levels of phospholamban and ryanodine receptor, two well known cardiac Ca^{2+} handling proteins. These effects were abolished by pre-treatment with a cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibitor, indicating that changes in Ca^{2+} transient induced by succinate are mediated by PKA signaling pathway. Direct PKA activation by succinate was further confirmed using a FRET-based A-kinase activity reporter.

Additionally, we found that succinate increases mitochondrial Ca^{2+} levels, activates caspase-3, and decreases cardiomyocyte viability. These effects were abolished by inositol 1,4,5-triphosphate receptor ($InsP_3R$) antagonists, indicating that release of Ca^{2+} from $InsP_3R$ is the signaling pathway involved in succinate induced cardiac cell death. To investigate the effect of succinate on cardiac function, we used the isolated Langendorff-perfused heart preparation. We observed that succinate decreased systolic tension, coronary flux and cardiac frequency, leading to arrhythmia and organ failure. We demonstrate that treatment with chronic succinate is involved in signaling of cardiac hypertrophy. Taken together, these observations reveal a new role for succinate as a modulator of cardiomyocyte function and viability through Ca^{2+} signaling pathways.

Key words: calcium, cardiomyocytes, PKA, $InsP_3R$

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: microgramas

acCoA: acetil CoA

AD: cardiomiócitos provenientes de ratos adultos

AKT-P: proteína cinase B fosforilada

ARA-C: B-D- arabinofuranosídeo

ATP: trifosfato de adenosina

BSA: albumina de soro bovino

cAMP: monofosfato de adenosina cíclico

cDNA: ácido desoxirribonucléico codificante

CEBIO: Centro de Bioterismo

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: meio de cultura

DNA: ácido dexorribonucléico

ECL: enhaced chemio-luminescence

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

F: fluorescência total

F_0: fluorescência basal

$FADH_2$: flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

FBS: soro fetal bovino

Fluo-4/AM: flúor 4 aceto-metil-éster

FRET: transferência de energia de ressonância fluorescente

GDP: guanosina difosfato

GTP: guanosina trifosfato

H^+: hidrogênio

H_2O_2: peróxido de hidrogênio

HBSS: solução salina balanceada Hanks

HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1 piperazinielhanesulfônico

HPRT: hipoxantina guanina fosforibose transferase

Hz: hertz

IC: insuficiência cardíaca

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

Indy: gene extensor da vida

KGL: α- oxoglutarato

KH_2 PO_4: fosfato de potássio diidratado

mAKAP: proteína dependente da PKA

MAL: malato

$MgCl_2$: cloreto de magnésio

$MgSO_4$: sulfato de magnésio

mL: mililitros

mM: milimolar

Na_3CO_4: carbonato de sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NaF: Fluoreto de sódio

NFAT: fator nuclear de células T ativadas

O_2: oxigênio

OA: oxaloacetato

PEP: fosfoenolpiruvato

PKA: proteína cinase A

PLN: Fosfolambam

PP1: proteína fosfatase 1

PP2: proteína fosfatase 2

PVDF: difluoride polyvinylidene

PyR: piruvato

Q-RT-PCR: reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa quantitativa

Rhod-2/AM: Xanthylium, 9 -[4 -[bis [2 -[(acetyloxy)methoxy] -2-oxoethyl] amino] -3 -[2 -[2 -[bis [2 -[(acetyloxy)methoxy] -2-oxoethyl] amino] phenoxy] ethoxy] phenyl] -3, 6-bis (dimethylamino), bromide

RNA: ácido ribonucléico

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase

RyR: receptores de rianodina

SDS: dodecil sulfato de sódio

Ser: serina

SERCA: Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático

suc CoA: succinil CoA

TBST: tampão salino de tris tween

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Catabolismo das proteínas, gorduras e carboidratos. 12
Figura 2 - Reações do ciclo do ácido cítrico.....14
Figura 3 - Rearranjo do ciclo do ácido cítrico sob ação do peróxido de oxigênio (H_2O_2). 16
Figura 4 - Coração de rato adaptado ao sistema de perfusão, tipo Langendorff.....22
Figura 5 - Funcionamento do sistema Langendorff.....22
Figura 6 - Imagem de imunofluorescência e PCR em cardiomiócitos. 30
Figura 7 - Figura representativa do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos.....31
Figura 8 - Figura representativa do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos em diferentes tempos de tratamento com succinato. 32
Figura 9 - Figura e gráfico representativos de Western Blot.....34
Figura 10 - Figura representativa do efeito do H89 inibindo os efeitos do succinato no transiente de Ca^{2+} 35
Figura 11 - Imagem representativa de imunofluorescência e PCR em cardiomiócitos neonatos.....36
Figura 12 - Representação gráfica do experimento de FRET em cardiomiócitos neonatos 37
Figura 13 - Figura e gráficos representativos do transiente de Ca^{2+} e do Ca^{2+} mitocondrial em cardiomiócitos. 39
Figura 14 - Figura e gráficos representativos do experimento da caspase-3 e de viabilidade celular.....40
Figura 15 - Protocolo experimental e gráficos dos experimentos em coração isolado.....41
Figura 16 - Representação gráfica do experimento de Ca^{2+} em cardiomiócitos neonatos.....43
Figura 17 - Imagem representativa do RT-PCR em cardiomiócitos neonatos.....44
Figura 18 - Figura e gráficos representativos do experimento de viabilidade celular em cardiomiócitos neonatos. 45
Figura 19 - Figura e gráficos representativos do experimento de viabilidade celular em cardiomiócitos neonatos. 46
Figura 20 - Imagem e gráfico representativos de Western Blot e de imunofluorescência em cardiomiócitos neonatos. 48
Figura 21 - Imagem e gráfico representativos de Western Blot e de imunofluorescência em cardiomiócitos neonatos. 49
Figura 22 - Esquema demonstrando as vias de sinalização do succinato em cardiomiócitos. 55

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** **11**

2 **OBJETIVOS** **16**
2.1 Objetivo geral 18
2.2 Objetivos 18

3 **MATERIAIS E MÉTODOS** **19**
3.1 Animais 19
3.2 Material 19
3.3 Cultura primária de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos 20
3.4 Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos 21
3.5 Perfusão de coração isolado (Langendorff-mode perfusion) 21
3.6 Western Blotting 23
3.7 Imunofluorescência 24
3.8 Reação em cadeia da polimerase 25
3.9 Perfil de expressão do receptor GPR91 26
3.10 Ensaio de caspase 26
3.11 Detecção do aumento de Ca^{2+} citosólico e mitocondrial 26
3.12 Detecção de viabilidade/citoxicidade celular 27
3.13 Tratamento com Xestospongin C, 2-APB e H89 28
3.14 Mensuração da atividade da PKA 28
3.15 Análise estatística 29

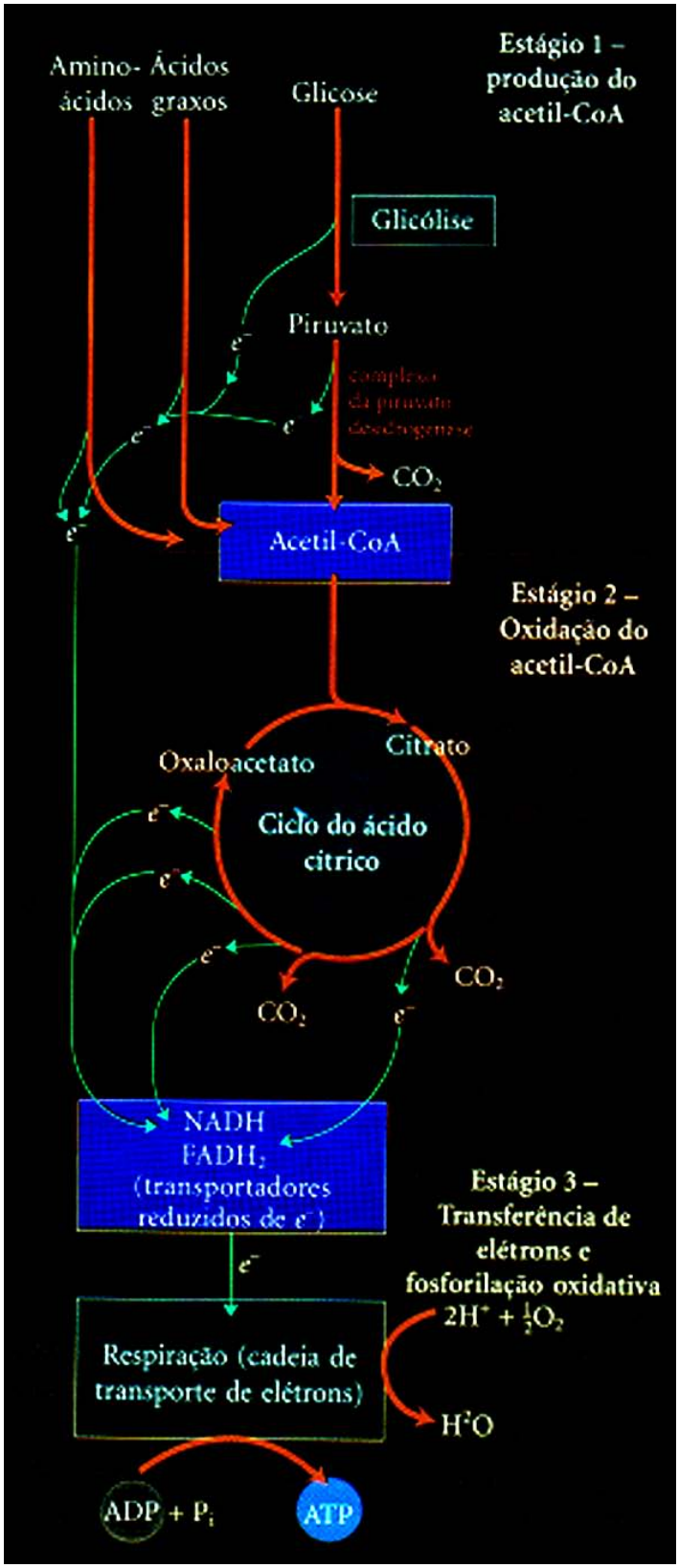
4 **RESULTADOS** **30**

5 **DISCUSSÃO** **50**

6 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **56**

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de energia pelas células ocorre através da respiração. Este processo envolve o consumo de O_2 e a liberação de CO_2 pelas células em três estágios. No primeiro estágio, as moléculas dos combustíveis orgânicos (glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos) são oxidadas para liberar compostos de dois átomos de carbono na forma do grupo acetil-coenzima A. No segundo estágio, esses grupos acetil são oxidados e a energia é então armazenada nos transportadores de elétrons reduzidos, NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e $FADH_2$ (flavina adenina dinucleotídeo). No terceiro estágio da respiração, esses co-fatores reduzidos são oxidados desfazendo-se em prótons (H^+) e elétrons. Os elétrons liberados pelos transportadores são conduzidos ao longo de uma cadeia de moléculas transportadoras de elétrons, conhecida como cadeia respiratória, até o O_2, aceptor final de elétrons, e os íons H^+ formam o gradiente eletroquímico necessário para a síntese de ATP. O ATP é formado no terceiro estágio da respiração por meio do processo chamado de fosforilação oxidativa. Neste ponto, todos os cofatores que armazenam energia são oxidados para a formação de **ATP** (Figura 1) [1; 2].



LEGENDA: Estágio 1: a oxidação dos ácidos graxos, glicose e alguns aminoácidos liberam acetil-CoA. Estágio 2: oxidação dos grupos acetil através do ciclo do ácido cítrico. Estágio 3: os elétrons transportados por NADH e $FADH_2$ são introduzidos na cadeia de transportadores de elétrons interior da mitocôndria, ao final da qual o O_2 é reduzido a H_2O. Esse fluxo de elétrons fornece energia para a síntese de ATP 2.

Figura 1 - Catabolismo das proteínas, gorduras e carboidratos.

O ciclo do ácido cítrico é uma via central do processo respiratório. Produtos das vias de degradação, como a glicólise, por exemplo, são convertidos em moléculas de dois carbonos que chegam até o referido ciclo. Sendo este regulado segundo rigorosa coordenação com outras vias, uma vez que seus intermediários são empregados como precursores biossintéticos em diversas vias metabólicas. Os intermediários do ciclo do ácido cítrico estão presentes em concentrações micromolares no sangue e são regulados pela respiração, metabolismo, reabsorção e excreção renal [3]. Mutações em enzimas envolvidas no ciclo do ácido cítrico resultam em doenças humanas com várias representações clínicas, bem como acumulação ou privação de intermediários importantes para o metabolismo da célula.

O succinato é um ácido dicarboxílico importante no metabolismo celular que faz parte do ciclo do ácido cítrico. Recentemente, um receptor para o succinato, denominado GPR91 foi identificado, indicando que este ácido dicarboxílico, além de atuar como intermediário do ciclo do ácido cítrico atua também como um hormônio [3] (Figura 2). Foi demonstrado que o GPR91, pertence à família de receptores acoplados à proteína G e que a expressão de GPR91 ocorre preferencialmente no rim, fígado e baço [3].

Na figura 2 são representados todos os intermediários do ciclo do ácido cítrico, algumas enzimas responsáveis pela catalização das reações do ciclo e alguns produtos liberados. O retângulo indica o succinato [2].

No rim, o GPR91 está localizado predominantemente nos túbulos proximais [4]. As ações sinalizadoras do succinato mediadas pelo GPR91 estão relacionadas com o aumento do cálcio intracelular via proteína G_q e com a dimininuição do AMPc via proteína G_i [3]. Além disso, foi demonstrado que a ativação de GPR91 pelo succinato aumenta a liberação de renina, o que causa um aumento da pressão arterial [3]. No fígado, foi constatado que as células estelares expressam GPR91 e o succinato atua como um sinal autócrino durante a isquemia, induzindo a ativação destas células. Uma vez ativadas, estas células se diferenciam em miofibroblastos, secretando matriz extracelular e fatores de crescimento para reparar os danos causados pela injúria [5]. Nas células estelares a ativação do GPR91 pelo succinato não induz aumento de Ca^{2+} e não induz aumento do AMPc [5].

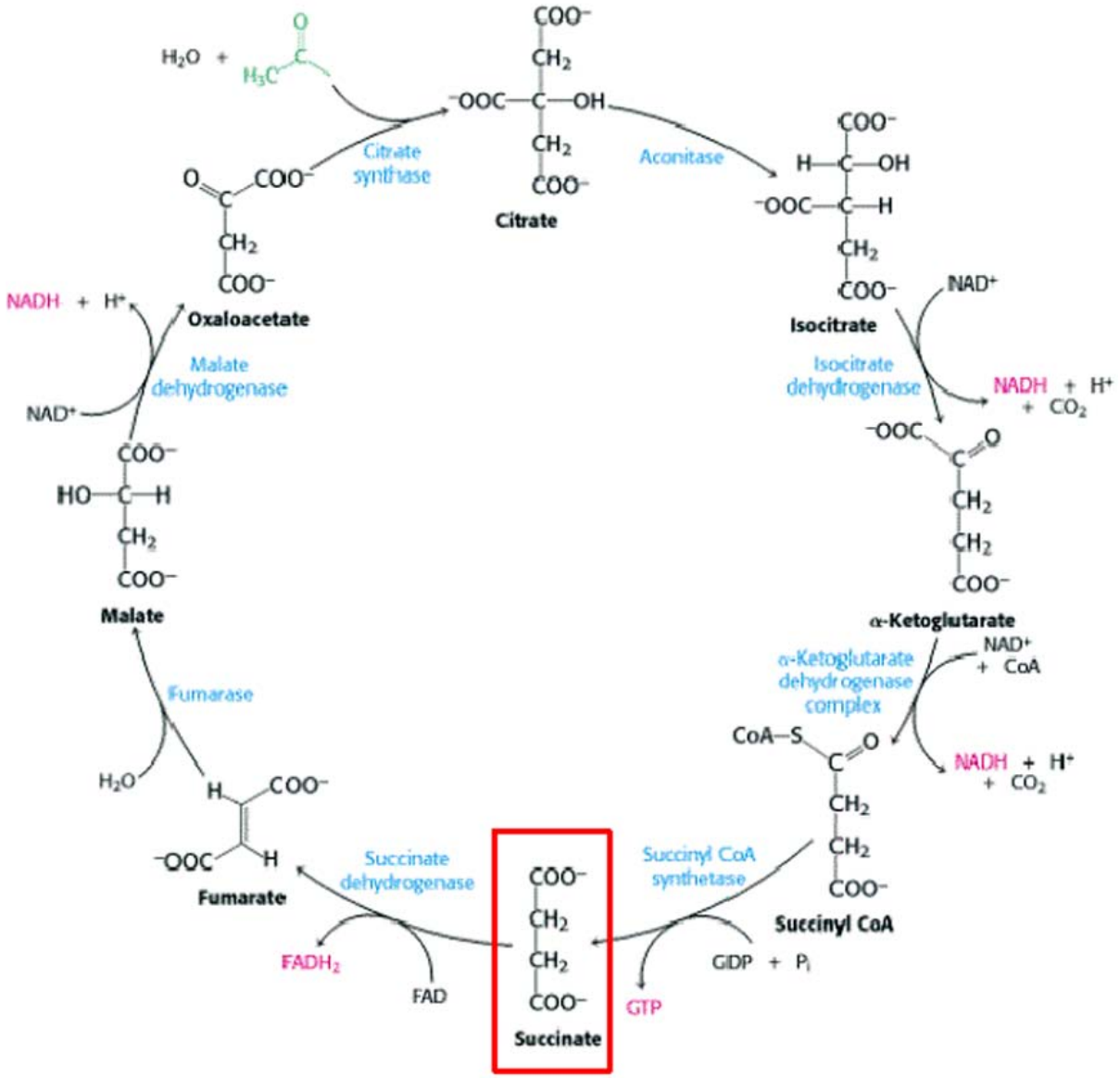


Figura 2 - Reações do ciclo do ácido cítrico.

Já foi demonstrado também que o succinato atua no sistema imune induzindo a quimiotaxia de células dendríticas [6]. Succinato age sinergicamente com o receptor Toll para liberar citocinas pro-inflamatórias. Além disso, camundongos deficientes de GPR91 apresentam maior rejeição de transplante, enfatizando a relevância do GPR91 na ativação da imunidade [6]. Sabe-se ainda que o succinato via GPR91 é um potente mediador do crescimento vascular no desenvolvimento normal da retina e na retinopatia proliferativa isquêmica [7]. No entanto, pouco se sabe sobre a ação do succinato na ativação do GPR91 em outros tecidos, inclusive se o succinato tem algum papel relevante no coração.

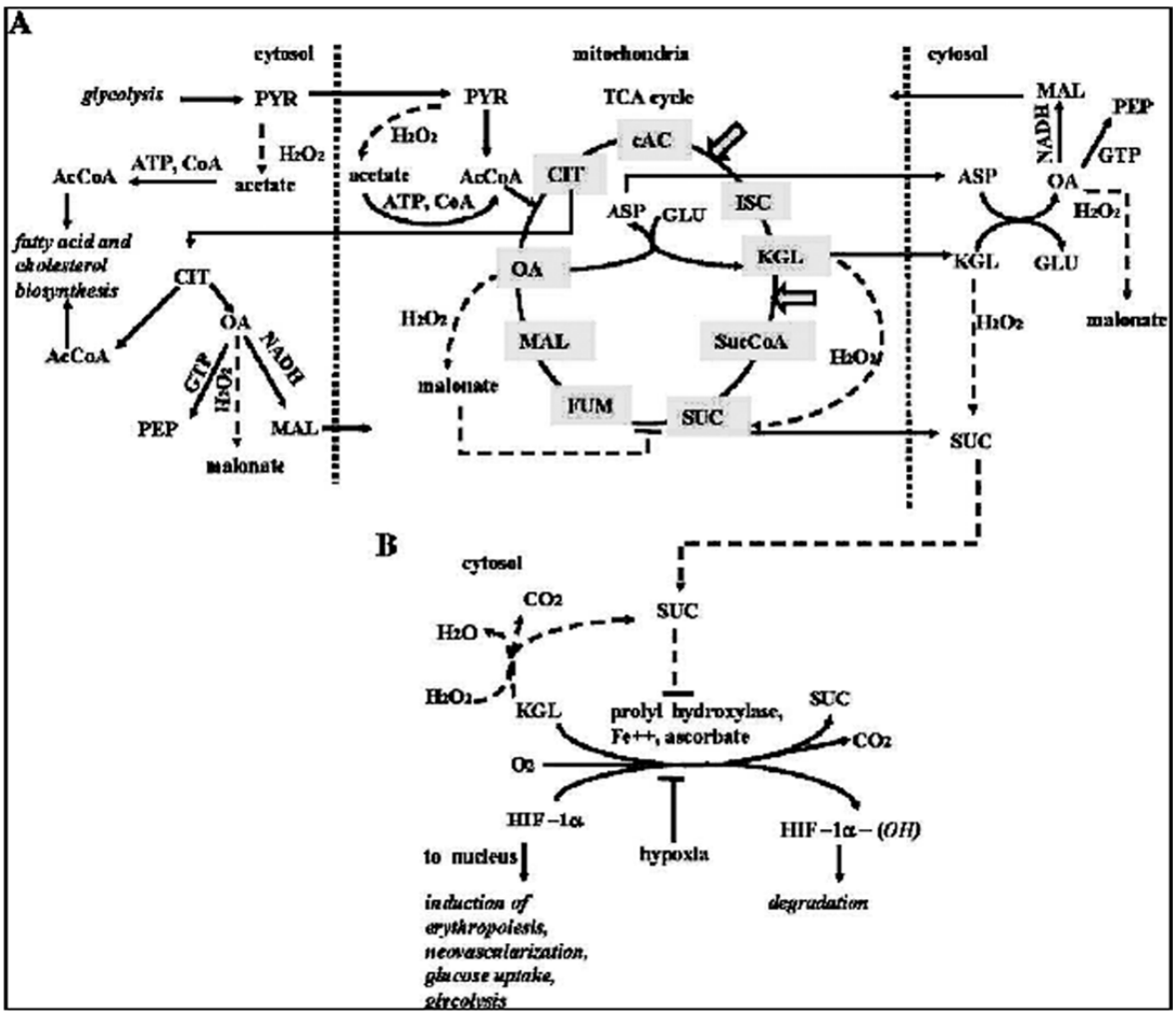
Alguns estudos revelam que o aumento nos níveis plasmáticos de succinato parece ser importante na definição de várias condições patológicas. Já foi demonstrado alterações nos níveis de succinato em ratos hipertensos [8], em amostras clínicas de pacientes com peritonite [9] e na isquemia. Neste trabalho, focalizaremos nossos estudos nos processos isquêmicos que levam a liberação de succinato. Vários autores já descreveram que o succinato se acumula durante a isquemia.

A primeira observação do acúmulo de succinato durante um processo isquêmico foi realizada por Krebs (1970) quando ele estudava a regulação do ciclo do ácido cítrico [1]. Posteriormente, Correa (2007) demonstrou que na isquemia hepática ocorre uma intensa liberação de succinato na corrente sanguínea [5]. Em outros estudos foi constatado que após a hipóxia o succinato se acumula na retina de roedores [7] e em músculo cardíaco de coelho [10].

Uma hipótese para o acúmulo de succinato durante um evento isquêmico foi descrita por Fedotcheva [11]. Durante a isquemia ocorre um aumento na produção de radicais livres e diminuição das enzimas que catalisam as reações envolvidas na redução dos radicais superóxidos. Este evento leva a um estado de estresse oxidativo que inibe as enzimas envolvidas no ciclo do ácido cítrico, tendo como conseqüência o acúmulo dos intermediários deste ciclo, como o succinato. Existem dois processos responsáveis pela formação do succinato durante o estresse oxidativo que são: a descarboxilação do α-ketoglutarato e a transaminação do oxaloacetato com o glutamato, formando oxoglutarato e aspartato. Estes processos interrompem o ciclo do ácido cítrico e levam à formação e oxidação do succinato no citosol [11]. A formação do succinato por descarboxilação do α-ketoglutarato pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode estar envolvida em várias condições fisiológicas e patológicas, como por exemplo, na isquemia (Figura 3).

Uma vez formado no citosol, o succinato difunde-se através da membrana plasmática da célula até atingir o espaço extracelular onde se liga ao seu receptor GPR91. O transporte de succinato para a corrente sanguínea é realizado por transportadores de ácidos dicarboxílicos. O Indy (gene extensor da vida) foi caracterizado como um transportador de succinato, que independe de sódio, potássio e cloro para exercer sua função. Através de imunohistoquímica, o Indy foi localizado na membrana plasmática, sendo que a expressão predominante ocorre no duodeno inferior e na primeira porção do cólon transverso [12;13]. Em mamíferos um

transportador semelhante ao Indy foi caracterizado. Este transportador possui características próprias sendo dependente de sódio para exercer sua função e sua expressão é maior no fígado e no cérebro [14]. Depois de atravessar a membrana, o succinato se acumula na circulação e se liga ao GPR91 agindo portanto como um hormônio.



LEGENDA: (A) Regulação do metabolismo. O piruvato (PYR), 2- oxoglutarato (KGL) e oxaloacetato (OA) são descarboxilados por peróxido de hidrogênio para formar acetato, succinato e malonato ao invés de Acetil-CoA (acCoA), succinil- CoA (sucCoA), e malato (MAL) ou Fosfoenolpiruvato (PEP) formado enzimaticamente e usado para a síntese de ácidos graxo, colesterol e glicose. Inibição da ROS no ciclo do ácido cítrico predominantemente no nível da aconitase e KGDH. (B) Estabilização e função do HIF-1α. HIF-1α degrada as células em concentrações normais após hidroxilação do resíduo de prolina pela hidroxilase dependente de oxigenio/KGL/Fe (II). Hipóxia, succinato e descarboxilação por H_2O_2 levam a uma diminuição de KGL e um aumento nos níveis de succinato, inibindo a enzima e permitindo o transporte de HIF-1α para o núcleo e transcrição dependente do HIF de uma variedade de genes responsáveis por transporte de oxigênio, vascularização e produção de energia anaeróbica [11].

Figura 3 - Rearranjo do ciclo do ácido cítrico sob ação do peróxido de oxigênio (H_2O_2).

Como já descrito acima, em alguns tecidos, quando o succinato se liga ao seu receptor GPR91, há um aumento da concentração de cálcio intracelular, (Ca_i^{2+}) [3]. O

Ca_i^{2+} não apenas participa da contração muscular, mas também participa de outros processos como diferenciação, secreção, expressão gênica, apoptose e proliferação celular [15]. Este íon regula a atividade de cinases e fosfatases que são importantes para o crescimento celular e a transcricão gênica direta ou indiretamente. Desde que Sidney Ringer, em 1883, demonstrou a necessidade do íon Ca^{2+} na regulação da função cardíaca, através de experimentos em coração de sapo, vários estudos têm sido realizados mostrando que, tanto as células procariotas, quanto às células eucariotas, utilizam o Ca^{2+} como mensageiro intracelular. No coração, a contração é a função mais importante e depende do aumento de Ca_i^{2+}. Sabe-se também que a entrada de Ca^{2+} em excesso em cardiomiócitos é um dos disparadores da apoptose [16].

Na cardiopatia isquêmica, o metabolismo oxidativo é muito importante devido à baixa capacidade do miocárdio em gerar glicólise anaeróbica sendo a fosforilação oxidativa a principal fonte de ATP, mesmo quando o fluxo coronário é reduzido [17]. Portanto as reações do ciclo de Krebs têm importante papel na isquemia cardíaca. A produção de um dos seus intermediários, succinato, a partir de aminoácidos provê um mecanismo anaeróbio para a produção de ATP durante o processo isquêmico e já é sabido que os níveis de succinato aumentam no músculo cardíaco em condições anóxicas e que na isquemia cerebral de ratos o conteúdo de succinato e alanina foram aumentados [10]. Foi descrito anteriormente que os níveis de succinato aumentam no plasma em várias condições hipóxicas.

Tendo em vista que o succinato representa um importante papel na regulação da função cardíaca, nossa hipótese é que o succinato secretado na corrente sanguínea durante um processo isquêmico de células cardíacas possa agir diretamente no coração causando alterações em vias de sinalização clássicas que podem levar à morte celular. Pois já se sabe que, durante e após um evento isquêmico, ocorrem vários efeitos deletérios no coração como a necrose de células irreversivelmente lesadas, acentuado edema celular e a restauração não uniforme do fluxo sanguíneo. Como no processo de isquemia ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de succinato e este pode levar a um aumento de Ca_i^{2+}, o projeto atual se propõe investigar se cardiomiócitos expressam o GPR91 e se o succinato aumenta o transiente de Ca^{2+} nestas células, alterando, por conseqüência, a função cardíaca.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ação do succinato em cardiomiócitos.

2.2 Objetivos específicos

1) Investigar se cardiomiócitos expressam o receptor de succinato, GPR91. Para investigar a presença e a localização do GPR91 em cardiomiócitos foram utilizados RT-PCR e imunofluorescência.
2) Avaliar o efeito agudo e prolongado do succinato em cardiomiócitos. Para investigar se o succinato altera o transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos utilizamos sondas fluorescentes marcadoras de cálcio (fluo-4/AM e Rhod-2/AM). Além disso, técnicas de Western Blot e imunofluorescência foram empregados para estudar o mecanismo pelo qual o succinato altera o sinal de Ca^{2+} intracelular.
3) Avaliar o papel do succinato em coração isolado. Para estudar o papel do succinato no órgão, foi utilizado o método de perfusão de coração isolado descrito por Langendorff. Parâmetros como tensão sistólica e diastólica, fluxo coronariano e frequência cardíaca foram avaliados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 12 ratos Wistar machos, de quatro a cinco dias, para a extração de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos (RN). Para a extração de cardiomiócitos ventriculares provenientes de ratos adultos (AD) e experimento de coração isolado, utilizamos ratos Wistar machos, de oito a 10 semanas. Todos os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Após o fornecimento, os animais permaneceram no biotério do Departamento de Fisiologia do ICB/UFMG até o dia da realização dos experimentos. Todos os experimentos utilizando animais foram feitos seguindo o guia para cuidado e uso de animais de laboratório de acordo com o Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

3.2 Material

Anticorpo monoclonal anti-βactina, ácido succínico, laminina, Xestospongin C, H89, 2-APB, penicilina, estreptomicina, Citosina β-D-arabinofuranoside (ARA-C), fibronectina, meio de cultura (DMEM), pirofosfato de sódio, NaF, NaCl, EDTA, EGTA, Na_3VO_4, Triton 100, isopropanol, leupeptina, aprotinina, anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP, Goat anti-rabbit IgG-HPR) Tris-Tween 20, todos estes reagentes foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO). Fluo-4/AM, Rhod-2/AM, Mitotracker verde, anticorpos secundários conjugados com Alexa-488, Alexa-568, kit para detecção da viabilidade e citotoxicidade celular, kit SuperScript III para síntese de primeira fita para RT-PCR, SuperMix, reagente TRizol, fluo-4 aceto-metil-éster (Fluo-4/AM), rhod-2/AM e Lipofectamina foram obtidos da Invitrogen (Eugene, OR). Anticorpos monoclonais: anti-RyR, anti-Phospholambam e anti-SERCA foram adquiridos da Affinity Bioreagents (Golden, CO). Anticorpo policlonal anti-GPR91 foi obtido da Millipore (Temecula, CA), anticorpo anti-phospho-Phospholamban (Ser-16) foi obtido da Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY), anticorpo anti-phospho-RyR2 (Ser- 2809) foi adquirido da Badrilla (West Yorkshire, UK). Enhanced chemiluminescence (ECL-plus Western Blotting Detection System), tris HCl/SDS, Glicerol, SDS, β-mercaptoetanol, azul de

Bromofenol, solução de Ponceau e anticorpos conjugados a peroxidase foram comprados da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). Kit para extração de cultura primária de cardiomiócitos neonatos contendo solução salina balanceada hanks (HBSS) tripsina, colagenase, foi obtido da Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ). Soro fetal bovino (FBS) adquirido da Gibco (Grand Island, NY), membrana de PVDF, obtida da Bio-Rad (Philadelphia, PA). Kit para detecção da atividade da caspase-3 foi obtida da BD Biosciences (San Jose, CA USA). Anticorpos para NFATc3 e AKT fosforilada foram obtidos da Cell Signaling (Boston, MA). O sensor de PKA foi gentilmente cedido pelo Dra. Jin Zhang (Johns Hopkins University School of Medicine). Myriadenolide foi doado pela Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes (Universidade Federal de Minas Gerais).

3.3 Cultura primária de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos

Ratos Wistar de 4 a 5 dias foram utilizados neste experimento. Os ratos foram decapitados com a tesoura e submetidos à toracotomia mediana. O coração foi identificado, isolado e, ainda em contração, foi colocado imediatamente em um tubo falcon contendo Solução Salina Balanceada Hanks (HBSS) que estava a 4ºC, no fluxo laminar, os corações foram picotados em pedaços de 1 mm^3 e lavados com HBSS para retirada de hemácias. Os pedaços de coração foram colocados em um tubo falcon contendo tripsina 100 μg/mL, diluída em HBSS, homogeneizados delicadamente e incubados a 2-8°C por 16-20hs. Após este tempo de incubação com a tripsina, os pedaços de tecido foram incubados com colagenase 300 units/ml, por 30 a 40 minutos. As células foram ressuspendidas em DMEM, plaqueadas em lamínulas ou garrafas pré-incubadas com fibronectina (10 µg/ml) e mantidas a 37º C em incubadora com 5% CO_2. Dois dias após o plaqueamento, o meio de cultura foi trocado para outro contendo 20 µg/ml de citosina B-D-arabinofuranoside (ARA-C). O ARA-C incorpora-se ao DNA e inibe a replicação ao formar complexos de clivagem com a topoisomerase I resultando em fragmentação, mas não inibe a síntese de RNA, diminuindo assim a contaminação da cultura por outras células que não são cardiomiócitos. Os RN foram utilizados no quarto-quinto dia de cultura. Neste ponto, havia aproximadamente 5-6 x 10^4 cardiomiócitos por placa de cultura, os quais correspondem a aproximadamente 95% da população total de células.

3.4 Isolamento dos cardiomiócitos ventriculares de ratos adultos

Para a obtenção dos cardiomiócitos provenientes de ratos adultos foi utilizado o procedimento padrão para a dissociação enzimática do tecido [18]. Ratos Wistar machos pesando entre 200 e 300 gs foram decapitados com guilhotina e os corações foram removidos rapidamente e perfundidos através do método de Langendorff com uma solução Tyrode sem Ca^{2+}. Posteriormente os corações foram então perfundidos com uma solução contendo 50 mM de $CaCl_2$, 1,4 mg/ml de colagenase (tipo 2) e 0,04 mg/ml protease (tipo XIV), até que ficassem macios (5 min). Os corações foram removidos da perfusão e picotados e ficaram sob agitação durante quatro minutos em uma solução de Tyrode contendo: 50 mM de $CaCl_2$, 0,7 mg/ml colagenase e 0,02 mg/ml de protease. Após este procedimento as células foram filtradas em filtro de 200 mm para remoção de pedaços de tecidos. Depois da filtração, as células foram ressuspendidas em uma solução contendo 0,5 mM de Ca^{2+} durante 10 minutos. As células foram armazenados em meio DMEM até o momento de sua utilização. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (22-24°C). Os cardiomiócitos isolados foram utilizados em experimentos por um prazo de até seis horas após o isolamento.

3.5 Perfusão de coração isolado (Langendorff-mode perfusion)

A preparação de coração isolado foi feita de acordo com Langendorff (figuras 4 e 5). Os animais foram previamente heparinizados, anestesiados e submetidos a uma toracotomia mediana. O coração foi isolado, removido e perfundido por 20 minutos com uma solução salina fisiológica contendo bicarbonato de sódio e mantida a uma temperatura de 37ºC na presença de borbulhamento com 5% CO_2 a fim de manter o pH fisiológico de 7,4. Os corações controle foram perfundidos com esta solução por uma hora, enquanto os corações experimentais foram perfundidos por uma hora com esta mesma solução acrescida de 10 mM de succinato. A pressão hidrostática foi mantida constante e as tensões sistólicas e diastólicas, o fluxo coronariano e a frequência cardíaca foram mensurados de dois em dois minutos pelo software Biopac System.

A **B**

LEGENDA: Após a retirada do coração e canulação da aorta o mesmo era adaptado ao sistema tipo Langendorff. O painel A mostra um coração de rato isolado e montado em um sistema de perfusão, após canulação da aorta. O painel B mostra o sistema de Langendorff acoplado a um sistema de aquisição de dados onde foram registradas as medidas feitas durante o experimento.

Figura 4 - Coração de rato adaptado ao sistema de perfusão, tipo Langendorff.

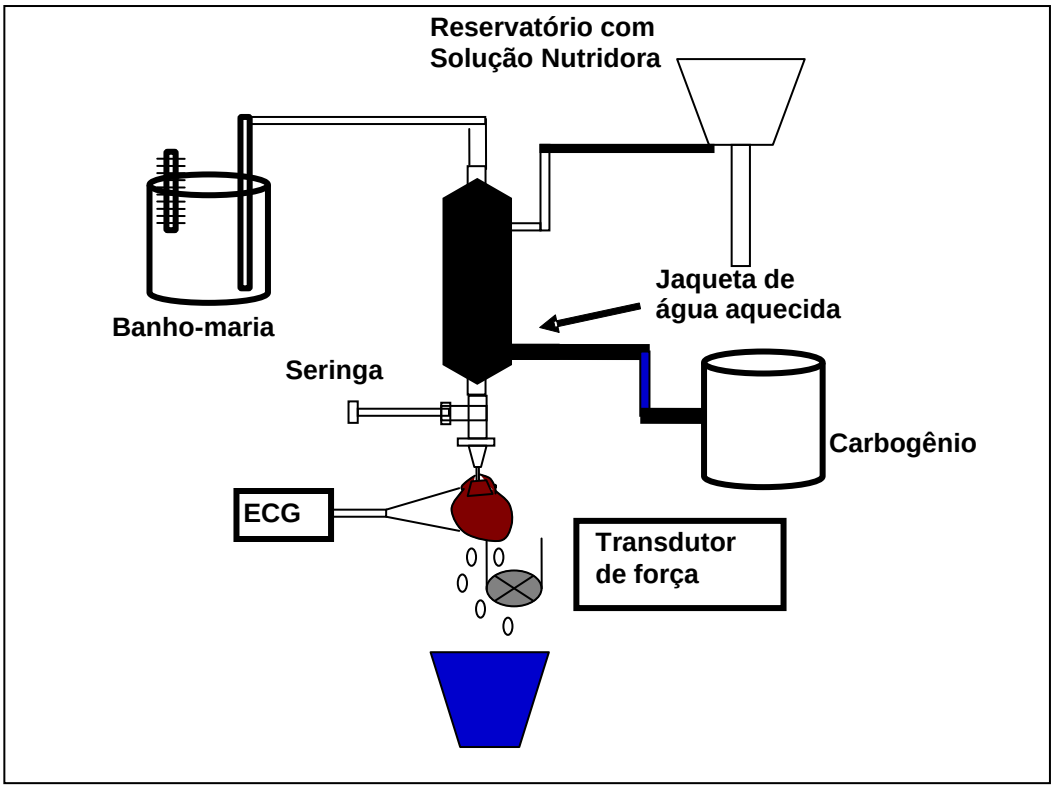


Figura 5 - Funcionamento do sistema Langendorff.

Durante o experimento demonstrado na figura 5 a solução nutridora foi aquecida e oxigenada com gás carbogênio. A aorta foi canulada e acoplada à

seringa. O coração foi acoplado a um transdutor de força e eletrocardiograma, que monitora a tensão e a atividade elétrica do coração. EC: eletrocardiograma.

3.6 Western Blotting

Cardiomiócitos provenientes de ratos adultos foram isolados, como descrito anteriormente, e tratados com 10 mM de succinato por 30 minutos ou uma hora. As proteínas foram solubilizadas em tampão de lise contendo 50 mM pirofosfato de sódio, 50 mM NaF, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 2 mM Na_3VO_4, 10 mM HEPES 1X 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.

As proteínas foram quantificadas e diluídas (5 μg/mL) em tampão de amostra (4X 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 6, 10 e 15%, dependendo da massa molecular da proteína estudada. Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por uma hora em solução de bloqueio (Tampão salino de Tris-Tween 20 com 5% de leite desnatado) e posteriormente as membranas foram incubadas por 12 horas em uma temperatura de 4ºC com o anticorpo primário específico.

Utilizamos os seguintes anticorpos primários: anti-β-actina (1:10000), anti-receptor de rianodina (1:5000), anti-receptor de rianodina fosforilada (Ser- 2809) (1:5000), anti-fosfolamban (1:5000), anti-fosfolamban fosforilada serina-16 (1:500), anti-serca 2 ATPase (1:5000). Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão salina de Tris-Tween 20, contendo 0.2% de Tween 20 (TBST, 15 minutos por quatro vezes) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP) (Goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000, Goat anti-rabbit IgG-HPR). As membranas foram novamente lavadas em TBST (15 minutos por quatro vezes). As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant ™. Dependendo do experimento, a membrana de PVDF foi submetida a um stripping (1 litro de solução estoque contendo 100 mM 2-Mercaptoetanol, 2%

SDS, 62,5 mM tris-HCl diluída em água milli-Q) e colocada em um tubo falcon contendo 50 mL de solução de stripping estoque e mantida durante 30 minutos a uma temperatura de 50ºC sob agitação sendo trocada de 10 em 10 minutos. Após 30 minutos, a membrana foi lavada com TBST (sete vezes de 10 minutos cada) e, novamente, incubada em solução de bloqueio (TBST 5% de leite desnatado). Posteriormente as membranas foram incubadas por 12 horas em uma temperatura de 4ºC com o anticorpo primário específico. Após esta incubação, as membranas foram lavadas com TBST (15 minutos por quatro vezes) e incubadas por uma hora com o anticorpo secundário específico. As membranas foram novamente lavadas em TBST (15 minutos por quatro vezes). As bandas protéicas foram detectadas por reação de quimioluminescência (ECL plus) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant™.

3.7 Imunofluorescência

Para a realização dos experimentos de imunofluorescência os cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos foram tratados com 10 mM de succinato por seis horas ou 12 horas. Posteriormente, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% diluído em PBS, durante 15 minutos e permeabilizadas com solução de triton X, 0,5% (diluído em PBS). As células foram incubadas com solução de bloqueio (PBS contendo 1% de BSA, 0,5% triton, 5% de soro de cabra) por uma hora. Após o bloqueio, as células foram incubadas por duas horas em PBS 1% BSA contendo um dos seguintes anticorpos primários: NFATc3 (1:25), AKT fosforilada (1:50) ou anti-GPR91(1:25), durante duas horas à temperatura ambiente. Algumas células, foram marcadas com DAPI (1:100) por uma hora. Em seguida, as células foram lavadas em PBS e incubadas por uma hora em PBS 1% BSA contendo anticorpo secundário conjugado Alexa 488 (1:500). Os controles negativos foram incubados apenas com anticorpo secundário. Ao final, as células foram lavadas três vezes e as lamínulas montadas usando solução de montagem hidromount. Na imunofluorescência para GPR91, as células não foram permeabilizadas para evitar a difusão do anticorpo no citosol.

Imagens da imunofluorescência foram obtidas em microscópio confocal Bio-Rad MRC-1024 (Hercules, CA) e um microscópio confocal Zeiss LSM usando a objetiva de imersão à óleo com aumento de 63X. Foi usado o laser Argon 488 para

excitar e a emissão foi coletada entre 505 e 530 nm. Para detectar DAPI a excitação foi de 258 nm e observadas em 461 nm.

3.8 Reação em cadeia da polimerase

Reação de RT-PCR foi utilizada para verificar a presença de GPR91 em cardiomiócitos. RNA total de cardiomiócitos provenientes de ratos Wistar adultos foram extraídos com Trizol, obtido da Invitrogen (Carlsbad, CA). A partir deste RNA, foi sintetizado o cDNA com o kit SuperScript^{TM}-III First-Strand Syntesis System for RT-PCR, usando- se dois controles negativos: o primeiro, sem RNA, para verificar se havia alguma contaminação dos reagentes utilizados e o segundo, sem a transcriptase reversa, para verificar se havia alguma contaminação do RNA extraído com DNA genômico. O cDNA foi usado, então, como template para a PCR. A amplificação foi realizada com o termociclador PTC-100 (MJ Research, Watermown, MA) utilizando 3 µl de cDNA, 200 µM de dNTPs, 2,5 mM de $MgCl_2$, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 400 nM de cada primer para um volume final de 25 µl. Os iniciadores sense e antisense utilizados foram: foward 5' TTA CGC CAC TGG GAA CTG GA 3'; reverse 5' TTG ATG GCC TTC TGG GAA CA 3'. Os iniciadores foram desenhados usando o software Primer 3 baseado na sequência gênica do GPR91 encontrada no Banco de dados da NCBI nucleotídeo (número de acesso NM_001001518.1). As amostras foram submetidas a aquecimento inicial de 94°C por cinco minutos, 94ºC por 45 segundos e 61ºC por 45 segundos, sendo este ciclo, repetido por 35 vezes. A reação foi terminada por um período de extensão de 10 min a 72°C. O produto da PCR, um fragmento de 470 pb (pares de base), foi analisado em gel de agarose 1,5%.

Foi realizado RT- PCR semi-quantitativo para investigar se o succinato altera a expressão do receptor de Rianodina. Para isso, foi extraído RNA total com Trizol de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos controle e tratados com succinato durante seis e 12 horas. O RNA foi usado como molde para a síntese de cDNA, que foi submetido à reação de PCR. Os reagentes foram usados nas concentrações já descritas acima. Os iniciadores utilizados foram: foward 5'CAY YTN YTN GAY ATH GC5 ATG GG3' e reverse 5'ADR TAR TTN GC5 ARR TTR TGY TC3'. As amostras foram submetidas a aquecimento inicial de 94ºC por dois minutos, 94ºC por 45 segundos, 54ºC por um minuto e 72ºC por um minuto. Amostras das reações foram

extraídas após 20, 25, 30 e 35 ciclos. O produto da PCR, fragmento de 530 pb, foi analisado em gel de agarose 1,5%.

Foram comparados os níveis de transcrição nas amostras correspondentes ao controle e a cada tempo de tratamento com succinato. Como controle interno da reação, foi feita PCR para HPRT, utilizando-se cDNA obtido a partir do mesmo RNA usado para a reação de Rianodina. Os iniciadores para HPRT foram: forward 5'CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT3'; reverse 5`GTC AAG GCA TAT CCA ACA ACA AA3`. As amostras foram submetidas a aquecimento inicial de 94ºC por dois minutos, 94ºC por 45 segundos, 60ºC por 45 segundos e 72ºC por 30 segundos. Amostras das reações foram retiradas em 20 ciclos, 25 ciclos, 30 ciclos e 35 ciclos. O produto da PCR, fragmento de 370 pb, foi analisado em gel de agarose 1,5%.

3.9 Perfil de expressão do receptor GPR91

O website SAGE Anatomic Viewer (SAV) (http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/AnatomicViewer) foi utilizado para analisar o perfil de expressão gênica do receptor GPR91 em tecido cardíaco baseado na comparação com bancos de dados de EST (Tag sequence expressed) de ratos.

3.10 Ensaio de caspase

Foi utilizado o kit para ensaio colorimétrico da atividade da caspase-3. Os cardiomiócitos neonatais e adultos foram tratados com 10 mM de succinato, durante 12 horas ou uma hora, respectivamente. Para este experimento, foram utilizadas 2X 10^6 células controle e todas foram tratadas com e sem substrato. Após a contagem e tratamento das células com succinato, as mesmas foram centrifugadas a 400 X G por cinco minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado estocado em freezer a -70ºC por 12 horas. Os precipitados foram então ressuspendidos em 50 µL de tampão de lise e o procedimento prosseguiu conforme o manual do usuário [19]. Myriadenolide foi usado como controle positivo [20].

3.11 Detecção do aumento de Ca^{2+} citosólico e mitocondrial

A detecção do aumento de Ca^{2+} citosólico e mitocondrial foi realizada utilizando-se o Fluo-4/AM e o rhod-2/AM, respectivamente. O tratamento com 10 mM

de succinato foi realizado durante 30 minutos ou uma hora em cardiomiócitos provenientes de ratos adultos. Nos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos o tratamento com 10 mM de succinato foi por seis seis e 12 horas; após terem sido tratadas com succinato, as células foram incubadas com DMEM contendo 6 µM de Fluo-4/AM ou rhod-2/AM durante 30 min (37ºC). Em seguida, as células foram lavadas com DMEM sem a sonda fluorescente e transferidas para uma câmara de perfusão acoplada a um microscópio Zeiss (Axiovert 100). As imagens e as medidas da fluorescência das células foram obtidas com o sistema a laser confocal (Bio-Rad MRC 1024) utilizando-se uma objetiva de imersão em óleo água (63 X, 1,2 AN) acoplada ao microscópio Zeiss. Em alguns experimentos, cardiomiócitos provenientes de animais adultos foram plaqueados em lamínulas pré-tratadas por duas horas com laminina (20 mg/mL em Hepes). A laminina foi removida instantes antes do plaqueamento dos cardiomiócitos. As células foram excitadas com o laser de criptônio/argônio (488 nm) e a intensidade de emissão da fluorescência acima de 515 nm foi coletada utilizando-se a modalidade de decurso temporal. Nos experimentos para a medida de Ca_i^{2+}, as células foram estimuladas a uma freqüência de 1 Hz pelo estimulador de pulso isolado.

As células marcadas com rhod-2/AM foram inicialmente perfundidas com HEPES 1X (130 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM de $MgSO_4$; 1,2 mM KH_2PO_4; 1,25 mM de $CaCl_2$; 4,9 mM de glicose e 19,7 mM de HEPES) até o estabelecimento de uma linha de base. Em seguida, as células foram perfundidas om HEPES 1X contendo 10 mM de succinato e novamente lavadas com HEPES 1X.

As imagens foram analisadas e processadas utilizando os seguintes softwares: Lasersharp (Bio-Rad), Windows Excel, Prism 3.0, Confocal Assistant 4.02 e Adobe Photoshop 6.0.

3.12 Detecção de viabilidade/citoxicidade celular

Para esse experimento foi utilizado o kit LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Os cardiomiócitos provenientes de ratos adultos e de ratos neonatos após tratamento com 10 mM de succinato por uma e 12 horas, respectivamente, foram incubados com 2 mL de HEPES 1X contendo 0,5 µL de calceína e 1,0 µL de Etídeo Homodímero por 30 minutos protegidos da luz. Após o tempo de coloração, as células foram lavadas com HEPES 1X e, em seguida, transferidas para uma câmara

de perfusão acoplada a um microscópio Zeiss (Axiovert 100). As imagens e as medidas da fluorescência das células foram obtidas com o sistema a laser confocal (Bio-Rad MRC 1024) utilizando-se uma objetiva de imersão em óleo (63X, 1,4 AN) acoplada ao microscópio Zeiss. As células foram excitadas com o laser de criptônio/argônio 488 nm e a intensidade de emissão da fluorescência acima de 515 nm foi coletada. Os resultados foram interpretados a partir da comparação da porcentagem de células mortas do controle com as células tratadas [21].

3.13 Tratamento com Xestospongin C, 2-APB e H89

H89 (3 mmol/ L), 2APB (10 mmol/ L) ou Xestospongin C (3 mmol/ L) foram adicionados 30 minutos antes da adição de 10 mmol/ L succinato nos cardiomiócitos [22-24]. Em seguida, cardiomiócitos foram carregados com 6 µmol/ L de Flúor-4/AM por 30 min a 37ºC e submetidos à estimulação elétrica (ondas quadradas, 1Hz/sec). Após este processo, as imagens foram coletadas como descrito anteriormente.

3.14 Mensuração da atividade da PKA

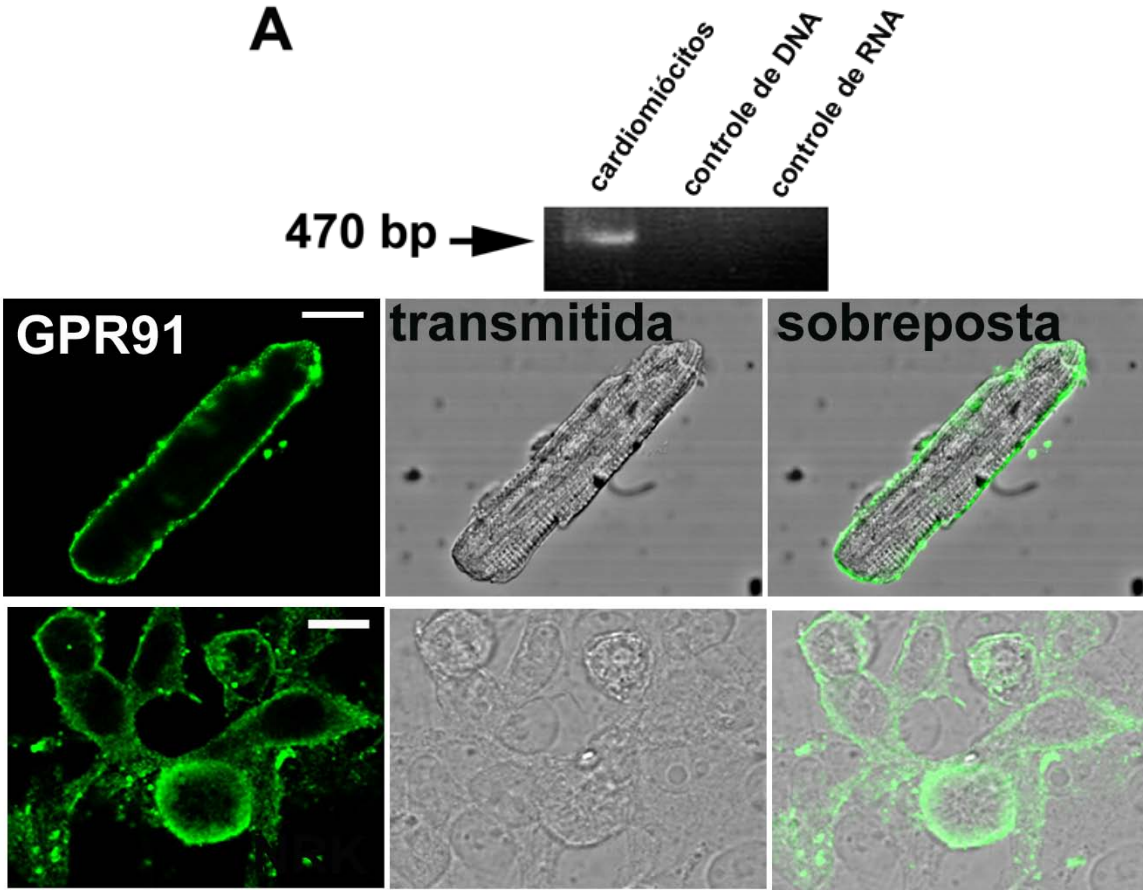
Um plasmídio sensor de PKA baseado em AKAR3 [25], foi transfectado em cardiomiócitos neonatais no quarto dia de cultura utilizando Lipofectamina de acordo com as instruções do fabricante. Para cada placa contendo cerca de 5-6 x 10^4 células, 4 mgs de DNA foram utilizados. Os experimentos foram realizados 48 horas após a transfecção. As lamínulas contendo as células foram transferidas para uma câmara de perfusão e observadas pelo microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Hercules, CA), utilizamos objetiva de 63X, 1,4. A proteína fluorescente verde foi detectada por excitar a amostra a 458 nm, a luz emitida entre 475 nm e 505 nm usando o sistema Zeiss LSM META 510. A fluorescência do aceptor (proteína fluorescente amarela) foi coletada no comprimento de 515 nm usando um filtro próprio. A atividade da PKA é expressa como a razão entre a fluorescência amarela e a fluorescência verde.

3.15 Análise estatística

Todos os dados expostos representam no mínimo, um número de três experimentos independentes e foram expressos pela média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada com o Programa PRISM statiscal software (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando one-way ANOVA. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

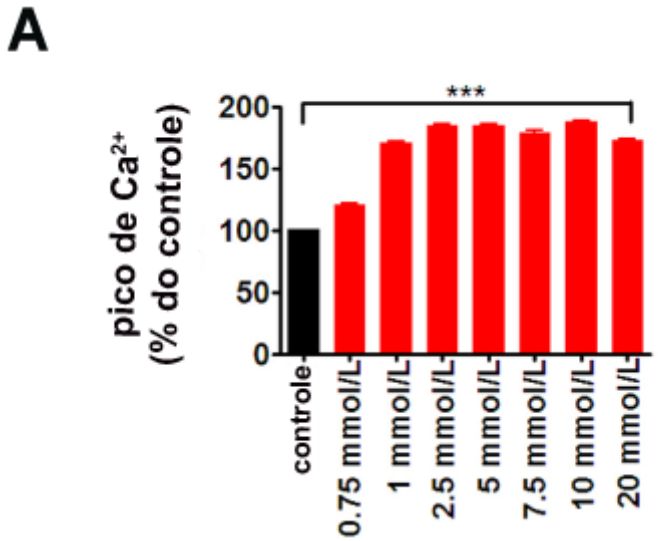
Recentemente foi descoberto que GPR91, antes conhecido como um receptor órfão acoplado a proteína G, funciona como receptor para succinato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico [3]. No presente estudo, demonstramos por RT-PCR (figura 6A), que cardiomiócitos provenientes de ratos adultos também expressam o receptor GPR91. Além disso, observamos, conforme esperado para um receptor acoplado a proteína G, que GPR91 está localizado na membrana plasmática destas células (figura 6B). Como controle positivo para GPR91 realizamos imunofluorescência em células NRK (linhagem de células renais), uma vez que foi previamente relatado que GPR91 é altamente expresso no rim [3].



LEGENDA: (A) RNA total foi isolado de cardiomiócitos provenientes de ratos adultos usando reagente Trizol. Amostras de RNA foram transcritas em cDNA. Duas reações controle foram feitas. Uma contendo RNA, sem adicionar transcriptase reversa (controle de RNA) e em outra sem adicionar RNA (controle de DNA). Uma banda de 470 pb, correspondente ao tamanho esperado do GPR91, foi observada em cardiomiócitos. (B) Imagem de imunofluorescência confocal demonstra localização do receptor GPR91 na membrana plasmática de cardiomiócitos provenientes de ratos adultos (painel a esquerda). Imagem transmitida (painel central) e imagem sobreposta (painel a direita). No painel inferior, pode-se observar a presença do GPR91 em células NRK, que foram usadas como controle positivo. Escala de barra = 10 µm.

Figura 6 - Imagem de imunofluorescência e PCR em cardiomiócitos.

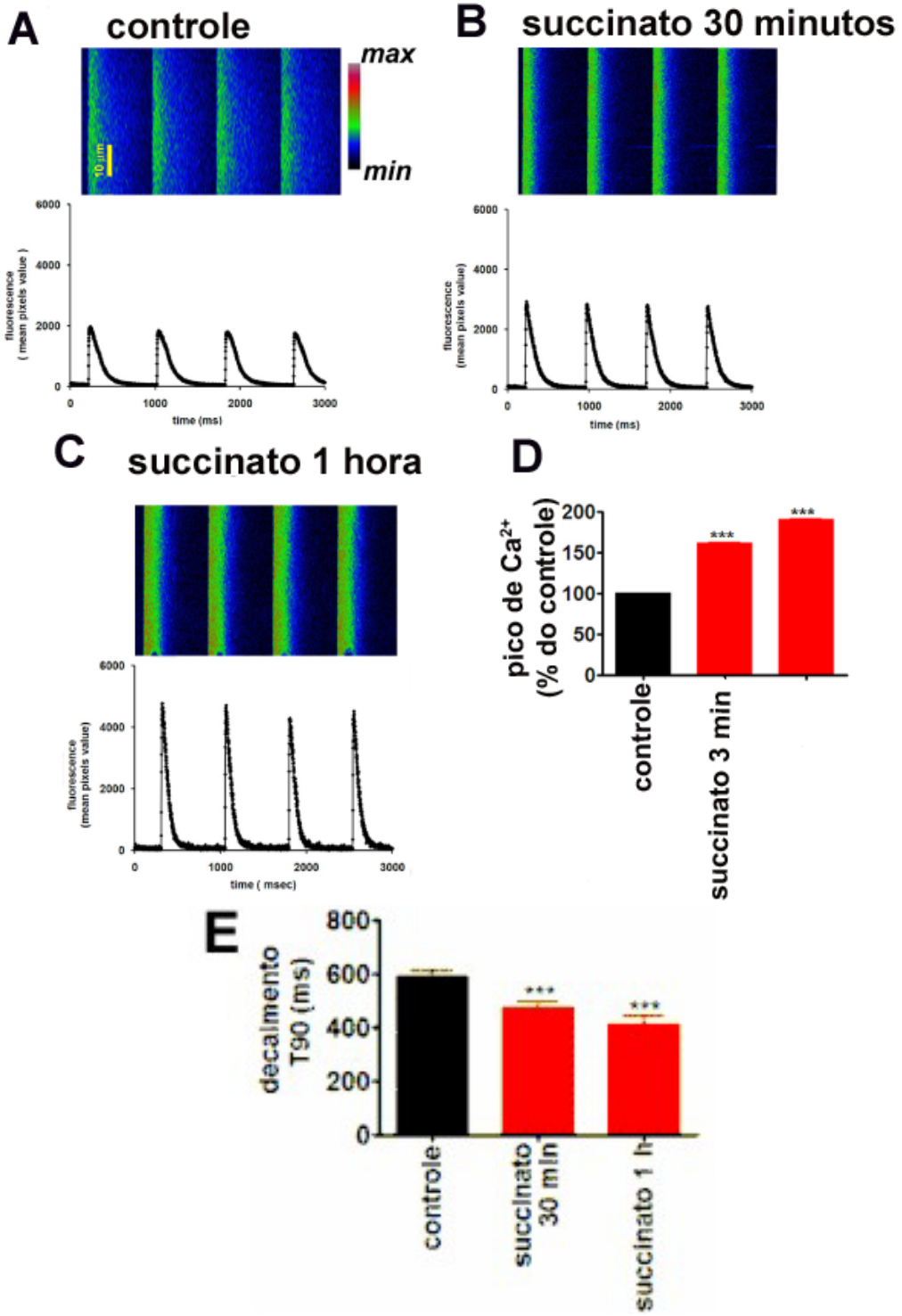
Tem sido demonstrado que o succinato leva ao aumento dos níveis Ca_i^{2+} [3;4;6]. Portanto, avaliamos a capacidade de diferentes concentrações de succinato em modular o transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos ventriculares provenientes de ratos adultos. As células foram isoladas e carregadas com Fluo-4/AM (figura 7A). Em cardiomiócitos, o succinato aumenta o transiente de Ca^{2+} de forma concentração dependente. Nos próximos experimentos utilizamos a concentração de 10 mM porque, como descrito, as concentrações de succinato durante um processo isquêmico alcançam valores em milimolares e esta concentração induziria a resposta máxima [5].



LEGENDA: (A) Cardiomiócitos provenientes de ratos adultos foram tratados com 0.75 mmol/L, 1 mmol/L, 2,5 mmol/L, 5 mmol/L, 7,5 mmol/L, 10 mmol/L e 20 mmol/L de succinato por 30 min e incubados com Fluo-4/AM (6 µM) por 30 min antes dos experimentos. As imagens foram capturadas utilizando microscópio confocal. Gráfico de barras indica a média ± erro padrão da média do pico de Ca^{2+} plotado como F/F_0, sendo F fluorescência total e F_0 fluorescência basal. Grupo controle: representa células não tratadas n = pelo menos 35 células (p*** < 0,001). n = representa o número de células.

Figura 7 - Figura representativa do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos.

Em cardiomiócitos provenientes de ratos adultos o tratamento com succinato por 30 minutos e uma hora aumentou a amplitude do transiente de Ca^{2+} em 60% e 90,8%, respectivamente, quando comparadas com células controle (figura 8B-D). Além disso, o succinato diminuiu o tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+}. Quando os cardiomiócitos foram tratados por 30 minutos ou por uma hora, ambas comparadas com as células controle (figura 8E), ($p < 0,001$).

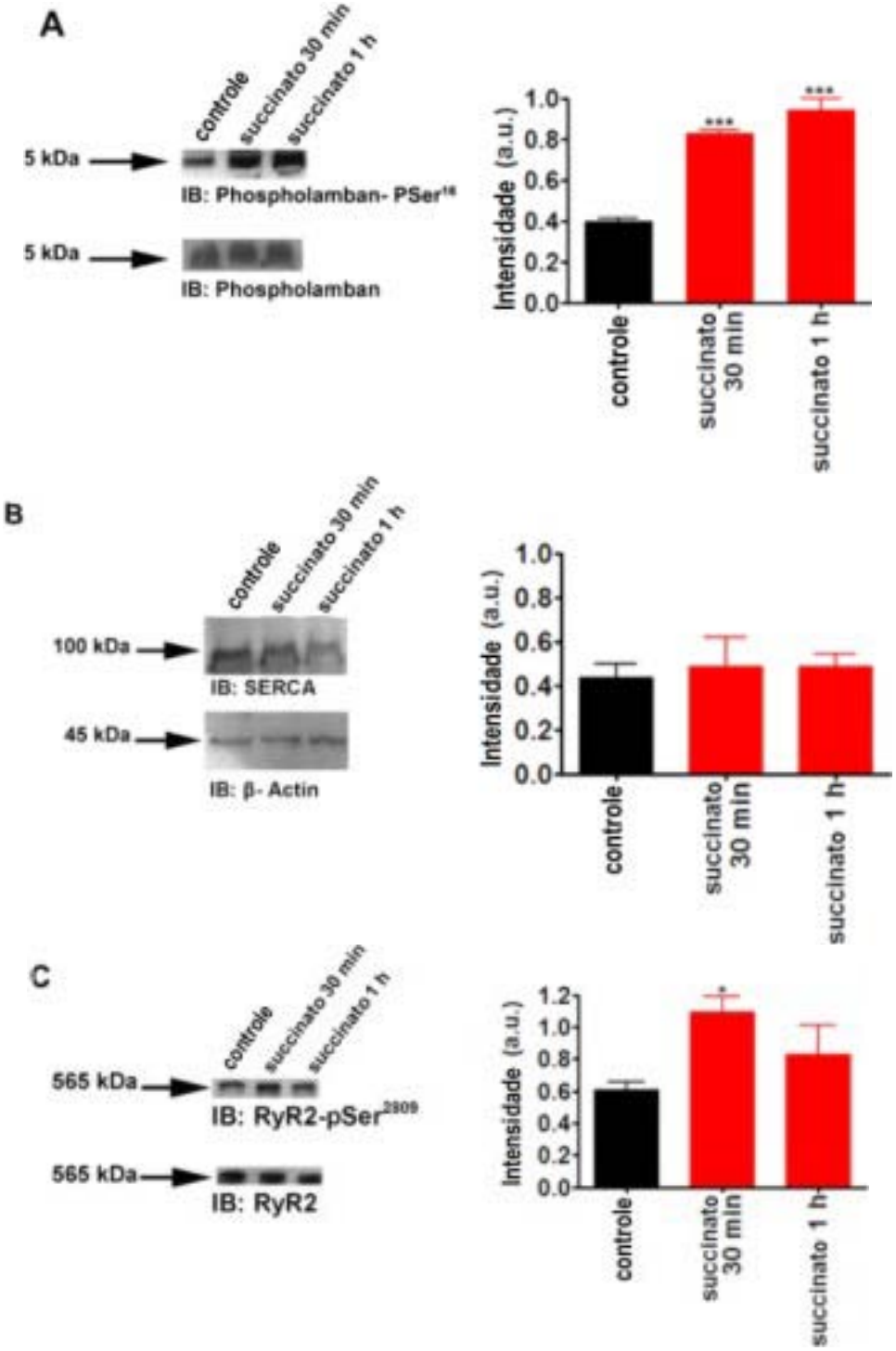


LEGENDA: (A-C) Cardiomiócitos provenientes de ratos adultos foram tratados com 10 mM de succinato em diferentes tempos: 30 min ou uma hora e incubados com Fluo-4/AM (6 µM) por 30 min antes dos experimentos. As imagens foram capturadas utilizando microscópio confocal. (D) Gráfico de barras indica a média ± erro padrão da média do pico de Ca^{2+} plotado como F/F_0, sendo F fluorescência total e F_0 fluorescência basal comparado com o controle (células não tratadas). O tratamento com succinato por 30 min ou uma hora aumentou em 61,2% e 90,8 %, respectivamente, o transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos adultos. (E) O tratamento com succinato diminuiu o tempo de decaimento do Ca^{2+} (demonstrada como T90), quando os cardiomiócitos foram tratados por 30 min (n = 61) ou por uma hora (n = 52), ambas comparadas com as células controle (p*** < 0,001). n = representa o número de células.

Figura 8 - Figura representativa do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos em diferentes tempos de tratamento com succinato.

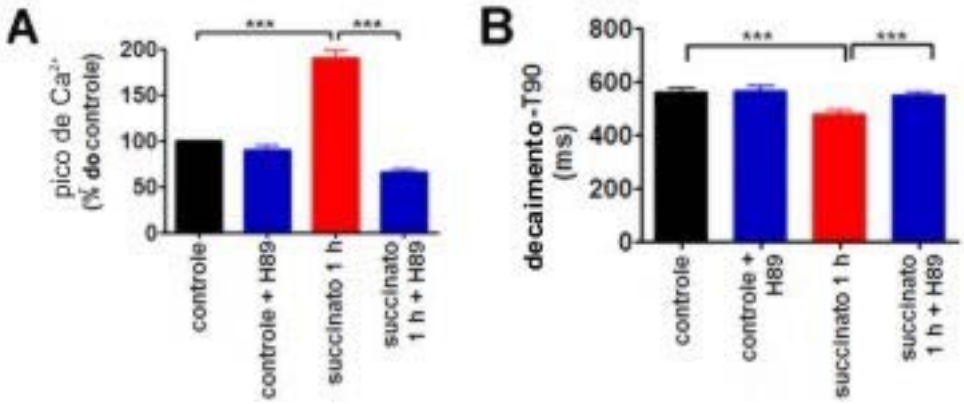
A captação do Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático é resultado da ação da SERCA. A SERCA é uma bomba dependente de ATP que tem sua atividade controlada por uma outra proteína conhecida como fosfolamban. A fosfolamban (PLN) quando fosforilada no resíduo aminoacídico serina 16, sítio de fosforilação da PKA, é conhecida por diminuir o efeito inibitório na SERCA levando a uma rápida recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático (RS) [26;28]. Demonstramos que o tratamento com succinato por 30 minutos ou uma hora resultou em 125 ± 0,015% ($n = 4$, $p < 0,001$) e 150 ± 0,05% ($n = 4$, $p < 0,001$) de aumento na fosforilação de PLN Ser^{16}, respectivamente (figura 9A). Como esperado, o aumento dos níveis de fosforilação da PLN não foi acompanhado por alterações na expressão da SERCA (figura 9B). Investigamos também os níveis de fosforilação do receptor de rianodina (RyR), uma proteína envolvida na dinâmica de Ca^{2+} na célula cardíaca. Observamos que a fosforilação de RyR, no sítio de fosforilação pela PKA Ser^{2809}, foi de 83 ± 0,09% ($n = 4$, $p < 0,05$) em cardiomiócitos tratados com succinato por 30 minutos quando comparado ao controle (figura 9C). No entanto, houve redução nos níveis de fosforilação de RyR em Ser^{2809} após uma hora de tratamento com succinato.

Em conjunto, estes resultados fornecem evidências de que succinato modula diretamente os níveis de fosforilação de PLN e RyR, principais proteínas envolvidas na dinâmica de Ca^{2+} em cardiomiócitos. O fato de o succinato aumentar o nível de fosforilação de dois conhecidos sítios de fosforilação pela PKA em PLN e no RyR é indicativo de que a via da G_s dependente da adenilato ciclase está possivelmente, ativada na célula tratada com succinato. Isto nos levou a investigar se a PKA é um mediador da sinalização induzida pelo succinato. Portanto, examinamos o efeito do H89, um inibidor da PKA, em mediar as alterações no transiente de Ca^{2+}. Descobrimos que o H89 reverte o efeito do succinato no sinal de Ca^{2+} (U.A. = 190 ± 7,22 em 40 células tratadas com succinato por uma hora vs 66,71 ± 7,2, em 60 células tratadas com succinato por uma hora, $p < 0,001$) (figura 10A). O H89 também foi eficaz em bloquear o efeito do succinato no decaimento do transiente de Ca_i^{2+} (477,5 ± 12,59 ms em 40 células tratados com succinato por uma hora vs 550 ± 10 ms, em 60 células tratadas com succinato por uma hora + H89 $p < 0,001$) (Figura 10B).



LEGENDA: (A) Western blot das proteínas totais de cardiomiócitos provenientes de ratos adultos demonstra que o tratamento com 10 mM de succinato por 30 min ou uma hora, aumenta os níveis de fosforilação da fosfolambam em 125% (n = 4; p < 0,001) e 150% (n = 4; p*** < 0,001), respectivamente, ambas quando comparadas ao controle. (B) Western blot das proteínas totais de cardiomiócitos provenientes de ratos adultos demonstra que o tratamento com 10 mM de succinato por 30 min ou uma hora, não altera a expressão da SERCA (n = 4). (C) O tratamento com succinato aumentou os níveis de fosforilação do receptor de RyR. Cardiomiócitos provenientes de ratos adultos foram tratados por 30 min ou uma hora com 10 mM de succinato. Western blot das proteínas totais demonstra que o tratamento com succinato por 30 min aumenta os níveis de fosforilação da RyR em 83%, (n = 4 experimentos independentes). *p < 0,05, quando comparado com o controle. Não foi observada a alteração nos níveis de expressão do RyR nos diferentes grupos experimentais.

Figura 9 - Figura e gráfico representativos de Western Blot.



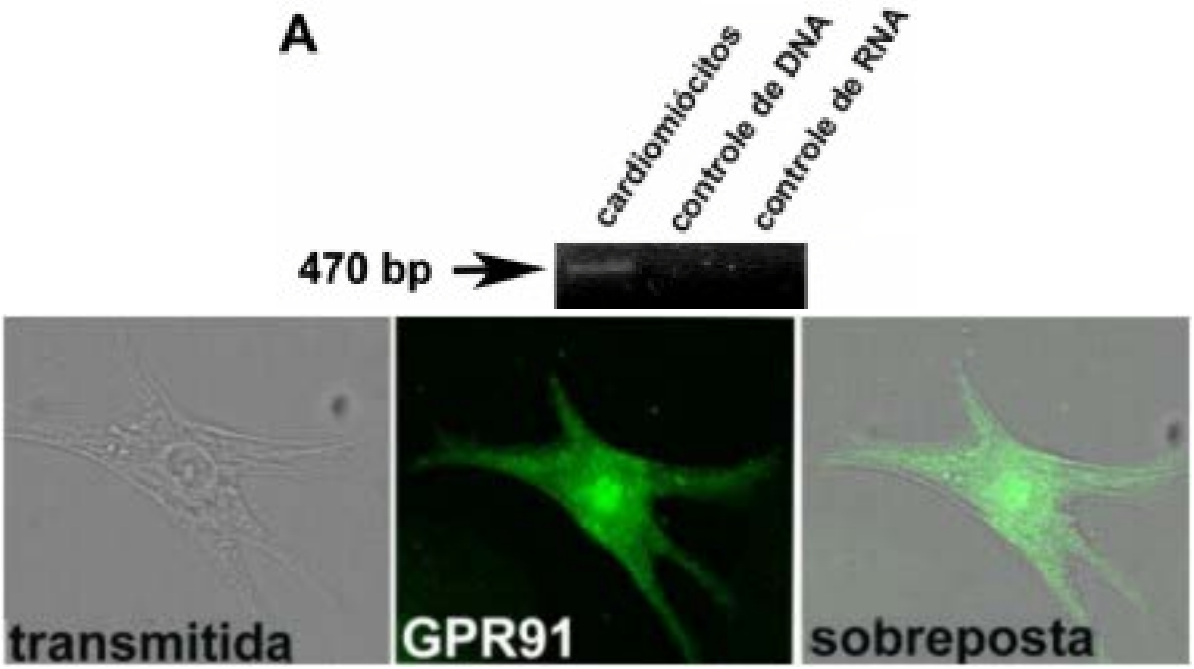
LEGENDA: (A) Cardiomiócitos provenientes de ratos adultos foram tratados com succinato (10 mM) por 1 hora e incubadas durante 30 min com H89 (3 µM). Gráfico de barras demonstra a média do pico do transiente plotado como porcentagem (%) de aumento da fluorescência, comparadas ao controle. H89 diminui a amplitude do pico do transiente de cálcio. (B) O decaimento do transiente de Ca^{2+} (representado como T90) foi maior em células incubadas com H89 (3 µmol/L) e tratadas com succinato por uma hora, quando comparadas as células tratadas com succinato por uma hora. (*** p< 0,001).

Figura 10 - Figura representativa do efeito do H89 inibindo os efeitos do succinato no transiente de Ca^{2+}

Estes resultados indicam que a PKA está envolvida no aumento da amplitude e na diminuição do tempo de decaimento do transiente de Ca^{2+} em células tratadas com succinato. Como a ativação de proteína G_S e a conseqüente produção de PKA pelo succinato são eventos contraditórios [3;5] e podem depender do tipo celular em estudo, utilizamos a técnica de FRET com um sensor baseado em AKAR3 [25] para confirmar se o succinato ativa PKA em células cardíacas. Para este experimento utilizamos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos, uma vez que cardiomiócitos provenientes de ratos adultos diferenciam quando mantidos em cultura. Primeiramente, detectamos a expressão e localização do receptor GPR91 nos cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos (figuras 11A-B).

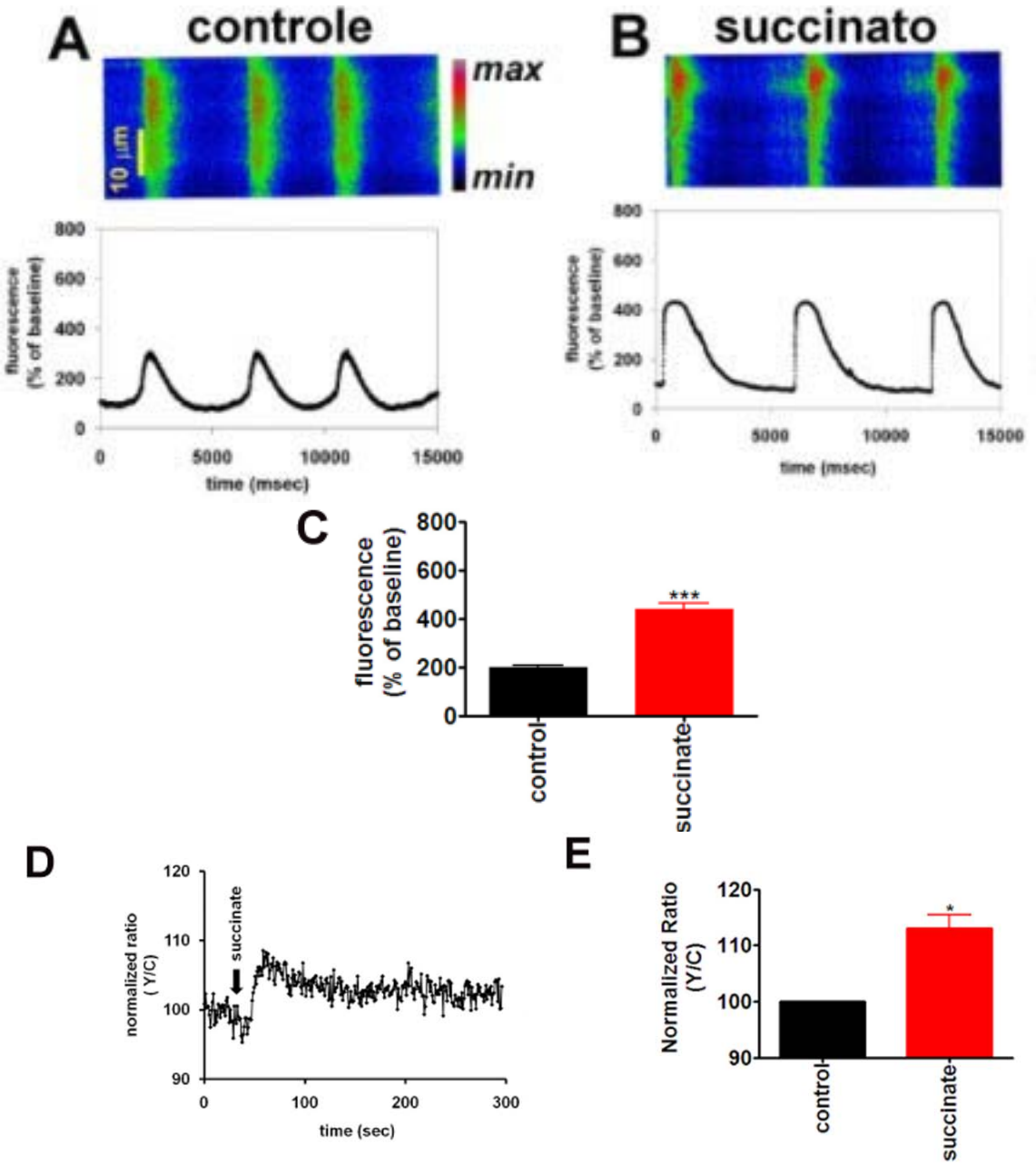
Posteriomente, avaliamos os efeitos do succinato no transiente de Ca^{2+} destas células. Corroborando com os resultados obtidos em cardiomiócitos provenientes de ratos adultos observou-se um aumento de 220% na amplitude do transiente de Ca^{2+} em células tratadas com succinato durante 30 minutos, quando comparado ao controle (UA = 197,9 ± 9,8% em 60 células controle vs 436,5 ± 24% em 60 células tratadas com succinato, $p < 0,001$) (figuras 12A-C). Descobrimos que o succinato ativa PKA nas células que expressavam AKAR e que foram estimuladas com 10 mM de succinato, o que foi revelado pelo aumento da fluorescência (UA = 100 em três células controle vs 113,06 ± 2,4% em três células tratadas com succinato, $p < 0,05$)

(figuras 12D-E). Em conjunto, estes dados mostram que a PKA é um mediador da sinalização induzida pelo succinato em cardiomiócitos.



LEGENDA: (A) RNA total foi isolado de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos usando reagente Trizol. Amostras de RNA foram transcritas em cDNA. Duas reações controle foram feitas. Uma contendo RNA, sem adicionar transcriptase reversa (RNA control) e em outra sem adicionar RNA (DNA control). Uma banda de 470 pb, correspondente ao tamanho esperado do GPR91, foi observada em cardiomiócitos neonatais. (B) Imagem de imunofluorescência obtida através do microscópio confocal utilizando anticorpo anti-GPR91 demonstra localização do receptor GPR91 na membrana plasmática de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatais (painel á esquerda). Imagem transmitida (painel do meio) e imagem sobreposta (painel á direita). Escala de barra = 10 µm.

Figura 11 - Imagem representativa de imunofluorescência e PCR em cardiomiócitos neonatos



LEGENDA: (A-B). Transiente global de Ca^{2+} em cardiomiócitos As células foram avaliadas após 30 min de tratamento com succinato e comparadas ao controle. Ca_i^{2+} foi marcado com Fluo-4/AM e as imagens foram capturadas utilizando miscroscopia confocal. As imagens foram pseudocoloridas de acordo com a escala de cor da figura A. O Gráfico abaixo de cada painel representa a porcentagem de aumento da fluorescência relativo a fluorescência basal. Succinato aumenta a amplitude do transiente de Ca^{2+}. (C) O gráfico de barras sumariza os efeitos do succinato na amplitude do transiente de Ca^{2+} (n = 60, ***$p < 0.001$). (D) O gráfico demonstra o aumento da fluorescência na presença de succinato. (E) Resposta representativa de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos que expressam AKAR-3. (*$p < 0.05$, n = 3).

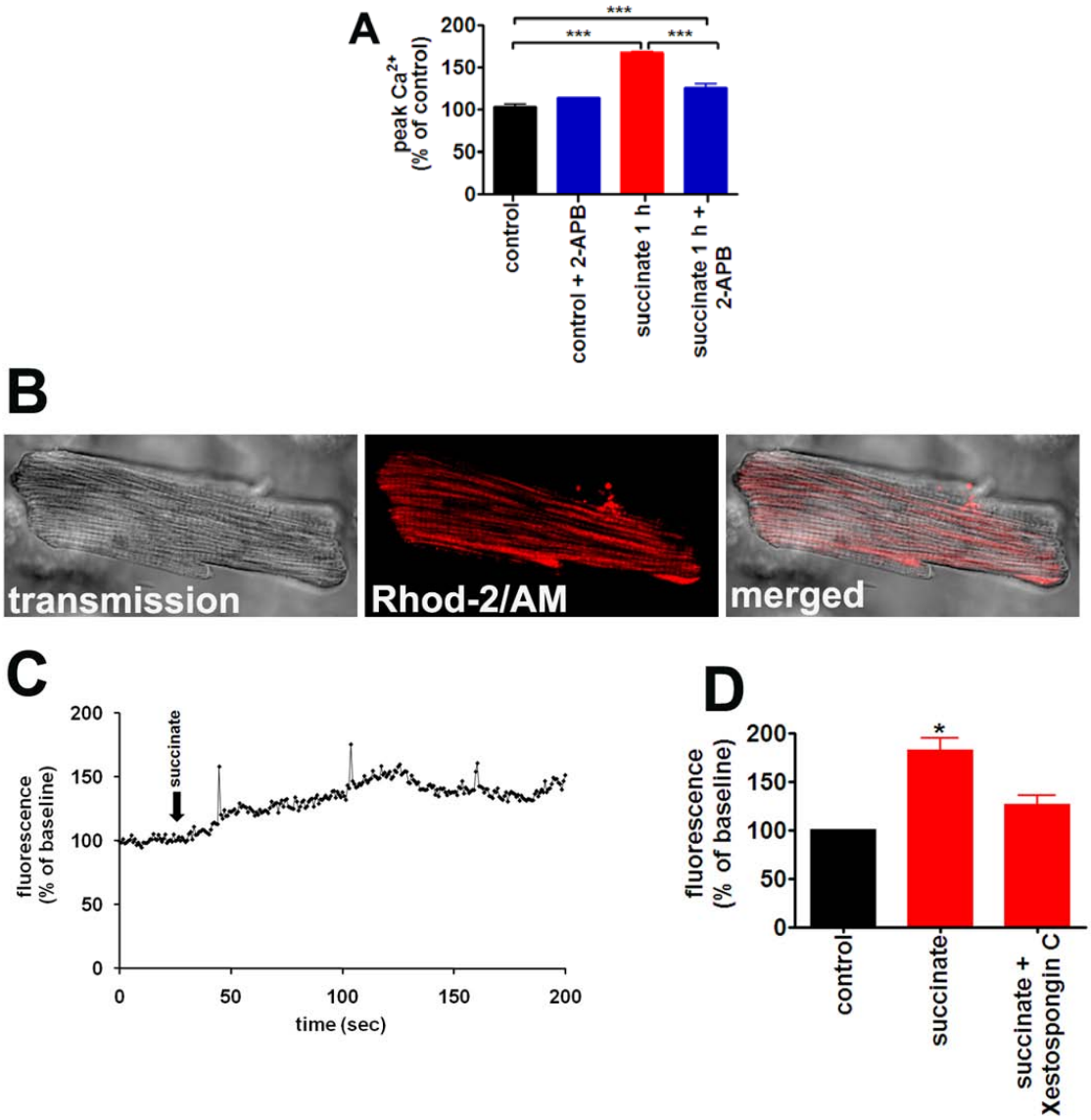
Figura 12 - Representação gráfica do experimento de FRET em cardiomiócitos neonatos

Os receptores acoplados à proteína G podem ativar diferentes proteínas G [29;30]. Por exemplo, a ativação do GPR91 pelo succinato em células HEK-293, atua por dois caminhos sinalizadores: um G_i/G_o que inibe a via de ativação de AMPc e o outro

via proteína G_q, o qual induz acúmulo de $InsP_3$, com ativação de $InsP_3R$, ocasionando aumento de Ca_i^{2+}. Como já demonstramos que o H89 abole completamente o aumento da amplitude do transiente de Ca^{2+} e, sabendo que a PKA pode fosforilar $InsP_3R$ e regular a sua função [31], investigamos se as mudanças observadas na sinalização Ca^{2+} induzida por succinato em cardiomiócitos foram também mediados por $InsP_3$. Para isso, cardiomiócitos foram incubados com um antagonista de $InsP_3R$ (2-APB) e observamos que 2-APB diminuiu o efeito da succinato na amplitude do transiente de Ca^{2+} (UA = 180 ± 0,44% em 40 células tratadas com succinato uma hora vs 122 ± 0,39% em 40 células tratadas com succinato por uma hora + 2- APB, $p < 0,001$) (figura 13A).

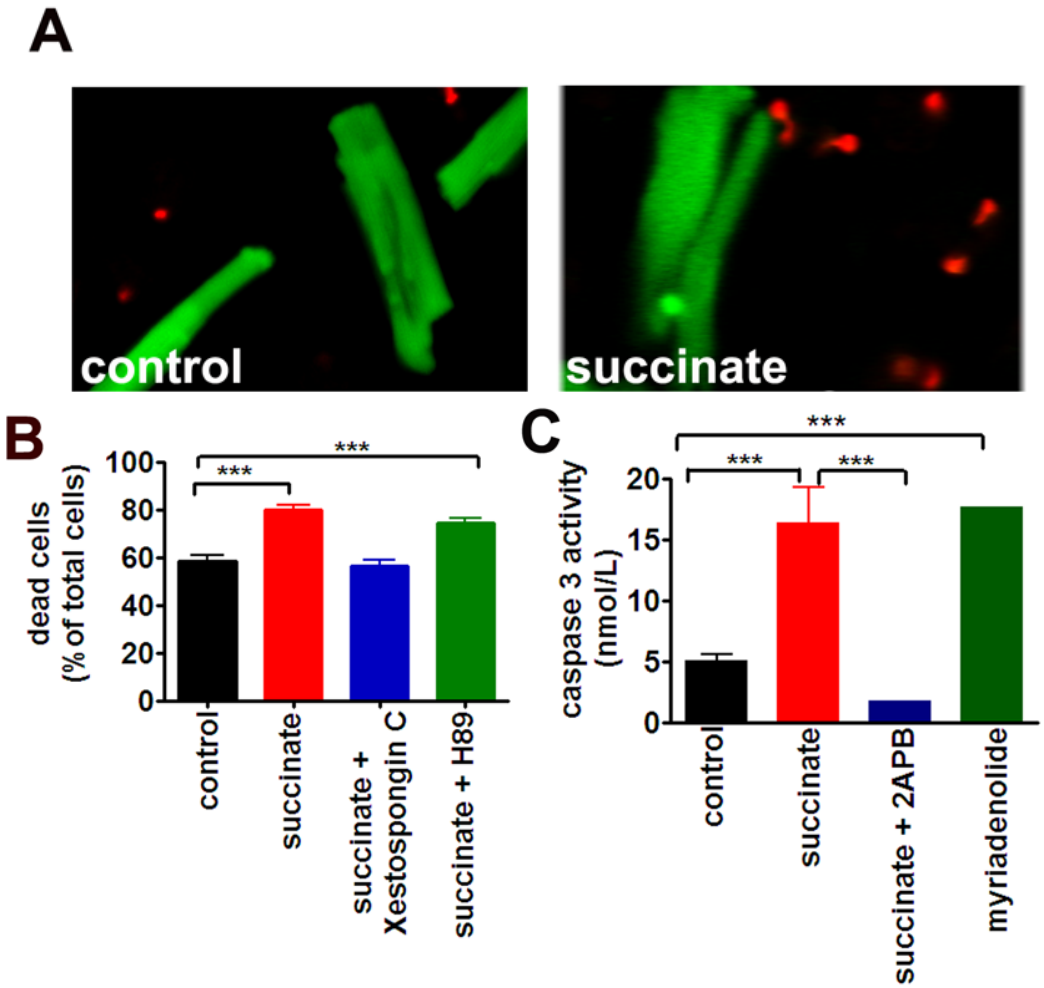
Sabe-se que o Ca^{2+} liberado a partir de $InsP_3Rs$ desempenha um papel especial na indução de apoptose, preferencialmente por transmissão de sinais de Ca^{2+} para mitocôndria [32]. Portanto, constatamos que o succinato altera os níveis de Ca^{2+} mitocondrial em cardiomiócitos. Demonstramos, ainda, que o succinato induz a um aumento significativo do Ca^{2+} mitocondrial (UA = 100 em 43 células controle vs 182,9 ± 11,64% em 43 células tratadas com succinato por uma hora vs 126,9 ± 8,9% em 43 succinato por uma hora, $p < 0,001$) (figuras 13B-D). Para confirmar se o aumento de Ca^{2+} mitocondrial acarretaria a diminuição da viabilidade celular realizamos um ensaio de citotoxicidade/viabilidade celular e observamos que a exposição ao succinato está associada ao aumento da porcentagem de células mortas (aproximadamente 20%) quando comparados aos controles (figuras 14A-B). Além disso, Xestospongin-C diminuiu a porcentagem de células mortas após tratamento com o succinato e este efeito não foi revertido por H89.

Para investigar melhor o mecanismo da morte celular induzida por succinato em cardiomiócitos, avaliamos a atividade da caspase-3 e demonstramos que o succinato aumenta a atividade da caspase-3 em cardiomiócitos (5,087 ± 0,44 nmol/ L no controle vs 16,34 ± 2,9 nmol/ L em succinato uma hora, vs 1,7 nmol/ L em succinato uma hora + 2-APB vs 17,64 nmol/ L em células tratadas com myriadenolide, $p < 0,001$) (figura 14C) em relação ao controle. O myriadenolide, um diterpeno recentemente isolado do extrato de Alomia myriadenia, foi utilizado como controle positivo [20]. Observamos que o tratamento com 2-APB reverteu a atividade da caspase-3 induzida pelo succinato. Em conjunto, estes resultados mostram que o succinato promove apoptose em cardiomiócitos adultos através do $InsP_3R$, provavelmente enviando sinais de Ca^{2+} para a mitocôndria e ativando a caspase-3.



LEGENDA: (A) Transiente global de Ca^{2+} em cardiomiócitos provenientes de ratos adultos. Células foram pré-tratadas com um antagonista do $InsP_3R$ (2-APB, 10 µM), durante 30 min e incubadas por 1 hora com succinato (10 mM). Gráfico de barra demonstra a média do pico do transiente de Ca^{2+} plotado como porcentagem (%) do aumento da fluorescência basal, comparadas com o controle. 2-APB diminui a amplitude do pico do transiente de Ca^{2+}. (*** $p < 0.001$). (B) Imagens de microscopia confocal de cardiomiócitos provenientes de ratos adultos marcados com Rhod-2/AM. (C) Gráfico representativo da sinalização de Ca^{2+} mitocondrial antes e após estimulação com succinato (10 mM). (D) Gráfico de barras sumariza o aumento do Ca^{2+} mitocondrial antes e após estimulo com succinato. Células que foram incubadas com Xestospongin C e estimuladas com succinato apresentaram uma diminuição na amplitude do pico do transiente de Ca^{2+} mitocondrial (u.a = 100 em 43 células controle vs 182.9 ± 11.64% em 43 células tratadas com succinato por uma hora vs 126.9 ± 8.9% em 43 células tratadas com succinato por uma hora e incubadas com Xestospongin C succinato por 1 hora. (*** $p < 0.001$).

Figura 13 - Figura e gráficos representativos do transiente de Ca^{2+} e do Ca^{2+} mitocondrial em cardiomiócitos.

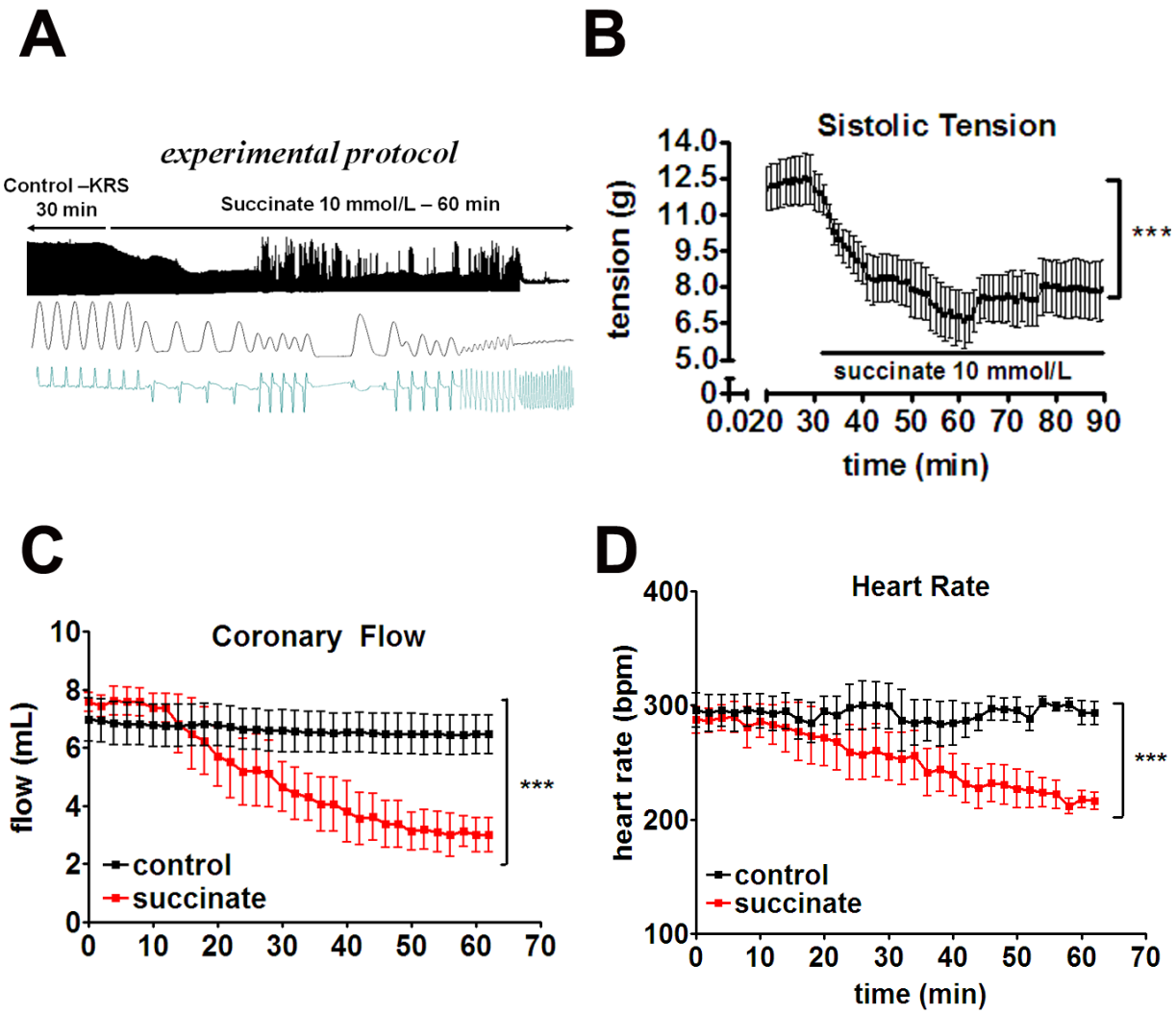


LEGENDA: (A) Imagens representativas de microscopia confocal demonstrando cardiomiócitos marcados com calceína/AM (fluorescência verde em células vivas) e homodímero de etídeo (fluorescência vermelha em células mortas). Células foram tratadas por 1 hora com succinato (10 mM) e comparadas a células controle. (B) Gráfico de barras sumariza a porcentagem de células mortas. Succinato aumenta a porcentagem de células mortas. Células foram incubadas por 1 hora com 10 mM de succinato, succinato com H89 ou succinato com Xestospongin-C. O tratamento com Xestospongin-C reduz a porcentagem de células mortas. (C) Succinato induz apoptose em cardiomiócitos. A atividade da caspase-3 foi mesurada em cardiomiócitos controle e tratados com succinato. O gráfico de barras demonstra que a atividade da caspase 3 aumenta em células tratadas com succinato e este efeito é revertido pela inibição do $InsP_3R$ (*** $p < 0.001$).

Figura 14 - Figura e gráficos representativos do experimento da caspase-3 e de viabilidade celular.

Para compreender o significado destas descobertas em um órgão intacto, utilizamos preparação de coração isolado de acordo com o método de Langendorff. As variáveis atividade elétrica, tensão sistólica, tensão diastólica, fluxo coronariano e frequência cardíaca foram medidas a cada dois minutos. Os corações foram extraídos de ratos adultos e acoplados a um sistema de perfusão e banhados por uma hora com solução Krebs-Ringer (controle) ou solução de Krebs-Ringer contendo 10 mM de succinato, pH 7,4. Observamos que a perfusão com 10 mM de succinato diminui a tensão sistólica em 25 ± 5% ($n = 5$, $p < 0,001$); não altera a

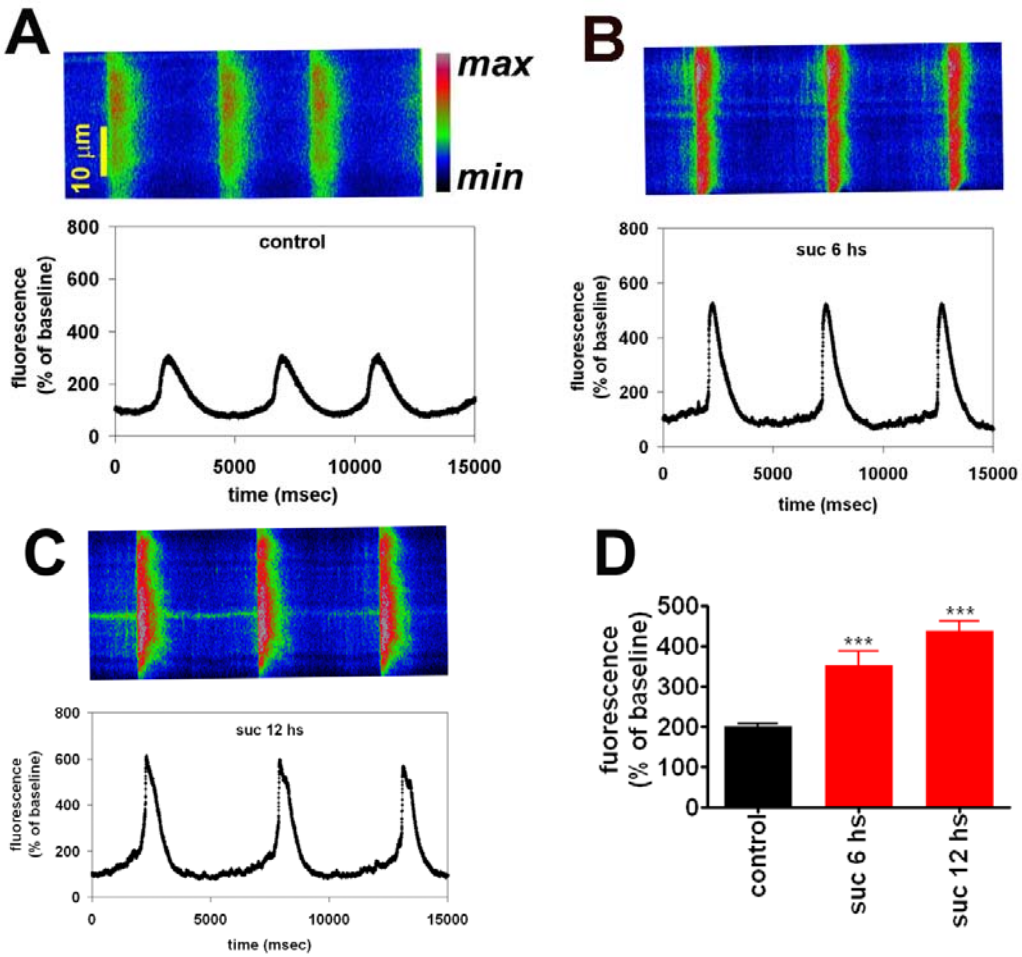
tensão diastólica; diminui o fluxo coronariano em 24 ± 0,03 (n = 5, p < 0,001) e diminui a frequência cardíaca em 23 ± 0,51 (n = 5, p < 0,001), (figuras 15A-D) e induz arritmias levando a insuficiência cardíaca. Estes dados demonstram as vias de sinalização induzidas pelo succinato em cardiomiócitos isolados, e que no órgão a perfusão com succinato resulta na falência do órgão.



LEGENDA: (A) Delineamento experimental em coração isolado.O traço superior mostra a tensão sistólica durante o experimento (30 min de perfusão com Krebs seguida pela perfusão com succinato. O painel do meio mostra a tensão sistólica em uma escala de tempo expandida e a redução da mesma durante a perfusão com succinato (10 mM). O traçado inferior demonstra a atividade elétrica do coração nas mesmas condições experimentais.O tratamento com succinato diminui a tensão sistólica em corações de ratos em 25 ± 5% (n = 5, p < 0,001) e não altera a tensão diastólica. (B) Gráfico demonstrando o efeito do succinato no fluxo coronariano. O tratamento com succinato por 60 min diminui o fluxo coronariano em 24 ± 0,03 (n = 5, p < 0,001). (C) Gráfico demonstrando o efeito do succinato na freqüência cardíaca. O tratamento com 10 mM de succinato diminui a frequência cardíaca em 23 ± 0,51 (n = 5, p < 0,001).

Figura 15 - Protocolo experimental e gráficos dos experimentos em coração isolado.

Para estudar o efeito prolongado do succinato, que poderia ocorrer durante uma isquemia prolongada, por exemplo, durante o transporte de um órgão para transplante, utilizamos o modelo de cultura primária de cardiomiócitos provenientes de animais neonatos. Como demonstramos anteriormente os cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos também expressam GPR91. Para estudar a exposição prolongada ao succinato utilizamos dois tempos: seis horas porque é o tempo de viabilidade de remoção do órgão para transplante [33] e 12 horas. As células foram tratadas com 10 mM de succinato em diferentes tempos: seis e 12 horas e incubados com fluo-4/AM (6 μM) por 30 minutos antes dos experimentos. Verificamos que o tratamento com succinato por 6 horas (figura 16B) também aumenta a amplitude do transiente de Ca^{2+} em 76%, comparada com células controle. Quando os cardiomiócitos foram tratados com succinato por 12 horas o transiente de Ca^{2+} aumentou em 120% comparados com o controle ($p < 0,001$) (figura 16C).

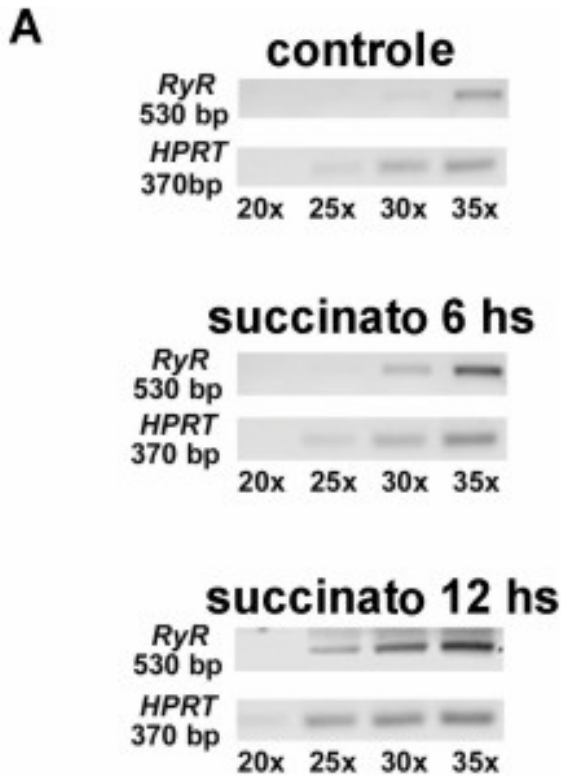


LEGENDA: (A) Imagem representativa do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos provenientes de animais neonatais sem tratamento com succinato (células controle). O gráfico abaixo do painel demonstra a porcentagem do aumento da fluorescência basal. (B) Imagem representativa do

transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos provenientes de animais neonatais tratados com succinato por 6 horas. O gráfico abaixo do painel demonstra a porcentagem do aumento da fluorescência comparada com a fluorescência basal. (C) Imagem representativa do transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos provenientes de animais neonatais tratados com 10 mM de succinato por 12 horas. O gráfico abaixo do painel demonstra a porcentagem do aumento da fluorescência comparada com a fluorescência basal. (D) O gráfico de barras demonstra a média do aumento do transiente de Ca^{2+}. O tratamento com succinato por seis e 12 horas aumenta significativamente o transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos provenientes de animais neonatais, quando comparados com o controle. *** $p < 0,001$. Escala de barra 10 µm.

Figura 16 - Representação gráfica do experimento de Ca^{2+} em cardiomiócitos neonatos.

Com o tratamento prolongado pode-se avaliar os níveis de expressão gênica do receptor de rianodina e se esta expressão é importante para a modulação do transiente de Ca^{2+}. Avaliamos se o succinato aumenta a expressão gênica do receptor de rianodina em cardiomiócitos. Para este estudo, cardiomiócitos foram incubados com 10 mM de succinato pelos tempos indicados nas figuras, e a expressão gênica do RyR foi avaliada por RT-PCR. Foram utilizados iniciadores degenerados para RyR: (*foward* 5'-CAY YTN YTN GAY ATH GC5 ATG GG-3' e o *reverse* 5'-ADR TAR TTN GC5 ARR TTR TGY TC-3') e como controle interno foram utilizados iniciadores específicos para HPRT (*forward* 5`-CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT-3` e *reverse* 5`-GTC AAG GCA TAT CCA ACA ACA AA-3`). Nossos resultados mostram que o tratamento com succinato aumenta a expressão do RNA mensageiro do receptor de rianodina em cardiomiócitos (figura 17A).

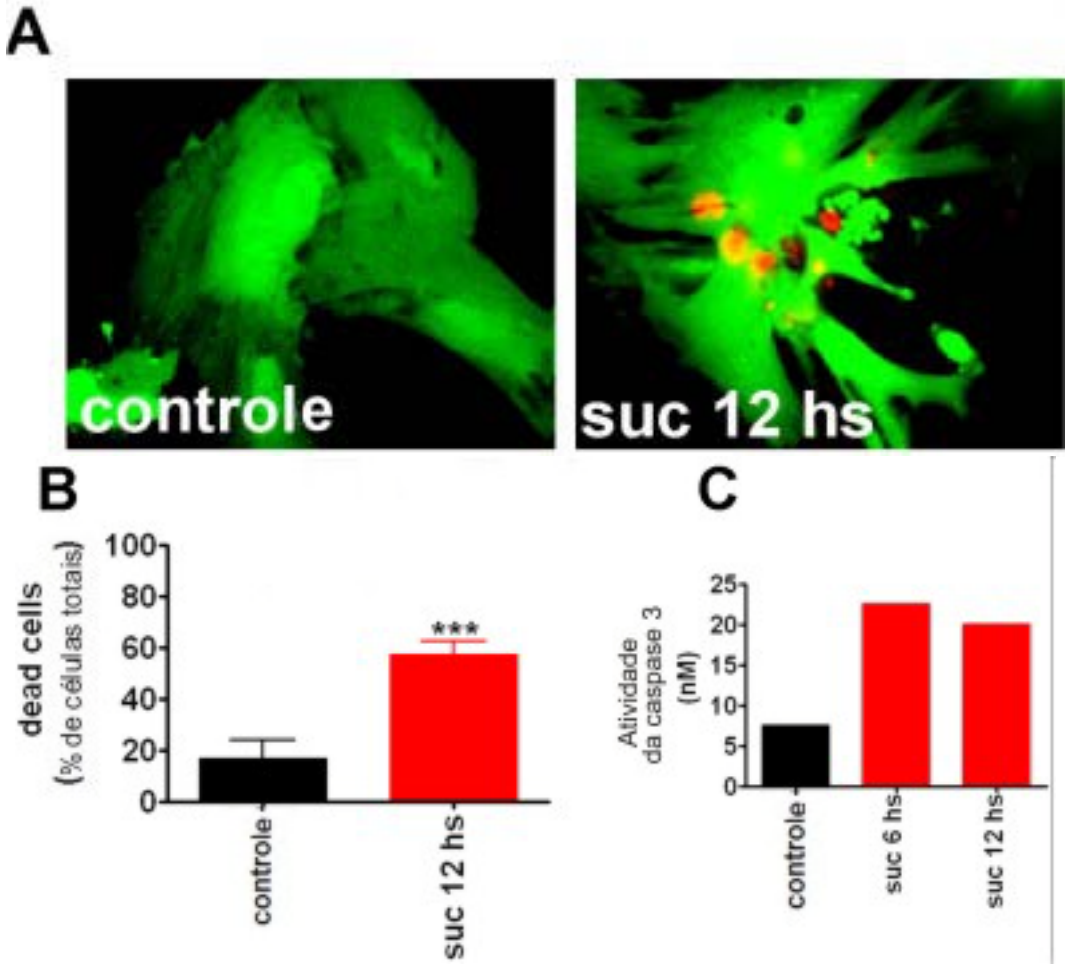


LEGENDA: O tratamento com succinato aumenta a expressão gênica do receptor de rianodina em cardiomiócitos (A) Cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos foram tratados com 10 mM de succinato por seis horas e 12 horas. O tratamento com succinato aumentou a expressão gênica do receptor de rianodina.

Figura 17 - Imagem representativa do RT-PCR em cardiomiócitos neonatos

O Ca_i^{2+} não apenas participa da contração muscular como também de outros processos como diferenciação, secreção, expressão gênica, apoptose e proliferação celular [15]. Após um processo isquêmico no coração ocorre apoptose de várias células cardíacas e hipertrofia dos cardiomiócitos restantes na tentativa de restaurar a função cardíaca. Já é sabido que a apoptose, morte celular programada, ocorre em uma variedade de patologias e corresponde a um processo fundamental para a deteriorização da função cardíaca. Assim, estudamos se o aumento de Ca_i^{2+} induzido pelo succinato em cardiomiócitos, também induz apoptose. Investigamos se 10 mM de succinato possui efeito citotóxico em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos. Após o tratamento com succinato as células foram marcadas com dois corantes: calceína/AM verde (marca as células vivas) e etídeo homodímero, que marca o núcleo de células mortas (vermelho), e as imagens foram coletadas por microscopia confocal. Os cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos foram tratados por 12 horas e comparados às células controle. Observamos que o tratamento crônico com succinato causa aumento de 239% ($n = 7$, $p < 0,001$) na

quantidade de células mortas, em cardiomiócitos neonatais, quando comparado ao controle, bem como a atividade da caspase-3 em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos (n = 1) (figuras 18 A-C)

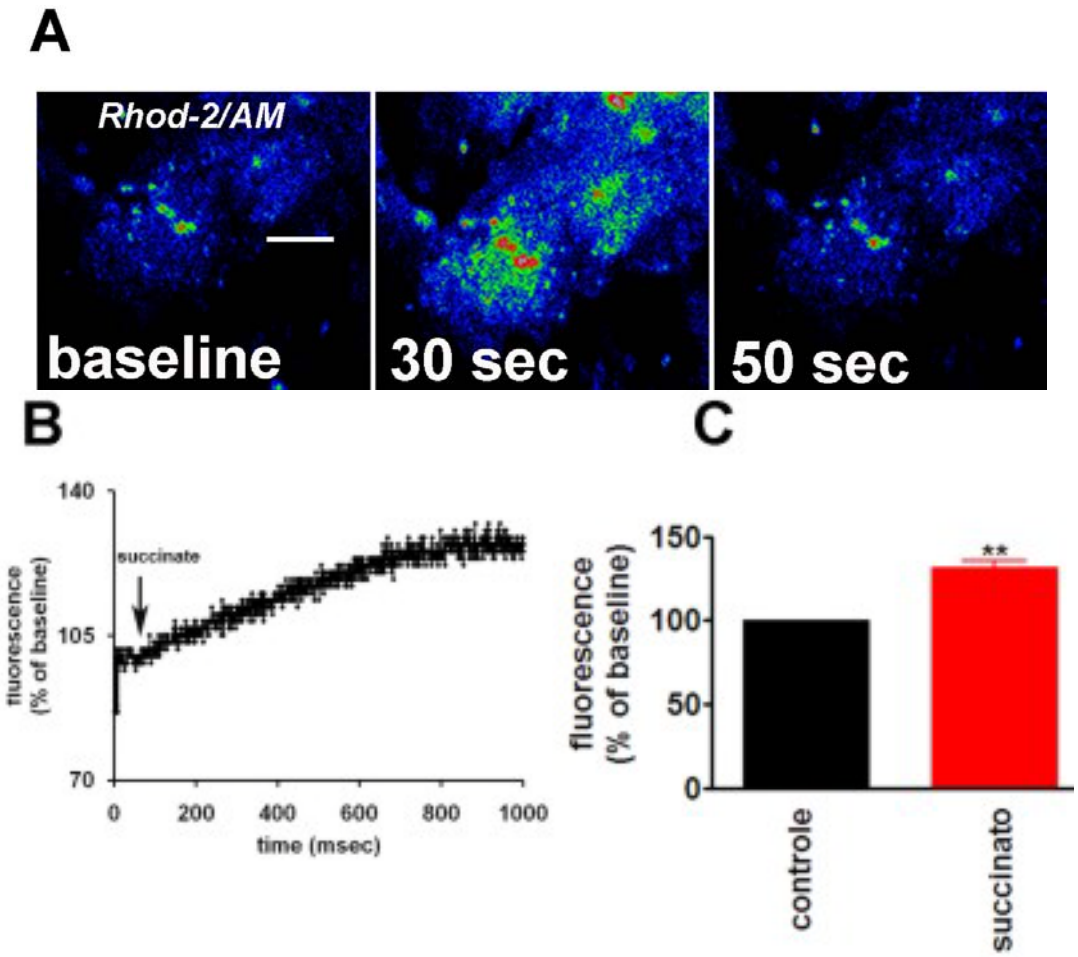


LEGENDA: (A) Imagem de microscopia confocal demonstrando cardiomiócitos neonatais marcados com dois corantes: calceína/AM verde (marca as células vivas) e etídeo homodímero que marca o núcleo de células mortas de vermelho. As células foram tratadas por uma hora com 10 mM de succinato e comparadas á células controle (não tratadas). Escala de barra = 10 µm. (B) Gráfico de barra demonstra que o tratamento com succinato aumenta significativamente a porcentagem de células mortas em 50 ± 12% (n = 10, $p < 0,001$, quando comparado ao controle). (C) Gráfico de barra demonstra que o tratamento com succinato por seis e 12 horas aumenta a atividade da caspase-3. (n= 1 experimento).

Figura 18 - Figura e gráficos representativos do experimento de viabilidade celular em cardiomiócitos neonatos.

Conforme já descrito, a apoptose ocorre devido ao aumento de Ca^{2+} mitocondrial e a formação de poros na membrana da mitocôndria. Esta situação acarreta a liberação de citocromo c para o citosol. Quando o citocromo c está no citosol ele desencadeia a cascata de sinalização das caspases [34]. Para investigar o mecanismo da morte induzida pelo succinato em cardiomiócitos, estudamos se o

succinato aumenta os níveis de Ca^{2+} mitocondrial e quais as consequência para os cardiomiócitos. Utilizando uma sonda fluorescente marcadora de cálcio mitocondrial (Rhod-2/AM), foi possível observar que o tratamento com succinato aumenta a concentração de Ca^{2+} mitocondrial em 100 ± 20% ($n = 20$, $p < 0,05$), quando comparado ao controle (figura 19A-C).



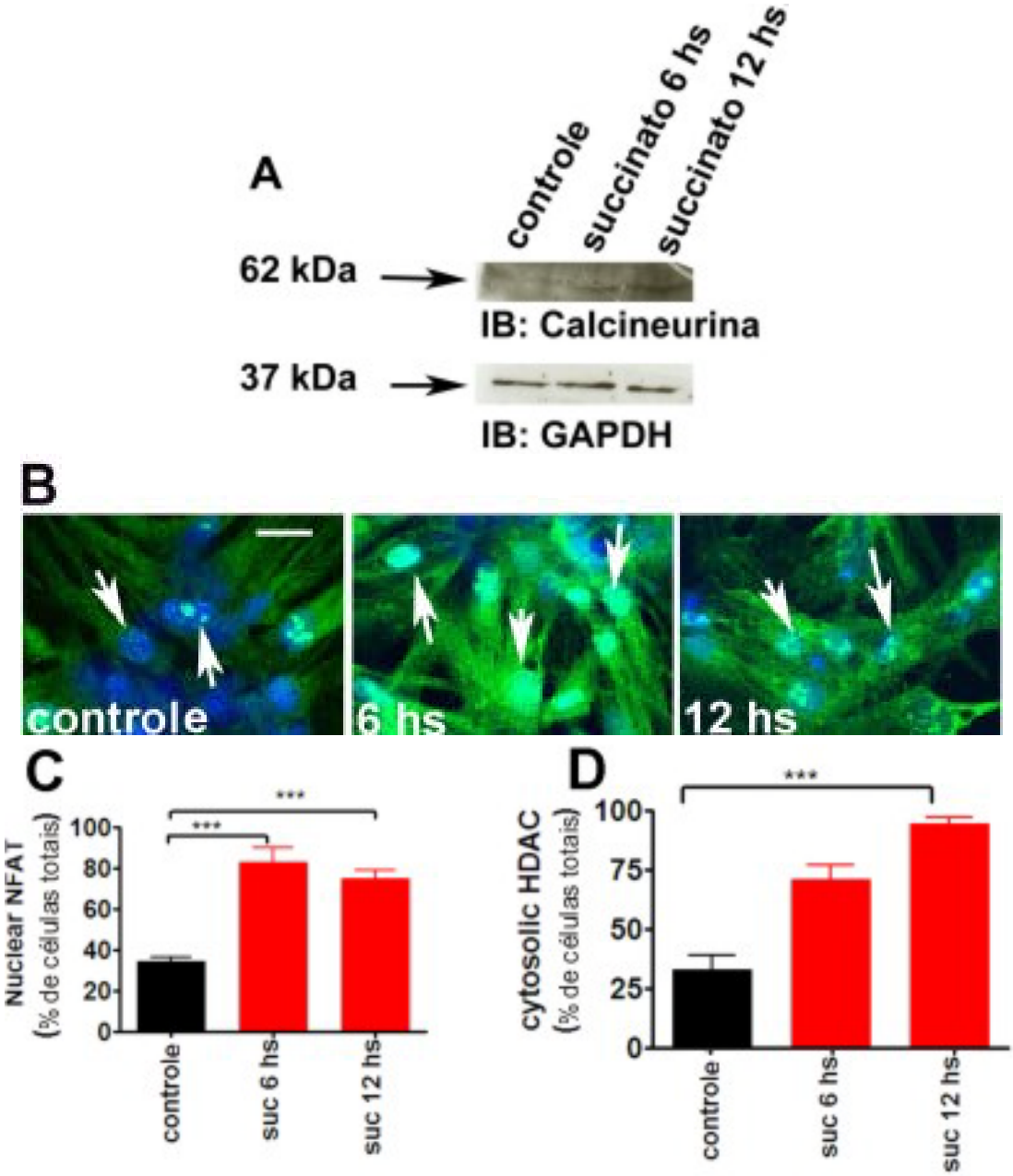
LEGENDA: (A) Imagens representativas de microscopia confocal de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatais marcados com Rhod/2AM antes e após a estimulação com 10 mM de succinato. (B) Gráfico representativo da sinalização de Ca^{2+} mitocondrial antes e após estimulação com succinato (10 mM). (C) Gráfico de barras sumariza o aumento do Ca^{2+} mitocondrial antes e após estímulo com succinato. Escala de barra: 10 µM.

Figura 19 - Figura e gráficos representativos do experimento de viabilidade celular em cardiomiócitos neonatos.

Uma das consequências do processo isquêmico é a hipertrofia cardíaca que pode ocorrer através da ativação da via calcineurina/NFAT (fator nuclear de células T ativadas). É sabido que o aumento de Ca^{2+} intracelular ativa a calcineurina que, por sua vez, causa a translocação de NFAT para o núcleo. Uma vez no núcleo este fator de transcrição ativa vários genes envolvidos em processos hipertróficos [35;36]. Por

isto, investigamos se o succinato além de induzir apoptose poderia induzir a hipertrofia. Nossos resultados demonstram que o tratamento com 10 mM de succinato por seis ou 12 horas induz aumento da expressão de calcineurina (figura 20A), e a translocação de NFAT para o núcleo celular em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos em 123 ± 26% (n= 70, $p < 0,001$) e 97 ± 20% (n = 70, $p < 0,001$), respectivamente (figura 20B).

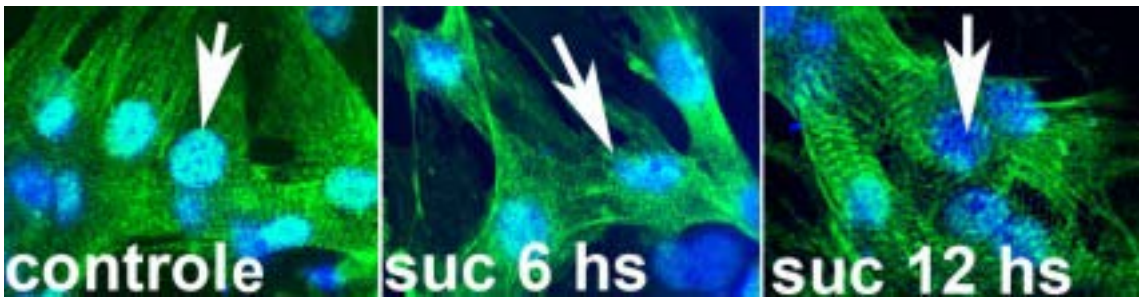
Para confirmar estes dados, outra via hipertrófica dependente de Ca^{2+} foi estudada. Um aumento de Ca^{2+} induz ativação da Ca^{2+}- calmodulina cinase II que fosforila uma histona deacetilase (HDAC), uma vez fosforilada esta histona transloca para o citosol liberando e ativando o fator de crescimento dos miócitos (MEF) permitindo assim a hipertrofia. Observamos que o tratamento com succinato por seis e 12 horas translocou o HDAC do núcleo para citosol (figura 20C).



LEGENDA: (A) Western blot das proteínas totais de cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos demonstra que o tratamento com 10 mM de succinato por seis e 12 horas, aumenta a expressão da calcineurina, quando comparadas ao controle. n= 1. (B) Imagem representativa de microscopia confocal demonstrando por imunofluorescência que o tratamento com succinato induz translocação do NFAT para o núcleo. (C) Gráfico de barra demonstra a porcentagem do número de células onde houve translocação do NFAT para o núcleo, quando comparado com o as células controle (não tratadas). O tratamento com succinato por 6 horas ou 12 horas transloca o NFAT em 123 ± 26% ($n = 70$, $p < 0,001$) e 97 ± 20% ($n = 70$, $p < 0,001$), respectivamente. (D) Gráfico de barra demonstra a porcentagem do número de células onde houve translocação do HDAC para o citosol, quando comparado com as células controle (não tratadas). O tratamento com succinato por 6 horas ou 12 horas transloca o HDAC em 116 ± 5,8% ($n = 22$, $p < 0,001$) e 188 ± 2.6% ($n = 20$, $p < 0,001$), respectivamente.

Figura 20 - Imagem e gráfico representativos de Western Blot e de imunofluorescência em cardiomiócitos neonatos.

Recentemente foi descoberto que a proteína cinase B fosforilada (AKT-P), envolvida na via de sobrevivência das células, quando localizada preferencialmente no núcleo celular, inibe a apoptose sem remodelamento hipertrófico [37]. Deste modo, resolvemos estudar se do tratamento com 10 mM de succinato poderia alterar a localização de AKT-P e assim, além de induzir apoptose o succinato diminuiria a sobrevivência dos cardiomiócitos. Para realizar estes experimentos utilizamos a técnica de imunofluorescência e observamos que o tratamento com 10 mM de succinato por seis ou 12 horas transloca o AKT-P do núcleo para citosol diminuindo o efeito protetor da AKT-P (Figura 21A).



LEGENDA: Cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos foram tratados com 10 mM de succinato por 6 ou 12 horas incubados com anticorpo especifico para AKT- P e o núcleo foi marcado com DAPI. Imunofluorescência demonstra que em o tratamento com succinato transloca o AKT-P do núcleo para o citosol. Escala de barra de 10 µM. As setas indicam a marcação do núcleo com DAPI e AKT-fosforilada.

Figura 21 - Imagem e gráfico representativos de Western Blot e de imunofluorescência em cardiomiócitos neonatos.

Em conjunto, estes dados demonstram que cardiomiócitos expressam o receptor GPR91. E que o succinato via ativação do GPR91 aumenta o Ca_i^{2+} ativando pelo menos duas vias de sinalização, uma dependente de PKA e outra dependente de $InsP_3$. Este aumento do transiente de Ca_i^{2+} induz apoptose em condições que podem ocorrer, por exemplo, durante a isquemia devido a interrupção do fluxo coronariano (exposição ao succinato por 30 minutos ou uma hora) e além destes efeitos citados, observamos hipertrofia quando os cardiomiócitos foram expostos ao succinato por seis ou 12 horas, condição que pode ocorrer durante transporte do órgão para transplante.

5 DISCUSSÃO

O ciclo do ácido cítrico foi descoberto em 1973, quando biologistas procuravam entender o metabolismo aeróbio e como o piruvato, produzido na glicólise, era oxidado a acetil coenzima A (acetil CoA). Este ciclo é um dos principais reguladores da homeostasia e do metabolismo celular e produz CO_2 e elétrons de alta energia na forma de NADH e $FADH_2$.

Para que ocorra a oxidação do piruvato são necessários intermediários que permitam que a energia desta oxidação seja utilizada para produzir as moléculas energéticas. Um dos intermediários deste ciclo é o succinato que está presente em concentrações micromolares no sangue e seus níveis são regulados pela respiração, metabolismo, excreção e reabsorção renal.

Recentemente foi identificado um receptor para o succinato que foi denominado GPR91 [3]. Através da análise de Q-RT-PCR foi observada a expressão do GPR91 em vários tecidos de ratos como o fígado, pulmão, rim e baço, sendo que a expressão no rim é a mais abundante [3]. Até o momento não havia sido descrita a expressão do receptor GPR91 no coração. No entanto, análises de bioinformática com o software SAGE (http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/AnatomicViewer) revelaram que este receptor é expresso em vários tecidos. Dentre eles, o coração expressa GPR91, mesmo que em baixos níveis. Por este motivo investigamos neste trabalho a presença deste receptor no coração e, posteriormente, determinamos o papel do succinato neste órgão. Experimentos de RT-PCR em cardiomiócitos provenientes de ratos adultos demonstraram que o coração expressa o receptor GPR91, e através de imunofluorescência observamos que este receptor está localizado na membrana sarcoplasmática, conforme esperado para um receptor da família da proteína G.

No soro de humanos saudáveis, a concentração de succcinato é geralmente em torno de 5 µmol/ L [38]. No entanto, concentrações sanguíneas em milimolar foram detectadas em amostras clínicas de pacientes com peritonite, no sangue de roedores com hipertensão arterial e doenças metabólicas (diabetes tipo 2), bem como no fígado de ratos sob isquemia hepática [4;8;9].

Os níveis de succinato extracelular parecem ser particularmente importantes na definição de várias condições patológicas. Por exemplo, foi demonstrado que um paciente com deficiência da succinato desidrogenase, uma condição que leva ao acúmulo de succinato, apresentou insuficiência cardíaca congestiva [39]. A falência de

múltiplos órgãos foi relatada em um paciente que havia submetido ao transplante de fígado e intestino, pois foi constatado que a doadora apresentava deficiência na succinato citocromo C redutase, outra condição que aumenta os níveis sanguíneos de succinato [33].

Corroborando com esta descoberta, uma ligação direta entre o succinato e GPR91 na regulação da resposta imune foi recentemente demonstrada [6]. O succinato alerta o sistema imunológico inato sobre o perigo, induzindo a quimiotaxia de células dendríticas e a liberação de citocinas pro-inflamatórias. Além disso, camundongos deficientes de GPR91 apresentaram acentuada rejeição quando comparados aos camundongos do tipo selvagem, enfatizando a relevância do GPR91 na ativação da imunidade.

No sistema cardiovascular, foi demonstrado que a administração intravenosa de succinato em ratos provoca elevação da renina causando aumento da pressão arterial [3]. Ademais, em ratos espontaneamente hipertensos, foram encontrados níveis de succinato mais elevados do que em animais normotensos [8].

Por outro lado, efeitos benéficos do succinato também foram relatados. Neste aspecto, observou-se que o succinato se acumula na retina hipóxica de roedores sendo um potente mediador no crescimento e desenvolvimento da vascularização normal da retina e na retinopatia isquêmica proliferativa [7]. Estas discrepâncias entre os efeitos do succinato poderiam estar relacionadas a maior ou menor afinidade deste ao seu receptor e, desta forma, diferentes concentrações de succinato mediariam funções celulares distintas [40;41].

A sinalização desencadeada pela ligação do succinato ao GPR91 só recentemente tem sido investigada. Em diferentes tipos de células, o succinato ligado ao GPR91 acarreta a ativação e mobilização de Ca_i^{2+} [3;4;6]. Com este estudo foi possível descobrir que em cardiomiócitos o succinato aumenta o transiente global de Ca^{2+}, um efeito mediado pelo menos em parte, pela ativação da PKA. Isto contrasta com a descoberta de que no fígado o succinato não causa aumento do Ca_i^{2+} [5], e que, em células HEK-293 o succinato inibe em vez de estimular a sinalização via cAMP [3]. Os receptores acoplados a proteína G podem se ligar a diferentes proteínas G [29;30] levando a distinta sinalização entre diferentes células.

Em cardiomiócitos tratados com succinato, a ativação da PKA aumenta os níveis de fosforilação da PLN e RyR, indicando um possível mecanismo pelo qual o succinato altera o transiente de Ca^{2+} neste tipo de célula. Já foi constatado que a

fosforilação de PLN pela PKA na Ser [16] aumenta a velocidade de recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático e a amplitude do transiente de Ca^{2+} através da redução na inibição da SERCA [26-28]. Sabe-se, ainda, que a fosforilação do RyR pela PKA na Ser[2809] aumenta a probabilidade de abertura do canal, ocasionando a liberação de Ca^{2+} do RS [42-44].

Considerando que os nossos resultados evidenciam que a cascata de sinalização pela PKA medeia os efeitos do succinato sobre o transiente de Ca^{2+} em cardiomiócitos, duas linhas independentes de evidência apoiam a idéia de que outras cascatas sinalizadoras estão sendo ativadas pelo succinato. Em primeiro lugar, o tratamento com H89, um inibidor da PKA, não alterou o percentual de cardiomiócitos mortos após tratamento com o succinato. Em segundo lugar, a inibição da PKA não impediu a ativação da caspase-3. Em vez disso, a inibição do $InsP_3R$ em cardiomiócitos inibe o aumento de Ca^{2+} mitocondrial, a ativação da caspase-3 e a morte celular. Embora RyR seja o principal canal de liberação de Ca_i^{2+} encontrado no SR dos cardiomiócitos, já foi descrito a expressão dos $InsP_3R$ nestas células [45-47].

Investigamos se o aumento de Ca^{2+} em cardiomiócitos induzido pelo succinato poderia ocorrer devido à ativação de $InsP_3R$, uma vez que o tratamento de cardiomiócitos com inibidor de $InsP_3R$, foi capaz de reduzir parcialmente a liberação de Ca^{2+} induzida pelo succinato. Corroborando com estes achados a ativação de receptores de endotelina acoplado a proteína G_q produziu um aumento do transiente de Ca^{2+} através do $InsP_3R$ [48;49]. Embora, não verificamos a ativação direta da fosfolipase C em cardiomiócitos tratados com succinato, nossos resultados sugerem que o succinato induz a produção de $InsP_3$ pela ativação da sinalização via proteína G_q. Esta hipótese é confirmada por um achado anterior, que demonstra em células HEK 293, o succinato, via ativação do receptor GPR91, ativa a proteína G_q, acarretando o acúmulo de $InsP_3$ e o conseqüente aumento de Ca_i^{2+} [3].

Embora o $InsP_3$ seja importante para ativação de $InsP_3R$, já foi demonstrado que a fosforilação de $InsP_3R$ pela PKA aumenta a probabilidade de abertura do canal, aumentando a liberação de Ca_i^{2+} [31]. Neste contexto, a ativação da PKA pelo succinato teria um efeito sinérgico para reforçar a liberação de Ca^{2+} através dos RyRs e $InsP_3Rs$ em cardiomiócitos.

Além disso, concluimos que o sinal apoptótico evocado pelo succinato é emitido provavelmente por uma via-dependente de $InsP_3R$ através do envio de sinais

de Ca^{2+} para as mitocôndrias. Na verdade, é amplamente conhecido que a mitocôndria desempenha um papel fundamental na mediação da apoptose, bem como a transmissão de sinais de Ca^{2+} pelo $InsP_3R$ para a mitocôndria é descrito como um passo crítico neste processo [32;50-52] e todas as três isoformas de $InsP_3Rs$ são conhecidas por participar de processos apoptóticos [32;53]. Embora a co-localização de $InsP_3Rs$ e mitocôndrias em miócitos cardíacos não tenha sido ainda demonstrada, é amplamente aceito que os aumentos de Ca^{2+} mitocondrial podem diretamente induzir formação de poros na membrana mitocondrial [54]. Este, por sua vez, permite liberação de citocromo C das mitocôndrias, que está associada à progressão para a apoptose [53].

Nossos resultados levantam uma questão importante: o succinato em cardiomiócitos ativa duas vias de sinalização, a G_s-cAMP-PKA e o G_q-trifosfato de inositol, promovendo liberação de Ca^{2+} e a morte celular? Neste aspecto, a dupla ligação de receptores a G_s e G_q tem sido previamente demonstrada pelos receptores metabotrópicos [55;56]. Sabendo-se que a sinalização via Gs-AMPc-PKA fosforila proteínas que regulam a dinâmica de Ca^{2+}, aumentando assim o inotropismo celular, este duplo acoplamento pode servir para aumentar a contratilidade dos cardiomiócitos em uma situação de toxicidade celular.

Nos experimentos com órgão isolado, utilizando o método de Langendorff, observamos que succinato causa a redução da performance cardíaca, apesar do discrepante aumento no transiente de Ca^{2+} observado em cardiomiócitos isolados. Na preparação de Langendorff mantivemos a pressão constante e avaliamos o fluxo coronariano. As alterações no fluxo coronariano refletem as alterações no raio das artérias coronárias que determina a função mecânica do músculo liso, ou seja, a vasoconstrição ou a vasodilatação [57]. A diminuição do fluxo coronariano causada pelo succinato indica uma vasoconstrição coronariana, o que poderia ser responsável por falência do orgão. Mas para confirmar estes dados é necessário outros experimentos em músculo liso vascular para investigar o efeito do succinato neste tipo celular. No entanto, como dito anteriormente, observamos também uma queda na tensão sistólica. Uma hipótese seria de que o succinato estaria diminuindo a afinidade do Ca_i^{2+} com os miofilamentos contráteis alterando assim o acoplamento excitação-contração nas células miocárdicas [58]. Não estudamos se o succinato altera a afinidade do cálcio pelos miofilamentos contráteis.

A morte celular verificada após acúmulo de succinato nas células cardíacas foi outro ponto de investigação deste trabalho. Esta morte pode ser decorrente do estresse oxidativo das células. A injúria cardíaca secundária à isquemia e reperfusão consiste de danos inflamatórios, caracterizados em parte pelo acúmulo de radicais livres nos tecidos (estresse oxidativo). Existem vários mediadores químicos envolvidos na resposta à isquemia e reperfusão. Dentre destes mediadores temos a sinalização via proteína cinase B (AKT), que tem se tornado o alvo para tratar os danos causados pela isquemia. A AKT fosforila, inibindo ou ativando vários mediadores tanto do núcleo quanto no citosol da célula, como caspase 9 e BAD, que são fosforiladas no citoplasma, tendo sua ação inibida. Então, a ação primordial da AKT é regular a sobrevivência celular [59]. Recentemente foi demonstrado que quando a AKT está localizada preferencialmente no núcleo da célula ela inibe a apoptose em cardiomiócitos [37]. Nossos experimentos indicaram que em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos o tratamento com succinato é capaz de induzir a translocação da AKT do núcleo para o citosol, diminuindo desta forma a sobrevivência celular.

Uma maneira de compensar a morte induzida pela isquemia cardíaca, é a hipertrofia de células cardíacas adjacentes. Um dos mecanismos que induzem esta hipertrofia é a via calcineurina/NFAT. Este mecanismo resulta na translocação do NFAT do citosol para o núcleo da célula com conseqüente ativação da expressão de genes pro-hipertrofia [60]. Nós demonstramos que o tratamento com succinato em cardiomiócitos provenientes de ratos neonatos aumenta a porcentagem de células em que é observada translocação do NFAT para o núcleo, quando comparado ao controle. Isto indica que o succinato pode desencadear hipertrofia cardíaca. Para confirmar estes dados, outra via hipertrófica dependente de Ca^{2+} foi estudada. Um aumento de Ca^{2+} induz ativação da Ca^{2+}- calmodulina cinase II que fosforila uma histona deacetilase (HDAC), uma vez fosforilada esta histona transloca para o citosol liberando e ativando o fator de crescimento dos miócitos (MEF) permitindo assim a hipertrofia. Observamos que o tratamento com succinato por seis e 12 horas translocou o HDAC do núcleo para citosol [61]. Mas para confirmar esta hipótese ainda é necessário estudar outros possíveis mecanismos que estão envolvidos nesta hipertrofia induzida pelo succinato.

A partir das observações obtidas neste trabalho, podemos concluir que elevadas concentrações de succinato, gerados por exemplo, durante condições

isquêmicas, podem desencadear ativação do GPR91 em cardiomiócitos. Demonstramos também que esta sinalização celular modulada pelo succinato pode alterar a função cardíaca, acarretando a morte celular dos cardiomiócitos. Sabendo que a insuficiência cardíaca é uma das principais causas de mortalidade no mundo inteiro [62], estes resultados fornecem um novo alvo terapêutico que pode reverter a lesão cardíaca em resposta ao estresse.

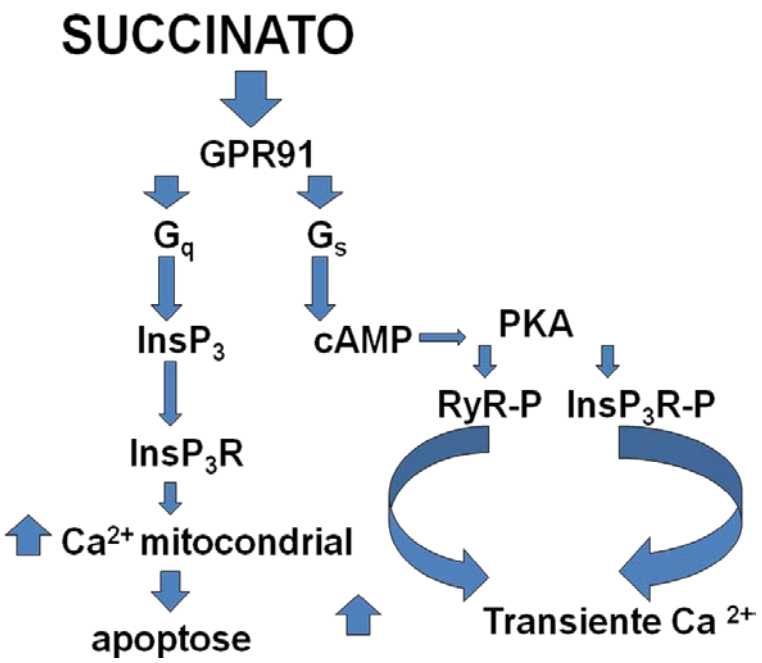


Figura 22 - Esquema demonstrando as vias de sinalização do succinato em cardiomiócitos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 Krebs HA. Rate control of the tricarboxylic acid cycle. Adv Enzyme Regul. 1970;8:335-353.

2 Lehninger AL. Princípios de Bioquímica. 4ª ed. São Paulo: Sarvier; 2006.

3 He W, Miao FJ, Lin DC, Schwandner RT, Wang Z, Gao J, Chen JL, Tian H, Ling L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. Nature. 2004;429:188-193.

4 Toma I, Kang JJ, Sipos A, Vargas S, Bansal E, Hanner F, Meer E, Peti-Peterdi J. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. J Clin Invest. 2008;118:2526-2534.

5 Correa PR, Kruglov EA, Thompson M, Leite MF, Dranoff JA, Nathanson MH. Succinate is a paracrine signal for liver damage. J Hepatol. 2007;47:262-269.

6 Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S, Hinteregger S, Kund J, Carballido-Perrig N, Schwarzler C, Junt T, Voshol H, Meingassner JG, Mao X, Werner G, Rot A, Carballido JM. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. Nat Immunol. 2008;9:1261-9.

7 Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, Honore JC, Kermorvant-Duchemin E, Varma DR, Tremblay S, Leduc M, Rihakova L, Hardy P, Klein WH, Mu X, Mamer O, Lachapelle P, Di Polo A, Beausejour C, Andelfinger G, Mitchell G, Sennlaub F, Chemtob S. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. Nat Med. 2008;14:1067-1076.

8 Sadagopan N, Li W, Roberds SL, Major T, Preston GM, Yu Y, Tones MA. Circulating Succinate is Elevated in Rodent Models of Hypertension and Metabolic Disease. Am J Hypertens. 2007;20:1209-1215.

9 Rotstein OD, Pruett TL, Fiegel VD, Nelson RD, Simmons RL. Succinic acid, a metabolic by-product of Bacteroides species, inhibits polymorphonuclear leukocyte function. Infect Immun. 1985;48:402-408.

10 Sanborn T, Gavin W, Berkowitz S, Perille T, Lesch M. Augmented conversion of aspartate and glutamate to succinate during anoxia in rabbit heart. Am J Physiol. 1979;237:H535-H541.

11 Fedotcheva NI, Sokolov AP, Kondrashova MN. Nonezymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2006;41:56-64.

12 Knauf F, Rogina B, Jiang Z, Aronson PS, Helfand SL. Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene Indy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:14315-14319.

13 Knauf F, Mohebbi N, Teichert C, Herold D, Rogina B, Helfand S, Gollasch M, Luft FC, Aronson PS. The life-extending gene Indy encodes an exchanger for Krebs-cycle intermediates. Biochem J. 2006;397:25-29.

14 Inoue K, Fei YJ, Zhuang L, Gopal E, Miyauchi S, Ganapathy V. Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. Biochem J. 2004;378:949-957.

15 Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling. Ann N Y Acad Sci. 1995;766:31-43.

16 Fleckenstein A, Janke J, Doring HJ, Leder O. Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-a new principle in cardiac pathophysiology. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab. 1974;4:563-580.

17 Neely JR, Liedtke AJ, Whitmer JT, Rovetto MJ. Relationship between coronary flow and adenosine triphosphate production from glycolysis and oxidative metabolism. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab. 1975;8:301-321.

18 Mitra R, Morad M. A Uniform Enzymatic Method for Dissociation of Myocytes from Hearts and Stomachs of Vertebrates. American Journal of Physiology. 1985;249:1056-1060.

19 Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W, Cheng YC, Bennett AM, Nathanson MH. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. J Biol Chem. 2007;282:17061-17068.

20 Souza-Fagundes EM, Brumatti G, Martins-Filho OA, Correa-Oliveira R, Zani CL, Amarante-Mendes GP. Myriadenolide, a labdane diterpene isolated from Alomia myriadenia (asteraceae) induces depolarization of mitochondrial membranes and apoptosis associated with activation of caspases-8, -9, and -3 in Jurkat and THP-1 cells. Exp Cell Res. 2003;290:420-426.

21 Sanlioglu AD, Dirice E, Aydin C, Erin N, Koksoy S, Sanlioglu S. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. BMC Cancer. 2005;5:54.

22 Zima AV, Blatter LA. Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent Ca(2+) signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias. J Physiol. 2004;555:607-615.

23 Ait-Mamar B, Cailleret M, Rucker-Martin C, Bouabdallah A, Candiani G, Adamy C, Duvaldestin P, Pecker F, Defer N, Pavoine C. The cytosolic phospholipase A2 pathway, a safeguard of beta2-adrenergic cardiac effects in rat. J Biol Chem. 2005;280:18881-18890.

24 Peters SC, Piper HM. Reoxygenation-induced Ca2+ rise is mediated via Ca2+ influx and Ca2+ release from the endoplasmic reticulum in cardiac endothelial cells. Cardiovasc Res. 2007;73:164-171.

25 Allen MD, Zhang J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. Biochem Biophys Res Commun. 2006;348:716-721.

26 Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zhao X, Zuo L, Bhupathy P, Babu GJ, Cardounel AJ, Periasamy M, Zweier JL. Expression of SERCA isoform with faster Ca2+ transport properties improves postischemic cardiac function and Ca2+ handling and decreases myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293:H2418-H2428.

27 Teucher N, Prestle J, Seidler T, Currie S, Elliott EB, Reynolds DF, Schott P, Wagner S, Kogler H, Inesi G, Bers DM, Hasenfuss G, Smith GL. Excessive sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase expression causes increased sarcoplasmic reticulum Ca2+ uptake but decreases myocyte shortening. Circulation. 2004;110:3553-3559.

28 Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F. Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+ ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. Cell Calcium. 2005;38:291-302.

29 Kukkonen JP, Nasman J, Akerman KE. Modelling of promiscuous receptor-Gi/Gs-protein coupling and effector response. Trends Pharmacol Sci. 2001;22:616-622.

30 Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996;36:429-459.

31 Tang TS, Tu H, Wang Z, Bezprozvanny I. Modulation of type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor function by protein kinase a and protein phosphatase 1alpha. J Neurosci. 2003;23:403-415.

32 Mendes CC, Gomes DA, Thompson M, Souto NC, Goes TS, Goes AM, Rodrigues MA, Gomez MV, Nathanson MH, Leite MF. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca2+ signals into mitochondria. J Biol Chem. 2005;280:40892-40900.

33 Zucker AR, Gondolesi GE, Abbott MA, Decker R, Rosengren SS, Fishbein TM. Liver-intestine transplant from a pediatric donor with unrecognized mitochondrial succinate cytochrome C reductase deficiency. Transplantation. 2005;79:356-358.

34 Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T. Mitochondrial Ca2+ as a key regulator of cell life and death. Cell Death Differ. 2007;14:1267-1274.

35 Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. Cell. 1998;93:215-228.

36 Wilkins BJ, Molkentin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. Biochem Biophys Res Commun. 2004;322:1178-1191.

37 Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Skavdahl M, Murphy E, Welch S, Schaefer E, Walsh K, Rosenzweig A, Torella D, Nurzynska D, Kajstura J, Leri A, Anversa P,

Sussman MA. Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. Circ Res. 2004;94:884-891.

38 Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, Urry FM, Roberts WL. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. Clin Chem. 2001;47:1993-2002.

39 Davili Z, Johar S, Hughes C, Kveselis D, Hoo J. Succinate dehydrogenase deficiency associated with dilated cardiomyopathy and ventricular noncompaction. Eur J Pediatr. 2007;166:867-870.

40 Gullans SR, Kone BC, Avison MJ, Giebisch G. Succinate alters respiration, membrane potential, and intracellular K+ in proximal tubule. Am J Physiol. 1988;255:F1170-F1177.

41 Sinhorin VD, Roehrs C, Pasin JS, Belle NA, Rubin MA, Mello CF. Succinate causes oxidative damage through N-methyl-D-aspartate-mediated mechanisms. Brain Res. 2005;1051:66-71.

42 Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. J Mol Cell Cardiol. 2004;37:417-429.

43 Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosemblit N, Marks AR. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. J Cell Biol. 2001;153:699-708.

44 Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:511-518.

45 Guatimosim S, Amaya MJ, Guerra MT, Aguiar CJ, Goes AM, Gomez-Viquez NL, Rodrigues MA, Gomes DA, Martins-Cruz J, Lederer WJ, Leite MF. Nuclear Ca2+ regulates cardiomyocyte function. Cell Calcium. 2008;44:230-242.

46 Lipp P, Laine M, Tovey SC, Burrell KM, Berridge MJ, Li W, Bootman MD. Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. Curr Biol. 2000;10:939-942.

47 Kockskamper J, Zima AV, Roderick HL, Pieske B, Blatter LA, Bootman MD. Emerging roles of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol. 2008;45:128-147.

48 Domeier TL, Zima AV, Maxwell JT, Huke S, Mignery GA, Blatter LA. IP3 receptor-dependent Ca2+ release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294:H596-H604.

49 Proven A, Roderick HL, Conway SJ, Berridge MJ, Horton JK, Capper SJ, Bootman MD. Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. J Cell Sci. 2006;119:3363-3375.

50 Csordas G, Thomas AP, Hajnoczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. EMBO J. 1999;18:96-108.

51 Jayaraman T, Marks AR. T cells deficient in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are resistant to apoptosis. Mol Cell Biol. 1997;17:3005-3012.

52 Khan AA, Soloski MJ, Sharp AH, Schilling G, Sabatini DM, Li SH, Ross CA, Snyder SH. Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Science. 1996;273:503-507.

53 Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem. 2000;69:217-245.

54 Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. Cell. 1997;89:1145-1153.

55 Wellner-Kienitz MC, Bender K, Meyer T, Pott L. Coupling to Gs and G(q/11) of histamine H2 receptors heterologously expressed in adult rat atrial myocytes. Biochim Biophys Acta. 2003;1642:67-77.

56 Tateyama M, Kubo Y. Dual signaling is differentially activated by different active states of the metabotropic glutamate receptor 1alpha. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:1124-1128.

57 Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff-still viable in the new millennium. J Pharmacol Toxicol Methods. 2007;55:113-126.

58 Bers, DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes.Ann. Rev. Physiol.2007;70:17.1-17.27.

59 Mullonkal CJ, Toledo-Pereyra LH. Akt in ischemia and reperfusion. J Invest Surg. 2007;20:195-203.

60 Wu CH, Liu JY, Wu JP, Hsieh YH, Liu CJ, Hwang JM, Lee SD, Chen LM, Chang MH, Kuo WW, Shyu JC, Tsai JH, Huang CY. 17beta-estradiol reduces cardiac hypertrophy mediated through the up-regulation of PI3K/Akt and the suppression of calcineurin/NF-AT3 signaling pathways in rats. Life Sci. 2005;78:347-356.

61 Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, Mckinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. Local InsP3-dependent perinuclear Ca2+ siganaling in cardiac myocyte excitation transcription coupling. J. Clin. Invest. 2006;116:675-682.

62 Regula KM, Rzeszutek MJ, Baetz D, Seneviratne C, Kirshenbaum LA. Therapeutic opportunities for cell cycle re-entry and cardiac regeneration. Cardiovasc Res. 2004;64:395-401.

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