

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRIELLE ELAINE CAPOTE

ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO
FÍSICO VOLUNTÁRIO EM CAMUNDONGOS NOCAUTE PARA BETA-ARRESTINA

2

CURITIBA

2020

ANDRIELLE ELAINE CAPOTE

ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO
FÍSICO VOLUNTÁRIO EM CAMUNDONGOS NOCAUTE PARA BETA-ARRESTINA

2

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Fisiologia, no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Lavezzo Dias

Co-Orientadora: Prof. Dra. Beata Maria Wolska

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Capote, Andrielle Elaine

Alterações cardiovasculares induzidas pelo exercício físico voluntário em camundongos nocaute para beta-arrestina 2. / Andrielle Elaine Capote. – Curitiba, 2020.

82 p.: il.

Orientador: Fernando Augusto Lavezzo Dias.

Coorientadora: Beata Maria Wolska.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Fenômenos fisiológicos cardiovasculares. 2. beta-Arrestina 2. 3. Exercícios físicos. I. Título. II. Dias, Fernando Augusto Lavezzo, 1977-. III. Wolska, Beata Maria. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (22. ed.) 612.18



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISIOLÓGIA -
40001016072P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FISIOLÓGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANDRIELLE ELAINE CAPOTE** intitulada: **ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO EM CAMUDONGOS NOCAUTE PARA BETA-ARRESTINA 2**, sob orientação do Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO LAVEZZO DIAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica
27/08/2020 19:22:44.0

FERNANDO AUGUSTO LAVEZZO DIAS
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
27/08/2020 21:42:17.0

ROSALVO TADEU HOCHMULLER FOGAÇA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
27/08/2020 21:34:52.0

ARIANI CAVAZZANI SZKUDLAREK
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
27/08/2020 19:06:18.0

BENTO JOAO DA GRACA AZEVEDO ABREU
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE)

Setor de Ciências Biológicas - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1644 - E-mail: ppgfisio@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 50956

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 50956

Dedico essa tese a todas as mulheres latinas que se aventuraram em terras estrangeiras, a todas as quais tiveram suas capacidades intelectuais duvidadas, que foram muitas vezes diminuídas pelo sotaque, pela cor da pele, entre muitas outras coisas que ouvimos quando somos imigrantes...
Eu sou uma de vocês e esse título nos representa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais que são a base de tudo, que me deram a oportunidade de me dedicar integralmente aos estudos e apoiaram meus sonhos distantes, superando a saudade e o aperto no peito que é deixar um filho atravessar o oceano para sonhar mais alto.

Aos meus irmãos que são os meus primeiros parceiros de vida, em especial a minha irmã Franciele que me apoiou muito nessa tese, obrigada por todo carinho e conselhos quando tudo parecia dar errado.

À Isabela Vieira, minha parceira de vida. Obrigada por todo carinho e amor que você trouxe para minha vida, me ajudando a levar esses últimos anos do doutorado com mais tranquilidade e leveza. Obrigada por acreditar que tudo iria dar certo, quando nem eu mesma acreditava e tinha mais uma crise de choro.

Ao meu orientador, Fernando Dias, por ter confiado em mim e me proporcionado a maior oportunidade da minha vida acadêmica, o doutorado sanduíche. Muito obrigada por toda orientação ao longo dos últimos seis anos, por todo exemplo de profissionalismo e respeito. Levo sua imagem como um grande exemplo de profissional a ser seguida.

Aos meus orientadores em Chicago, John Solaro e Beata Wolska, que abriram as portas dos seus laboratórios para mim. Agradeço por todo ensinamento e paciência, uma oportunidade de vida que eu jamais esquecerei.

Ao professor Rosalvo Fogaça, que mesmo distante no doutorado esteve muito presente no meu mestrado, um professor admirável com toda sua sabedoria e tranquilidade e em quem eu me espelho muito quando penso na docente que eu almejo um dia ser.

Ao meu grande irmão de laboratório, Diego Araújo, em Curitiba e em Chicago nossos caminhos se cruzaram. Obrigada por toda parceria, troca de figurinhas e muita amizade nesses seis anos de mestrado e doutorado, levo nossa amizade e parceria para sempre.

Ao meu primeiro amigo americano e colega de laboratório, David Ryba, quem me acolheu sem nem pensar (ou entender meu inglês direito) duas vezes em terras americanas. Foi um grande professor, orientador e amigo nesses anos em Chicago, obrigada por tudo.

A Paola Rosas e Shamim Chowdury, grandes amigas que eu encontrei no laboratório de Chicago, vocês me motivaram muito quando tudo parecia dar errado. Em especial à Shamim, que foi minha mãe de laboratório e me acolheu desde o primeiro dia em Chicago.

Aos meus colegas de laboratório em Chicago, Yocelin Brito, Jody Martins, Palm, Chad Warren, Monika Halas, Ashley e Elena, foi muito divertido e enriquecedor dividir o local de trabalho com vocês e aprender bioquímica com vocês.

Aos colegas do laboratório de Physical Therapy na UIC, Guilherme Peixoto e Larissa Delgado, agradeço muito pela ajuda nos experimentos de vasos isolados, sem vocês esses vasos não estariam tão bonitos.

Ao professor Shane Philips e sua equipe, pela disponibilização das rodas de corrida e todo sistema de análise dos vasos.

Aos meus colegas de laboratório em Curitiba, Henrique, Gislaine, Francieli e Claucio pelos momentos de descontração durante o tempo em Curitiba, dividir os anseios e dúvidas deixam as coisas mais leves.

Aos meus amigos que viraram minha família em Chicago, Rafael Ferraz, Carol Mascarenhas, Ana Cláudia, Ana Carolina, Marcel, Felipe, Marcelo, Beatriz Ramos e Beatriz Castro vocês são parte das minhas melhores memórias nos EUA, e fizeram as coisas bem mais leves e fáceis de serem vividas. Jamais esquecerei esses anos que dividi a vida americana com vocês, Forever Abriella.

A todos os meus amigos que me deram suporte nesses anos de doutorado, não vou citar pois posso esquecer um nome ou outro, vocês foram grande parte do meu grupo de apoio nesses últimos anos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, por todos esses seis anos de conhecimento e motivação. Minha formação e a profissional que eu sou hoje carrega um pouco de cada um de vocês.

"à memória das mulheres para quem o medo
foi mais forte que a própria vida...
às que não gritam
e se tornam loucas
às mulheres que estão na luta,
porque venceram o medo.
Todo medo do mundo
é infinitamente menor que a nossa força"
(Autor Desconhecido)

RESUMO

A beta-arrestina 2 (BARR2) é uma proteína que apresenta funções regulatórias importantes sobre receptores acoplados à proteína G (GPCR), além de ser capaz de ativar diretamente cascatas de sinalização específicas. Seu papel nos mecanismos de hipertrofia cardíaca vem sendo estudado devido à sua afinidade com um tipo de GPCR específico, o receptor de Angiotensina II tipo 1 (AT1R). Dessa forma, objetivou-se neste estudo analisar a função da BARR2 na hipertrofia fisiológica cardíaca e na vasomotilidade periférica em resposta ao exercício físico voluntário. Camundongos da linhagem FVB/N, com nocaute (KO) e sem nocaute (NTG) do gene para a proteína BARR2 foram divididos em quatro grupos: 1) Controle(NTG) sedentário (n=16); 2) NTG corredor (n=20); 3) Nocaute (BARR2KO) sedentário (n=16) e 4) BARR2KO corredor (n=20). Posteriormente, foi realizada análise de sub-grupo levando em consideração o sexo. Os grupos corredores foram submetidos ao protocolo de exercício voluntário em rodas de corrida em suas gaiolas durante seis semanas. Medidas da função cardíaca foram feitas previamente e após o protocolo de exercício por meio de ecocardiografia. No grupo de corredores, as rodas de corrida voluntária foram equipadas com sistema Wi-Fi para aquisição dos dados a cada 24 horas. Após a intervenção, a vasomotilidade foi avaliada em vasos mesentéricos, a sensibilidade e tensão dos miofilamentos avaliadas em fibras cardíacas desmembranadas e a fosforilação de proteínas miofilamentares envolvidas com o transporte de íons cálcio no cardiomiócitos foi avaliada por western blot. Como resultado, foi observada diminuição na capacidade de exercício físico voluntário em fêmeas KO comparado às fêmeas NTG e consequente redução da hipertrofia fisiológica cardíaca nas fêmeas KO. Esses achados não foram observados em machos. Houve marcante diminuição na capacidade de dilatação fluxo-induzida em vasos periféricos nos animais nocaute em comparação aos animais controle. No entanto, essa redução na dilatação induzida foi revertida nos animais KO corredores após o exercício voluntário por seis semanas. Não foram observadas alterações na sensibilidade ao cálcio ou tensão desenvolvida em miofilamentos, ou nos níveis de fosforilação das proteínas investigadas em nenhum dos grupos. Conclui-se que a ausência da Beta-Arrestina 2 limita a capacidade de exercício físico voluntário em fêmeas nocaute e, consequentemente, reduz o desenvolvimento da hipertrofia fisiológica cardíaca. Adicionalmente, constatou-se a necessidade da BARR2 no mecanismo de dilatação induzida por fluxo em vasos periféricos e o importante papel que o exercício físico voluntário na prevenção ou reversão desse distúrbio vasomotor.

Palavras-chave: Beta-Arrestina 2, exercício físico voluntário, hipertrofia fisiológica cardíaca, vasos periféricos, fisiologia cardiovascular.

ABSTRACT

Beta-Arrestin 2 (BARR2) is a protein with important regulatory functions on G protein-coupled receptor (GPCR) in addition to being able to activate specific signaling pathways. Its role in the mechanisms of cardiac hypertrophy has been studied due to its affinity with a specific type of GPCR, the type 1 Angiotensin II receptor (AT1R). Thus, the aim of this study was to evaluate the role of BARR2 in physiological cardiac hypertrophy and in peripheral vascular motility in response to voluntary physical exercise. Mice of FVB/N strain, with (KO) and without (NTG) knockout of the gene for the BARR2 protein were divided in four groups: 1) Sedentary control (NTG) (n=16); 2) Runners NTG (n=20); 3) Sedentary knockout (KO) (n=16); 4) Runners KO (n=20). Subsequently, a subgroup analysis was carried out considering sex. The running groups were submitted to the voluntary exercise protocol on racing wheels in their cages for six weeks. Cardiac function measurements were performed before and after the exercise protocol using echocardiography. In the group of runners, the voluntary race wheels were equipped with a Wi-Fi system for data acquisition every 24 hours. After the intervention, vasomotility was assessed in mesenteric vessels, myofilament sensitivity and tension was measured in skinned fibers preparations and, the phosphorylation of sarcomeric proteins and proteins involved with the transport of calcium ions in the cardiomyocytes was assessed by western blot. As a result, we observed a decrease in the capacity for voluntary physical exercise in KO females compared to NTG females and a consequent reduction in physiological cardiac hypertrophy in KO females. These findings were not observed in males. There was a marked decrease in the capacity of flow-induced dilation in peripheral vessels from knockout animals compared to control animals. However, this reduction in flow-induced dilation was reversed in KO runner animals after six weeks of voluntary physical exercise. There were no changes in calcium sensitivity or developed tension in myofilaments nor in phosphorylation levels of the investigated proteins in any group. In conclusion, the absence of beta-arrestin 2 limits the capacity for voluntary physical exercise in knockout females and, consequently, reduces the development of physiological cardiac hypertrophy, additionally, we found evidence that Beta-Arrestin 2 is essential for the induced dilation mechanism and, that physical exercise plays important role in preventing or reversing this vasomotor disorder.

Key Words: Beta-Arrestin 2, voluntary exercise, physiological cardiac hypertrophy, peripheral vessels, cardiovascular physiology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Vias de sinalização pelos 7TMRs envolvendo as BARRs.....	24
FIGURA 2: Delineamento experimental	29
FIGURA 3: Diagrama das etapas experimentais.....	30
FIGURA 4: Média semanal da distância percorrida durante 6 semanas de corrida voluntária em camundongos.....	38
FIGURA 5: Avaliação ecocardiográfica do diâmetro do AE e massa de ventrículo esquerdo no momento basal e após 6 semanas de exercício voluntário.	40
FIGURA 6: Análise ecocardiográfica do diâmetro interno do ventrículo esquerdo no momento basal e após 6 semanas de exercício voluntário.	41
FIGURA 7: Índice de hipertrofia fisiológica cardíaca Razão entre peso do coração e comprimento da tíbia.	44
FIGURA 8: A redução da Dilatação Fluxo-Induzida (DFI) em vasos mesentéricos isolados de camundongos BARR2 KO é recuperada após 6 semanas de exercício voluntário.....	45
FIGURA 9: Diferenças na Dilatação Fluxo-Induzida (DFI) em vasos mesentéricos isolados de camundongos BARR2 KO e NTG.....	46
FIGURA 10: Diferenças na Dilatação Fluxo-Induzida (DFI) em vasos mesentéricos isolados de camundongos BARR2 KO e NTG pós alta pressão intraluminal (APIL).	47
FIGURA 11: Efeitos do exercício voluntário na relação Força-Ca ⁺² em animais NTG e BARR2 KO.....	50
FIGURA 12: Efeitos do exercício voluntário na sensibilidade ao cálcio e na geração de força em miofilamentos provenientes de camundongos NTG e KO.	51
FIGURA 13: Fosforilação de proteínas miofilamentares responsáveis pela regulação da contração muscular cardíaca em camundongos NTG e BARR2 KO.....	52
FIGURA 14: Fosforilação de sítios específicos de Proteína C de ligação à Miosina em amostras de camundongos NTG e BARR2 KO.....	53
FIGURA 15: Fosforilação de Fosfolambano e expressão total de SERCA e Fosfolambano no miocárdio de camundongos NTG e BARR2 KO.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros ecocardiográficos em camundongos NTG e Beta-arrestina KO após 6 semanas de corrida voluntária.	43
TABELA 2: Dilatação fluxo-induzida (DFI) após a exposição a L-Name e PEG-Catalase em animais ARRB2 KO e NTG após 6 semanas de exercício físico voluntário.	48
TABELA 3: Dilatação Fluxo-Induzida (DFI) após Alta Pressão Intraluminal (APIL) e exposição a L-Name e PEG-Catalase em artérias mesentéricas de animais BARR2 KO e NTG após exercício físico voluntário por 6 semanas.....	49

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1– MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA POR SEMANA	76
APÊNDICE 2 – MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE ECOCARDIOGRAFIA APRESENTADOS NA FIGURA 2	77
APÊNDICE 3 – MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE HIPERTROFIA FISIOLÓGICA CARDÍACA APRESENTADO NA FIGURA 4.....	77
APÊNDICE 4 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DADOS DE DILATAÇÃO FLUXO-INDUZIDA.....	78
APÊNDICE 5 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DADOS DE DILATAÇÃO FLUXO-INDUZIDA SEPARADA POR SEXO.....	78
APÊNDICE 6 – MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE PCA50, COEFICIENTE DE HILL E TENSÃO MÁXIMA EM FIBRAS ISOLADAS.	79
APÊNDICE 7 – MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS SARCOMÉRICAS E REGULADORAS CARDÍACAS.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Átrio Esquerdo
ANG II – Angiotensina II
APIL – Alta pressão intraluminal
AT1R – Receptor de angiotensina do tipo 1
BARR – Beta-Arrestina
BARR2 – Beta-Arrestina 2
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico
cMyBPC – Proteína C de ligação à Miosina (*Myosin binding protein C*)
DFI – Dilatação fluxo-induzida
ECA – Enzima conversora de angiotensina
eNOS – Óxido Nitrico Sintase
ERK – Quinase Regulada por Fatores Extracelulares (*Extracellular regulated kinase*)
GPCR – Receptor acoplado a proteína G
GPCK – GPCR quinase
HILP – Alta pressão intraluminal (*High intraluminal pressure*)
KO – Nocaute (*Knockout*)
LV – Ventrículo Esquerdo (*Left Ventricle*)
LVIDd – Diâmetro interno diastólico do Ventrículo Esquerdo (*Left Ventricle internal diameter diastolic*)
L-NAME - NG-nitro-L-arginina
MAPK – Proteína-Quinase Ativada por Mitógeno (*Mitogen-activated protein kinase*)
NO – Óxido Nítrico (*Nitric Oxide*)
NTG – Não Transgênico
PEG Catalase - Catalase-polietilenoglicol
PLN – Fosfolambano (*Phospholamban*)
Sm – Pico de velocidade sistólico
SERCA – Bomba de Cálcio do Retículo Endoplasmático
SRA – Sistema Renina-Angiotensina
SS – Estresse de cisalhamento (*Shear Stress*)
VE – Ventrículo Esquerdo
Vcf – Velocidade média do encurtamento circunferencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	BETA-ARRESTINA	18
1.2	BETA-ARRESTINA 2	20
1.3	PAPEL DA BETA-ARRESTINA 2 NOS VASOS SANGUÍNEOS	20
1.4	PAPEL DA BETA-ARRESTINA 2 NO CORAÇÃO.....	23
1.5	HIPERTROFIA FISIOLÓGICA CARDÍACA.....	24
1.6	EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO.....	25
2	OBJETIVOS E HIPÓTESES	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
2.3	HIPÓTESES	27
3	MÉTODOS	28
3.1	MODELO ANIMAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.2	GENOTIPAGEM.....	30
3.2.1	EXTRAÇÃO DE DNA	30
3.2.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	31
3.3	CORRIDA VOLUNTÁRIA	31
3.4	ECOCARDIOGRAFIA	32
3.5	FIBRA MUSCULAR CARDÍACA ISOLADA	33
3.6	WESTERN BLOT	34
3.7	ANÁLISE DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E DO MÚSCULO LISO	35
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4	RESULTADOS.....	37
4.1	A DISTÂNCIA PERCORRIDA É REDUZIDA EM FÊMEAS BAAR2 KO.....	37
4.2	FÊMEAS BARR2 KO APRESENTAM INCAPACIDADE DE DESENVOLVER HIPERTROFIA FISIOLÓGICA CARDÍACA POR EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO	39
4.3	O EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO RECUPERA A CAPACIDADE DE DILATAÇÃO DOS VASOS PERIFÉRICOS EM ANIMAIS BARR2 KO	45

4.4 A FORÇA DESENVOLVIDA E RESPONSABILIDADE DO MIOFILAMENTO AO CÁLCIO NÃO É ALTERADA COM O EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO	50
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS	67
8 APÊNDICES.....	76
9 ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

As Beta-arrestinas (BARRs) são proteínas presentes em diversos tipos celulares, as quais podem ser expressas em tecidos específicos (como na retina), enquanto outras estão presentes em todos os tipos celulares. Dentre os subtipos de BARRs, destacam-se as Beta-arrestinas 2 (BARR2) por serem expressas em células de todo o corpo e apresentarem função sobre a família de receptores de sete domínios transmembrânicos (7TMRs), popularmente conhecidos como o grupo de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (JEAN-CHARLES, KAUR & SHENOY et al., 2017; VIOLINO & LEFKOWITZ, 2007). Esse grupo de receptores atua em diversos mecanismos fisiológicos celulares que têm como função regular e ativar segundos mensageiros, bem como sinalizar diversas vias celulares importantes (NOOR et al., 2001; LEFKOWITZ e SHENOY, 2005).

A descoberta das BARRs ocorreu devido sua importante função inibitória e dessensibilizante sobre as GPCRs (NOOR et al., 2001; LEFKOWITZ & SHENOY, 2005). Em geral, as BARRs impedem a sinalização da proteína G ao desativar a interação entre um GPCR e a proteína G associada (RYBA et al., 2017). No entanto, outras funções das BARRs como sinalização e endocitose também foram descobertas mais tarde (KOBAYASHI, 2020; SHENOY & LEFKOWITZ, 2011; MOORE et al., 2007; KRUPNICK e BENOVIC, 1998).

Existe uma grande afinidade entre a BARR2 e o receptor de Angiotensina II do tipo 1 (AT1R), um GPCR importante para o funcionamento cardíaco (RYBA *et. al.*, 2017). Os AT1Rs são encontrados em abundância no sistema cardiovascular e atuam em processos celulares diversos, sendo importantes para a hipertrofia cardíaca. No coração, a ativação desses receptores promove a hipertrofia dos miócitos e o aumento de sua contratilidade; já nos vasos sanguíneos sua ativação possibilita a vasoconstrição (BURNIER, 2001).

A hipertrofia cardíaca é um processo de remodelamento do tecido gerado por um estresse devido à sobrecarga de volume e pressão (MÜLLER & DHALLA, 2013). A sobrecarga gerada nos ventrículos pode acontecer de maneira natural em resposta a um estímulo fisiológico, gerando um aumento da massa cardíaca para normalizar o estresse nas paredes miocárdicas. Porém, durante o repouso, permite uma função cardiovascular normal; justamente o caso da hipertrofia fisiológica cardíaca por esforço/exercício (VEGA et al., 2017; BERNARDO et al., 2010).

Os benefícios do exercício físico no sistema cardiovascular dependem da frequência, intensidade e duração do exercício (NYSTORIAK & BHATNAGAR, 2018; WILSON, ELLISON & CABLE, 2016). Considerando que em protocolos de treinamento forçado, como na corrida em esteira ou na natação, existe uma preocupação devido ao tipo de crescimento cardíaco não ser puramente fisiológico devido ao estresse envolvido nesses exercícios (BERNARDO et al, 2010), um novo modelo de treinamento vem sendo empregado em estudos com animais - o exercício físico voluntário. Nesta modalidade, os animais têm livre acesso às rodas de corrida e foi descrito aumento do trofismo cardíaco após 3 a 4 semanas de treinamento, dependendo de algumas variáveis empregadas (VEGA et al., 2017; KONHILAS et al., 2015; KONHILAS et al., 2004).

Sabendo da possível influência da BARR2 no mecanismo de hipertrofia cardíaca e sua sinalização influenciando a vasomotilidade, o presente estudo objetivou investigar os efeitos do nocaute do gene da BAAR2 em camundongos sobre a capacidade de exercício, o trofismo cardíaco e a vasomotilidade, após intervenção por um protocolo de exercício físico voluntário de 6 semanas.

1.1 BETA-ARRESTINA

A família de receptores GPCR é considerada a maior, mais versátil e universal família de receptores de membrana devido ao seu amplo alcance de estímulos fisiológicos, tais como regulação do metabolismo, secreção de moléculas, atividade elétrica, crescimento, formato e motilidade de todas as células de mamíferos (NOOR *et. al.*, 2001; LEFKOWITZ & SHENOY, 2005). O desempenho dessas moléculas na regulação da sinalização celular, que culmina na regulação de inúmeras funções celulares, ocorre por meio da transdução de sinais extracelulares de hormônios, neurotransmissores, quimiocinas e outros estímulos ambientais no interior da célula (KOBAYASHI, 2020; VAN GASTEL et al., 2018).

Devido as importantes funções desse grupo de receptores, estudos ressaltam a importância das BARRs, que foram inicialmente descobertas pela sua função inibitória e dessensibilizante dos GPCRs (NOOR et al., 2001; LEFKOWITZ & SHENOY, 2005). A ativação de um GPCR se inicia pela ligação de um agonista ao receptor, o que gera

uma mudança em sua conformação pelas GPCR kinases (GPCK). Assim, a fosforilação do receptor gera uma afinidade de ligação em sua superfície, que recruta adaptadores citosólicos como as BARRs. Essa mudança na conformação dos GPCRs leva também à dissociação da proteína G ativada nas subunidades α e $\beta\gamma$. Essa dissociação gera a sinalização dos segundos mensageiros, como por exemplo o cálcio e a adenosina monofosfato cíclico (AMP) cíclico, quando se trata de proteína Gs. Quando o estímulo agonista inicial ao receptor é prolongado e contínuo, faz-se necessária a desativação ou supressão de sua resposta; e nesse contexto a função dessensibilizante dos GPCRs é importantíssima a fim de cessar o estímulo e a resposta interrupta (KRUPNICK & BENOVIC, 1998). Na presença de um estímulo contínuo as BARRs são responsáveis por desativar o GPCR antes da reiniciação da transdução do sinal, além de reforçar as enzimas que degradam o segundo mensageiro. Assim, as vias de sinalização de GPCR envolvem uma série de sinais transmitidos do citoplasma para o núcleo por meio de interações proteína-proteína e cascata de quinase (KOBAYASHI, 2020; SHENOY & LEFKOWITZ, 2011; MOORE et al., 2007; KRUPNICK e BENOVIC, 1998).

Após a internalização, as BARRs também exercem função importante na endocitose, processo no qual a estimulação do agonista leva à internalização da superfície celular dos GPCRs dentro de vesículas revestidas de clatrina. Essa internalização é facilitada pela ligação das BARRs nos domínios específicos de ligação para a clatrina, subunidade $\beta 2$ -adaptina, no complexo adaptador de AP2. Além disso, liga-se a outras proteínas específicas para também facilitar a internalização do receptor GPCR e consequente reciclagem ou degradação lisossômica (SHENOY & LEFKOWITZ, 2011).

As BARR parecem desempenhar outras funções como a de proteína de suporte, devido à sua interação com proteínas citoplasmáticas e ao fato de anexar GPCRs a vias de sinalização intracelular. Embora estejam associadas a diferentes funções, as BARRs estão intimamente relacionadas à função de sinalização, como na ativação da via proteíno-quinase ativadas por mitógenos (do inglês, *mitogen-activated protein* - MAP). Onde adquirem uma conformação ativa ao formarem um complexo com o GPCR e propiciar um arcabouço com o agonista e as estruturas de MAP quinase (MAPK), MAP quinase quinase (MAP2K) e MAP quinase quinase quinase (MAP3K). Isto leva à ativação da cascata de MAPK atingindo os diversos subsequentes alvos causando, por exemplo, hipertrofia fisiológica cardíaca (FIGURA

1). A BARR foi demonstrada como dependente da ativação de MAPK para ação em vários processos regulatórios dessa classe de proteína (SHENOY & LEFKOWITZ, 2011; MOORE et al., 2007).

1.2 BETA-ARRESTINA 2

Existem quatro isoformas de BARR, duas delas são expressas somente na retina (Arrestina 1 e 4), no entanto as isoformas conhecidas como Beta-Arrestina 1 e Beta-Arrestina 2 (conhecidas por Arrestina 2 e 3, respectivamente) são isoformas expressas em todos os tipos celulares e estas atuam como reguladoras gerais para toda a família GPCRs (JEAN-CHARLES, KAUR & SHENOY et al., 2017; VIOLINO & LEFKOWITZ, 2007). BARR1 E BARR2 estão presentes na maioria dos tecidos dos mamíferos, mas são predominantemente distribuídas nos tecidos neurais, sendo muito semelhantes entre si, demonstrando, inclusive, a possibilidade da substituição de uma isoforma pela outra (LIU et al., 2017; SULEYMANOVA et al., 2017; FENG, WANG & LIU, 2011). Em estudos realizados com camundongos nocaute (expressão nula da proteína) para uma das BARR (BAAR1 ou BARR2), foi demonstrado que os animais permanecem viáveis, ao contrário do nocaute para ambas as arrestinas que se mostra letal para o animal durante o desenvolvimento embrionário (LIU et al., 2017; BOHN et al., 1999; CONNER et al., 1997).

Considerando a função de sinalização mediada pelas BARRs, a BARR2 tem alta afinidade de ligação a um tipo específico de GPCRs importante para o funcionamento cardíaco, o AT1R (RYBA et al., 2017). Devido ao papel central de regulação de pressão sanguínea e de fluídos dos AT1Rs, é de suma importância entender o seu funcionamento, uma vez que está relacionado ao desenvolvimento e progressão de doenças cardíacas como, por exemplo, a miocardiopatia dilatada (RYBA et al., 2017; HUNYADY & CATT, 2005). Como os AT1Rs estão localizados nos vasos e no coração, sua ativação promove hipertrofia dos miócitos, vasoconstrição, aumento da contratilidade do miocárdio, entre outras ações (BURNIER, 2001).

1.3 PAPEL DA BETA-ARRESTINA 2 NOS VASOS SANGUÍNEOS

A regulação da contração do músculo liso nas arteríolas depende de um conjunto de sinais neurais, hormonais e da síntese de substâncias parácrinas. Com relação a sinalização hormonal, a angiotensina II (ANG II) é um importante hormônio com significativas propriedades vasoativas que está presente, devido ao seu potencial como vasoconstritor, na resistência arteriolar (ATLAS, 2007). Em situações de redução da pressão sanguínea ocorre a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) que culmina na liberação da ANG II. Esta, por sua vez, induz à secreção de aldosterona (MIRABITO COLAFELLA, BOVÉE & DANSER 2019; ATLAS, 2007). No entanto, a ANG II possui outras ações que levam ao aumento da pressão arterial que não somente a liberação da aldosterona (VIOLIN et al., 2010).

Devido ao aumento da pressão arterial pela ação da ANG II, alguns medicamentos surgiram para atenuar esta função tratando assim a hipertensão arterial. Essa classe de fármacos age especificamente inibindo a enzima conversora de angiotensina (ECA). Esta enzima presente no endotélio vascular converte ANG I em ANG II e seu bloqueio diminui a produção de ANG II, o que causa relaxamento dos vasos sanguíneos, consequentemente induzindo a redução da pressão arterial. Assim, a hipertensão além de outras disfunções cardíacas são acometimentos frequentemente tratados por meio da inibição farmacológica do sistema renina-angiotensina-aldosterona (KASCHINA & UNGER, 2019; NEHME et al., 2019; BURNIER, 2001). E para tal ação, são utilizados principalmente os inibidores da ECA, mas também podem ser utilizados bloqueadores do AT1R e antagonistas dos mineralocorticóides (NEHME et al., 2019; BURNIER, 2001).

Esses medicamentos são utilizados quando há efeito não benéfico para o paciente com o uso dos inibidores de ECA. Por este motivo, os bloqueadores dos AT1R são comumente utilizados para o tratamento de insuficiência cardíaca e hipertensão. Sabendo da afinidade de ligação entre a BARR2 e o AT1R, estudos sugerem ainda, que a sinalização mediada pela BARR leva à uma sinalização cardioprotetora, por reduzir a lesão celular em meio a lesão cardíaca aguda (KIM et al., 2012; BURNIER, 2001).

Nesse sentido, o receptor AT1R, quando ativado, possui ação relevante na regulação da fisiologia cardiovascular, pois sua estimulação sustentada excessivamente por ANG II pode causar fibrose, induzindo a disfunção cardíaca e contribuindo para a insuficiência cardíaca. Um fato importante é que essa ativação pode ocorrer também por meio de BARRs recrutadas para o receptor ativado pelas

quinases receptoras acopladas à proteína G. Assim, os mecanismos são consequentemente dependentes tanto da proteína G quanto da BARR (RYBA et al., 2017; MONASKY et al., 2013).

Forças hemodinâmicas na parede dos vasos influenciam propriedades funcionais das células endoteliais (CHISTIAKOV, OREKHOV & BOBRY SHEV, 2016). As células endoteliais vasculares possuem diversos receptores com sensibilidade ao fluxo (mecanosensores) que recebem e transmitem esses sinais por mecanotransdução. Mecanotransdução é um processo de conversão de forças mecânicas em mecanismos bioquímicos intracelulares (SANTOS et al., 2017; CHISTIAKOV, OREKHOV & BOBRY SHEV, 2016; KUCHAN et al., 1994).

A força de atrito tangencial gerada pelo fluxo sanguíneo na parede do vaso, conhecida como estresse de cisalhamento (em inglês, *Shear Stress*) é uma das forças hemodinâmicas que as células endoteliais vasculares são expostas pelo fluxo (SANTOS et al., 2017, BARAUNA et al., 2013; DAVIES, 2009; LI et al., 2005). O endotélio detecta e responde ao estresse de cisalhamento devido a diversos mecanosensores, que como resultado do processo de mecanotransdução regulam diversos processos celulares como: crescimento celular, angiogênese e até mesmo apoptose (CHATTERJEE & FISHER 2014; LI et al., 2005).

O estresse de cisalhamento também é um estímulo fisiológico para a produção de óxido nítrico (NO), importante regulador do tônus vascular (BARAUNA et al., 2013). Nesse contexto, os GPCRs são citados como potenciais mecanosensores dessa sinalização e dentro dessa classe o AT1R é tido como um importante mecanosensor celular de superfície (RAMKHELAWON, RIVAS & LEHOX, 2013). Logo, as BARR que têm papel importante ativação dos AT1R, também exibem importante função da produção de NO estímulo-dependente de estresse de cisalhamento agudo em células endoteliais por ativação que envolve a via de sinalização Akt/eNOS (CARNEIRO et al., 2017).

1.4 PAPEL DA BETA-ARRESTINA 2 NO CORAÇÃO

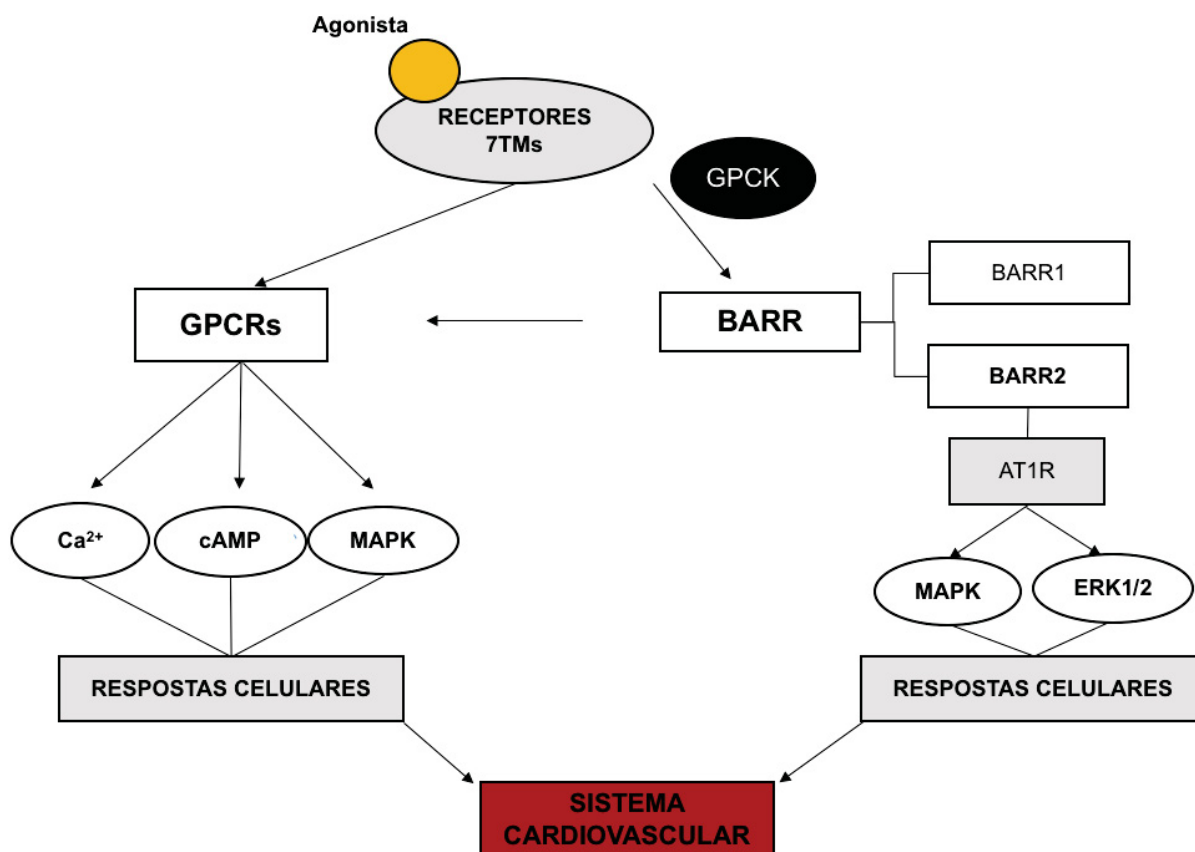
A afinidade da BARR2 com o receptor AT1R está intimamente relacionada à função de hipertrofia cardíaca fisiológica, pela ativação de outra cascata metabólica importantíssima para a contratilidade cardíaca, a quinase regulada por fatores extracelulares (do inglês, *extracellular regulated kinase* - ERK) além da MAPK

(FIGURA 1) (SANNI et al., 2010).

A ERK pode ser ativada via AT1R de duas vias distintas. A primeira envolve a ativação por PKC e a segunda pela sinalização da BARR2 independente de GPCR (WEI *et. al.*, 2003). A via de sinalização de ERK1/2 dependente de BARR descreve que em complexos com AT1R, a BARR2 serve de ancoragem para componentes da cascata MAPK ativando assim a ERK1/2. Ou seja, a redução na expressão das BARR2 causa redução na atividade dos AT1Rs e diminuição da ativação das cascatas de MAPK e ERK1/2 (SANNI et al., 2010; AHN et al., 2004).

Além dos mecanismos de ação nos vasos já citados anteriormente, que afetam diretamente a hipertrofia cardíaca, as BARRs também têm função de transdução de sinal para hipertrofia cardíaca através de mecanotransdução (SANTOS et al., 2017; RAKESH et al., 2010). O receptor AT1R tem um papel importante no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo aumento de carga, que pode ser independente de ANG II, como demonstrado no estudo de Yasuda et al., (2008), onde mesmo sem o envolvimento de ANG II, o estresse mecânico causado pelo aumento de carga induziu a hipertrofia cardíaca. Rakesh et al., (2010) demonstraram que através do estiramento mecânico dos cardiomiócitos, gerando sobrecarga hemodinâmica, a ativação do AT1R acontece mesmo na ausência de um ligante no GPCR, mediante a sinalização por BARRs.

FIGURA 1: Vias de sinalização pelos 7TMRs envolvendo as BARRs



LEGENDA: Ligação de um agonista no receptor acoplado a proteína G (GPCR), estimula o sistema de segundos mensageiros como o Cálcio (Ca^{2+}), Adenosina Monofosfato Cíclico (cAMP) e cascatas de sinalização como *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK). As beta-arrestinas (BARR) quando fosforiladas pelo GPCR-quinase (GPCK) iniciam a sinalização das cascatas MAPK e *extracellular regulated kinase* (ERK) através do receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) o qual tem efeitos importantes no sistema cardiovascular.

FONTE: Adaptado de Violin & Lefkowitz, 2007.

1.5 HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA

A hipertrofia cardíaca está relacionada ao aumento do tamanho e da massa cardíaca que ocorre em consequência à demanda hemodinâmica do coração, e consequente decorrente do aumento no tamanho das células do miocárdio. Isso resulta em maior volume das câmaras cardíacas e aumento da espessura da parede cardíaca (NYSTORIAK & BHATNAGAR, 2018; WILSON, ELLISON & CABLE, 2016). Sendo assim, pode-se dizer que a hipertrofia é processo no qual ocorre um remodelamento cardíaco devido à sobrecarga de volume e pressão. Existem duas formas de hipertrofia resultantes do exercício, que basicamente podem ser compreendidas como: a hipertrofia concêntrica que ocorre quando existe uma

sobrecarga de pressão causando aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo e; a hipertrofia excêntrica, que é decorrente de uma sobrecarga de volume causando o aumento nas dimensões da câmara ventricular (MÜLLER & DHALLA, 2013).

Sabe-se que existe uma similaridade entre a hipertrofia fisiológica e patológica, sendo ambos os tipos inicialmente provocados por um aumento da carga sobre os ventrículos. A sobrecarga gerada nos ventrículos pode acontecer de maneira natural em resposta a um estímulo fisiológico, gerando um aumento da massa cardíaca para normalizar o estresse nas paredes miocárdicas. Porém, durante o repouso, permite uma função cardiovascular normal, que é o caso da hipertrofia fisiológica cardíaca por esforço/exercício. No entanto, quando essa sobrecarga nas paredes ventriculares não é aliviada em repouso, devido anormalidades hemodinâmicas como é o caso de algumas situações patológicas crônicas, o coração hipertrofiado pode dilatar, a função contrátil diminuir e progredir, por exemplo, para a uma insuficiência cardíaca (VEGA et al., 2017; BERNARDO et al., 2010).

1.6 EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO

O exercício físico regular de intensidade moderado está associado à prevenção de doenças cardiovasculares e é utilizado para o tratamento para inúmeras doenças cardiovasculares e metabólicas, com reconhecido efeito benéfico na redução do risco cardiovascular (AGARWAL, 2012; ASCENSÃO, FERREIRA & MAGALHÃES, 2006). Além disso, alterações no metabolismo e sinalização tecidual que determinam hipertrofia cardíaca e modificações vasculares são resultantes, muitas vezes, de estímulos fisiológicos causados pelo treinamento físico. (NYSTORIAK & BHATNAGAR, 2018; FERNANDES et al., 2011). Melo e colaboradores (2017) demonstraram, que o treinamento físico de resistência pode aumentar a expressão de BARR2, consequentemente, com isso a ativação do AT1R pode exercer o estímulo cardíaco hipertrófico induzido pelo exercício.

Um condicionamento físico adequado induz alterações fisiológicas tão significativas nos sistemas cardiovascular, neurológico e endócrino que são capazes de prevenir, estabilizar e até regredir cardiopatias degenerativas. Porém, para um programa de condicionamento físico adequado, deve-se levar em consideração as

características individuais de cada paciente tais como idade, sexo e nível de aptidão física. (BENETTI, 1997).

Além disso, os benefícios cardiovasculares no exercício dependem também da frequência, intensidade e duração do exercício. Em indivíduos não adaptados, a atividade física é capaz de aumentar a pressão sanguínea, entretanto ao longo do tempo com a execução de exercícios físicos moderados e regulares percebe-se uma frequência cardíaca menor em repouso, assim como hipertrofia cardíaca fisiológica (NYSTORIAK & BHATNAGAR, 2018; WILSON, ELLISON & CABLE, 2016).

Considerando que protocolos de treinamentos forçados, como natação e corrida em esteira geram certa preocupação devido aos mecanismos indutores de hipertrofia não serem puramente fisiológicos (BERNARDO et al., 2010), um modelo alternativo de treinamento vem sendo empregado nos estudos, o exercício voluntário, onde os animais têm livre acesso as rodas de corrida e apresentam um aumento do trofismo cardíaco a partir de 3 a 4 semanas de treinamento, dependendo de algumas variáveis (VEGA et al., 2017; KONHILAS et al., 2015; KONHILAS et al., 2004).

JUSTIFICATIVA

Devido a necessidade de entendimento sobre o papel das BARR2 no sistema cardiovascular, relacionado ao escasso número de estudos sobre o exercício físico voluntário e sua capacidade de minimização do estresse gerado por protocolos de treinamento forçado, o presente estudo busca entender melhor o papel da BARR2 no sistema cardiovascular. O esclarecimento desse mecanismo se faz necessário, devido a importância que algumas drogas específicas usadas no tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares têm nesse contexto. Esses fármacos têm como alvo os AT1Rs, onde a BARR2 atua com importante função. Dessa maneira, o presente estudo busca esclarecer o papel fisiológico da BARR2 no mecanismo de hipertrofia cardíaca e na sinalização da vasomotilidade, podendo contribuir também para futuramente o desenvolvimento de fármacos com esse foco.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar alterações cardiovasculares induzidas em resposta ao exercício físico voluntário em camundongos nocaute para o gene da BARR2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o efeito do nocaute do gene de Beta Arrestina 2 na hipertrofia cardíaca nos diferentes sexos.
2. Observar a influência da Beta Arrestina 2 em parâmetros cardíacos por meio da análise funcional do coração.
3. Avaliar possíveis alterações de fosforilação de proteínas sarcoméricas e proteínas cardíacas reguladoras após a exercício físico voluntário associado ou não ao nocaute do gene da BARR2.
4. Avaliar a reatividade vascular em vasos mesentéricos após 6 semanas de exercício físico voluntário.

2.3 HIPÓTESES

- Camundongos com nocaute do gene da BARR2 têm atenuação da hipertrofia cardíaca fisiológica induzida por exercício físico voluntário comparado aos camundongos controles.

- Os vasos sanguíneos periféricos de animais com nocaute de beta arrestina 2 tem redução na capacidade de dilatação comparado aos animais controle.

3 MÉTODOS

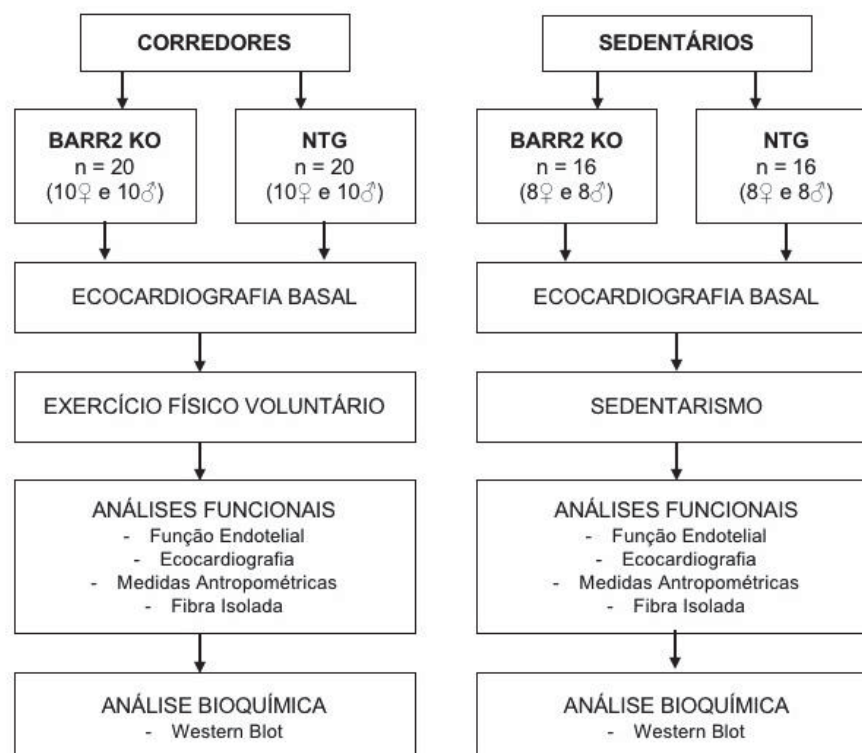
Os procedimentos descritos nessa sessão foram realizados de acordo com a legislação vigente sobre o uso de animais de laboratório em pesquisa publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (The Public Health Service Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals and The Animal Welfare Act) e foram previamente aprovados pelo comitê de ética para cuidados de animais em pesquisa da University of Illinois at Chicago (ANEXO I).

3.1 MODELO ANIMAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais utilizados no presente estudo foram animais nocautes para o gene da beta-arrestina 2 (BARR2KO) e controles sem alteração genética da linhagem FVB/N gerados nos laboratórios Charles River (Chicago, IL, EUA) e mantidos no biotério do College of Medicine Research Building – University of Illinois at Chicago, num ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração (RYBA et al., 2017).

A amostra foi composta de 72 camundongos, de ambos os sexos, com 12 semanas de idade. Animais nocaute e controle foram divididos em grupos que foram submetidos a exercício físico voluntário, denominado corredores, ou que não foram submetidos ao exercício, denominados sedentários. No grupo de corredores os animais tiveram acesso livre às rodas de corrida, durante as 6 semanas de protocolo, no entanto os animais que não apresentassem adaptação ao exercício, ou seja, que não corressem uma média de 5 km/dia, seriam excluídos do estudo (KONHILLAS et al., 2004). Contudo, não tivemos nenhum animal que não se adaptou ao exercício em nosso estudo. Os animais sedentários permaneceram nas caixas sem rodas de corridas, com as mesmas condições dos animais corredores. Os grupos foram denominados da seguinte maneira: Grupo Controle (NTG) sedentário (n=16); Grupo controle (NTG) corredor (n=20); Grupo nocaute (BARR2KO) sedentário (n=16) e Grupo nocaute (BAAR2KO) corredor (n=20). O delineamento experimental está sumarizado na FIGURA 2.

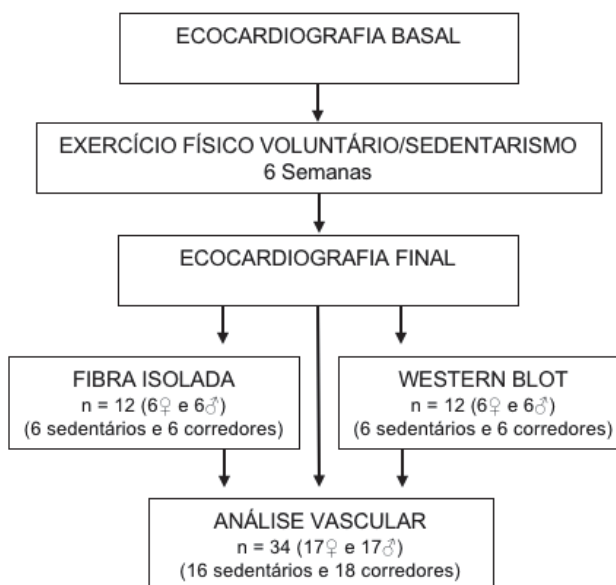
FIGURA 2: Delineamento experimental



FONTE: A autora (2020)

Inicialmente, os animais foram submetidos a ecocardiografia basal para análise de parâmetros cardíacos, em seguida foram alojados e mantidos durante toda a intervenção de 6 semanas em caixas individuais, com livre acesso à água e alimentação. Essas caixas também foram equipadas, nos grupos dos corredores, com rodas de atividade/corrida voluntária, segundo a metodologia usada por Konhilla e colaboradores (2004). Essas rodas de corrida transmitiam continuamente os registros da corrida por Wifi, que foram analisados semanalmente. A intervenção por exercício voluntário teve a duração de 6 semanas. Após o tempo de intervenção, os animais passaram novamente por análise ecocardiográfica e foram direcionados para análises funcional *in vitro* e bioquímica, como descrito adiante. As análises funcionais realizadas foram: avaliação de fibras cardíacas isoladas, com objetivo de determinar a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio e; análise da reatividade em vasos mesentéricos. Foi ainda realizada a técnica de Western Blot com foco na expressão e fosforilação de proteínas constituintes dos miofilamentos e envolvidas no transporte de cálcio no cardiomiócito (FIGURA 3).

FIGURA 3: Diagrama das etapas experimentais.



FONTE: A autora (2020)

3.2 GENOTIPAGEM

Para a genotipagem dos camundongos BARR2 KO, foi extraído DNA genômico pela biópsia realizada da amostra caudal dos animais aos 21 dias de idade. Após a extração as amostras foram mantidas a -20°C para posterior análise. A genotipagem foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR – polymerase chain reaction) em termociclador utilizando olígonucleotídeos iniciadores (primers) específicos para a detecção de BARR2, método previamente descrito por Pena & Wolska (2004).

3.2.1 Extração de DNA

Um kit comercial (RED Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit, SIGMA, Saint Louis, MO, USA) foi utilizado para extração de DNA. As amostras coletadas que foram mantidas congeladas foram colocadas em tubos plásticos de 0,5 mL e a estes foi adicionado 50 µL de solução de extração (Sigma #E7526) e 12,5 µL de solução de preparação tecidual (Sigma #T3073). As amostras foram mantidas nesta mistura por

10 minutos em temperatura ambiente e, após isso, 3 minutos adicionais em 96 °C. Em seguida, adicionou-se 50 µL de solução neutralizante (Sigma #N3910).

3.2.2 Reação em cadeia da polimerase

Utilizou-se uma solução de mistura para PCR com a seguinte composição: REDEExtract-N Amp PCR Ready mix (5,0 µL), Primer (Mutant) para ARRB2-KO (0,25 µL), Primer (Wild Type) para ARRB2-WT (0,25 µL), Primer (Common) para ARRB2-Common (0,50 µL), extrato de DNA (1 µL), ddH₂O 3 µL.

ARRB2 - Utilizou-se um ciclo de desnaturação de 2 minutos em 94°C, seguido de 10 ciclos compostos de desnaturação em 94°C de 20 segundos, anelamento em 65°C de 15 segundos e extensão em 68°C de 10 segundos. Uma nova rodada de 28 ciclos compostos de desnaturação em 94°C, anelamento em 60°C de 45 segundos e extensão em 72°C de 10 segundos. Um ciclo de extensão final em 72°C de 1 minuto e resfriamento final em 4°C por uma hora. Os iniciadores utilizados apresentam a seguinte sequência:

PRIMERS (20 uM)

Wild Type (10126): 5' GAT CAA AGC CCT CGA TGA TC 3'

Common (10127): 5' ACA GGG TCC ACT TTG TCC A 3'

Mutant (10128): 5'GCT AAA GCG CAT GCT CCA GA 3'

3.3 CORRIDA VOLUNTÁRIA

A atividade física espontânea foi mensurada por número de rotações executadas pelos animais nas rodas de atividade acopladas as gaiolas durante o período de 24 horas ao longo de 6 semanas. Os dados foram transmitidos instantaneamente via Wi-Fi para um programa desenvolvido pelos alunos de mestrado e doutorado do laboratório (UIC Physical Therapy Laboratory) parceiro do

Departamento de Fisioterapia da University of Illinois at Chicago, utilizado para os cálculos necessários (ROBINSON et al., 2017). Esses dados foram coletados a cada 48 horas, onde uma breve análise era realizada para observar o funcionamento correto dos equipamentos. Foram quantificadas as variáveis de distância percorrida, em metros, a cada 24 horas.

3.4 ECOCARDIOGRAFIA

Os animais foram anestesiados durante todo o procedimento por via inalatória, com o uso de Isoflurano (1% de Isoflurano em 100% de oxigênio) por meio de máscara facial. O nível adequado de anestesia foi determinado a partir da observação de padrão respiratório e reflexo de pinçamento da pata traseira e, havendo qualquer resposta, a dose era aumentada a fim de proteger o animal de estímulos dolorosos. A temperatura corporal foi mantida em 37°C mediante o posicionamento dos animais, durante todo o teste, sobre uma plataforma aquecida. A ecocardiografia transtorácica foi realizada em todos os animais em dois momentos. Inicialmente, no momento descrito como basal, com 12 semanas de vida, previamente à exposição ao exercício físico ou sedentarismo; e após as 6 semanas de exercício físico voluntário, sendo realizada a avaliação dos mesmos parâmetros nos dois momentos. As imagens foram obtidas com um transdutor Linear Array MS550D para aquisição de imagens em tempo real com centro de frequência de 40 MHz acoplado a um sistema de aquisição de imagens *VEVO 2100* de alta resolução (VisualSonics), utilizando protocolos previamente descritos por Rajan et al., 2010 e Gaffin et al., 2011. Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo ecocardiografista com cegamento dos grupos.

A avaliação morfológica foi realizada através do modo M anatômico (AM) para a obtenção das dimensões intracavitárias do ventrículo esquerdo (VE) e átrio esquerdo (AE) com o eixo longo paraesternal esquerdo. Com o eixo curto paraesternal ao nível dos músculos papilares, foi possível mensurar a dimensão interna do ventrículo esquerdo - *left ventricle internal diameter* (LVID), estimar a massa do ventrículo esquerdo - *left ventricle* (LV mass) e espessura relativa da parede livre do VE.

O Doppler pulsado com o volume da amostra localizado no centro do orifício

mitral e distalmente às suas cúspides foi realizado para avaliação da função diastólica do VE. Com essa técnica foi possível mensurar três parâmetros: 1) Razão E/A = relação entre os picos de velocidades de fluxo transmitral durante a fase de enchimento diastólico precoce (onda E) e durante a contração atrial (onda A); 2) Tempo de desaceleração da onda E (TD), que foi obtido entre o pico da onda E a linha de base e 3) Tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (TRIV), que foi medido desde o fechamento da válvula aórtica até a abertura da válvula mitral. Informações adicionais da função diastólica foram obtidas com as imagens do Doppler Tecidual (TDI), como o pico de velocidade na diástole inicial/precoce (Em) e tardia relacionado à contração atrial (Am) e o pico de velocidade sistólico (Sm) (ALVES *et al.*, 2014).

A função sistólica foi mensurada por fração de ejeção (EF), fração de encurtamento percentual (EP) do VE (*Fraction of Shortening* - FS) e velocidade média do encurtamento circunferencial (Vcf). Todas as medidas e análises foram calculados com a média de 3 ciclos consecutivos e realizados de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Lang *et al.*, 2005). A análise dos dados foi realizada com o software analítico Vevo 2100.

3.5 FIBRA MUSCULAR CARDÍACA ISOLADA

Para mensuração do desenvolvimento de força, foram obtidos feixes de fibras musculares cardíacas isoladas dos músculos papilares do VE. Inicialmente os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (80/20 mg/kg massa corporal) e após confirmação da anestesia, os corações foram rapidamente extraídos a partir de ressecção torácica e imediatamente colocados em uma solução a 4°C denominada de solução de alto relaxamento (HR) (10mmol/L EGTA, 6,57mmol/L MgCl₂, 41,89mmol/L KProp, 100mmol/L BES, 6,22mmol/L ATP, 10mmol/L Creatinine phosphate, 5mmol/L Na Azide, pH 7,0) contendo inibidores de proteases (2,5 µg/ml pepstatina A, 1µg/ml Leupeptina e 50 µmol/L PMSF). Os músculos papilares foram rapidamente dissecados em feixes de fibra de aproximadamente 150 µm de diâmetro e entre 4 e 5 mm de comprimento. As fibras foram desmembranadas por meio de exposição dos feixes a solução HR contendo 1% de Triton X-100 e 10 IU/ml de

creatinina quinase por 30 minutos em temperatura ambiente. As fibras isoladas foram então acopladas e coladas em uma das extremidades em um transdutor de força e na outra, em um posto fixo anexado a um micromanipulador responsável por controlar o comprimento e posição da fibra. Todo o procedimento foi realizado de maneira rápida e, em seguida, a fibra foi imersa numa solução HR com apenas 10 IU/ml de creatininaquinase. O comprimento do sarcômero foi determinado em 2,3 μm para todas as fibras pela técnica de difração de laser. A relação isométrica entre pCa e força foi determinada pela imersão da fibra isolada, sequencialmente, em soluções com crescentes concentrações de Ca^{+2} (pCa 7,0 a 4,5). Todas as soluções continham os inibidores de protease descritos acima. A relação entre força-pCa foi ajustada à equação de Hill, com regressão não linear para derivar o coeficiente de Hill e pCa. Deslocamentos foram posteriormente analisados, bem como a força máxima obtida pelas fibras.

3.6 WESTERN BLOT

A extração dos corações destinados às análises bioquímicas foi realizada após 6 semanas de intervenção. De maneira similar aos protocolos descritos acima os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (80/20 mg/kg massa corporal) e após confirmação do estado anestesiado, os corações foram rapidamente extraídos através de toracotomia e imediatamente congelados pela imersão em nitrogênio líquido e armazenados em temperatura de -80 graus Celsius. A preparação das amostras foi realizada de duas maneiras. A primeira homogeneização para isolamento das miofibrilas foi realizada com o uso de detergente Triton X-100 na solução de extração SRB (75mmol/L KCL, 10mM Imidazole pH 7,2, 2mmol/L MgCl_2 , 2mmol/L EGTA, 1mmol/L NaN_3). O Triton X-100 é responsável por retirar toda a camada membranosa dos feixes de fibra muscular. A segunda preparação foi realizada de maneira similar, mas sem o uso do detergente, apenas a solução SRB. Todas as soluções utilizadas nesse experimento continham os inibidores de proteases leupeptina (0.5 mg/L), pepstatina A (0.5 mg/L) e Caliculina (0.4mmol/L).

As proteínas foram separadas por eletroforese em géis na concentração de 12 e 15 % de Bis-Aliacrilamida (1:29) e transferidas para membradas de PVDF de 0,2

mm utilizando o equipamento PowerPac Universal Power Supply (BioRad Laboratories, USA). As membranas foram bloqueadas de ligações inespecíficas com leite desnatado (5 %) por uma hora em temperatura ambiente, em solução TBS (0,5 M tris-base, 2M NaCl, pH7,5, ajustado com HCl) (contendo 0,1 % Tween-20 (TBST). Então as membranas foram incubadas em TBST contendo leite desnatado a 5 % ou TBST contendo albumina bovina a 1% e adicionado dos seguintes anticorpos primários: PLN S16 (1:1000, MILLIPORE, 07-052), PLN T17 (1:2000, Badrilla, A010-13AP, Leeds, UK), Total PLN (1:2000, Badrilla, A010-4, Leeds, UK), Serca 2A (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), MLCV2 (1:2000, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY), cTnI (1:1000, Fitzgerald Industries Intl., Acton MA), cMyBP-C P-273 (1:500, gerado por Sakthivel Sadayappan, PhD), cMyBP-C P-282 (1:25000, gerado por Sakthivel Sadayappan, PhD), cMyBP-C P-302 (1:10000, gerado por Sakthivel Sadayappan, PhD) e cMyBP-C total (1:1500, gerado por Richard L. Moss, PhD). Após lavadas com TBST, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários de acordo com a origem do anticorpo primário. Novamente, as membranas foram lavadas em TBST e então expostas para obtenção das imagens das bandas imunoreativas, as quais foram detectadas pelo método de quimiluminescência com exposição ao reagente *Enhanced chemiluminescence* ECL (BioRad, USA). As bandas foram detectadas e escaneadas pelo sistema de imagem ChemiDoc (BioRad, USA), e em seguida analisadas utilizando o software de análise de imagens ImageLab. Beta-actina (Grupo Proteintech, 66009-1-Ig, Rosemont, IL, concentração 1:2000) e GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc-25776, Dallas, TX, concentração 1:4000) foram utilizados como controle interno para confirmação da quantidade de proteínas carregadas no gel, com intuito de assegurar que todas as amostras de um mesmo gel possuíam quantidades semelhantes de proteína total.

3.7 ANÁLISE DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E DO MÚSCULO LISO

Arteriolas mesentéricas foram dissecadas e canuladas em micropipetas de vidro, pressurizadas a 60 cmH₂O para estabilização durante 30 min e nutridas com solução de Krebs oxigenada e mantida a temperatura de 37 °C. Após estabilização, as arteriolas foram pré-contraídas com Endotelina-1 (100-200 pM). Em seguida, os

vasos foram expostos a dilatação por incremento de fluxo, induzindo a vasodilatação por aumento do gradiente de pressão (10, 20, 40, 60 e 100 cmH₂O), e após a estimulação, o calibre do vaso foi dilatado para o diâmetro basal com Papaverina (100 µM).

Após a avaliação basal, os vasos foram expostos à hipertensão intraluminal (~130 mmHg) durante 45 minutos. Em seguida, a vasodilatação mediada pelo fluxo foi avaliada novamente, imediatamente após a hipertensão.

Em um segundo momento foi avaliada a viabilidade do NO• e do H₂O₂ antes e após a hipertensão. Para a avaliação da viabilidade o NO• foi utilizado o bloqueador seletivo éster metílico de NG-nitro-L-arginina (L-NAME) (100 µM), 30 minutos antes da avaliação da vasodilatação mediada pelo fluxo, no momento basal, após a hipertensão e associado ao Losartan no momento após a hipertensão. Para a avaliação da viabilidade do H₂O₂ foi utilizado o Catalase-polietilenoglicol (PEG - Catalase) (50 U/l), por 30 minutos, antes da vasodilatação mediada pelo fluxo no momento basal e após a hipertensão

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, todos os dados passaram por teste de normalidade da amostra de Shapiro-Wilk, seguido por análise descritiva da amostra e índice de *kurtose* e *skewness*. Uma vez que passaram no teste de normalidade, os dados paramétricos foram apresentados como média ± desvio padrão ou erro da média. O programa utilizado para análise estatística foi o Prisma (versão 8.0), e assumiu-se o valor de $p < 0,05$ como significativo.

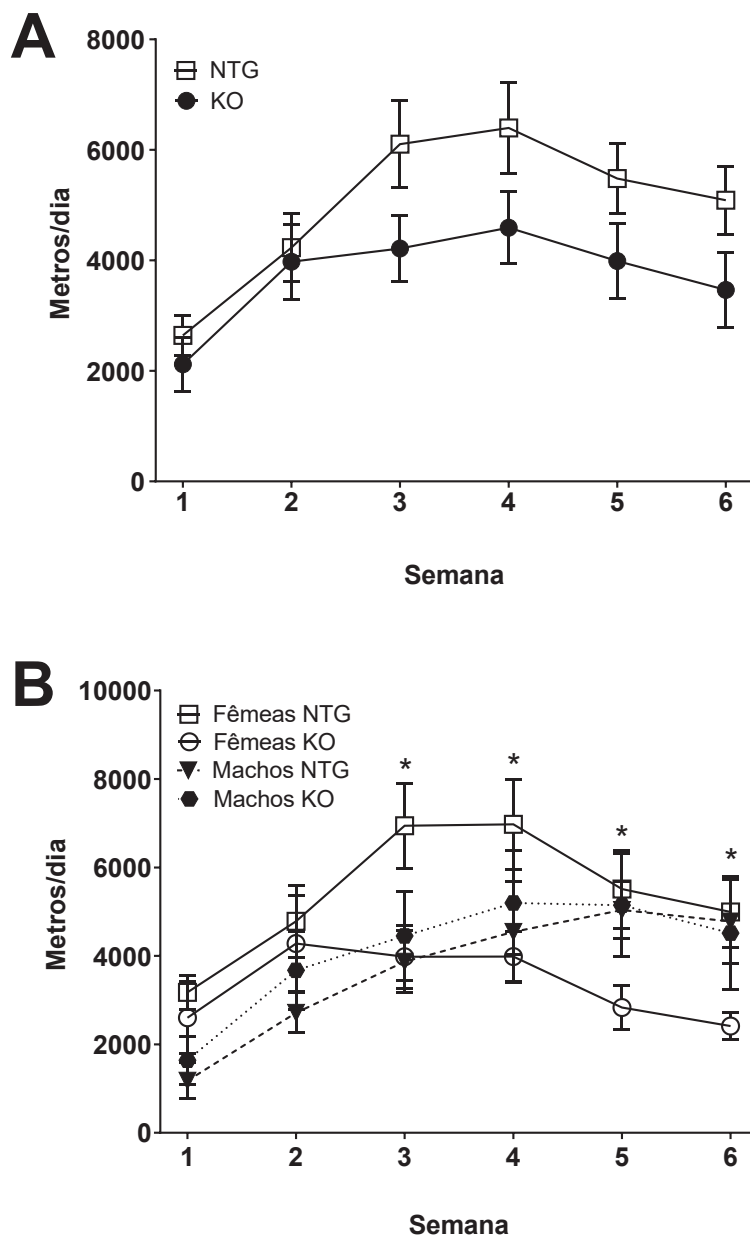
A fim de comparar as médias entre os grupos em relação aos fatores genótipo e exercício físico foi utilizado uma Análise de Variância (Two-Way ANOVA) independente do sexo, seguido de outra sub-análise *Two-Way Anova* para cada sexo, com pós teste de *Tukey* ou *Bonferroni* para múltiplas comparações. Considerou-se diferença entre os grupos quando o $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 A DISTÂNCIA PERCORRIDA É REDUZIDA EM FÊMEAS BAAR2 KO.

A análise dos dados obtidos pela corrida voluntária, demonstrou atividade predominante no período noturno, como apresentado na Figura 4. Foi observada similaridade durante as duas primeiras semanas de experimento onde os animais estavam, possivelmente, se adaptando ao instrumento. No entanto, a partir da terceira semana, observou-se diferença no traçado das curvas entre os dois grupos (FIGURA 4A). Contudo, essa diferença é estatisticamente significativa quando os animais foram separados por sexo (Figura 4B). Houve diminuição na distância percorrida pelas fêmeas BARR2 KO, iniciando na terceira semana e perdurando todo o período de intervenção quando comparada às fêmeas NTG ($p = 0,0001$ e $F = 20,89$), não sendo essa diferença observada nos machos ($p = 0,5016$ e $F = 0,4562$).

FIGURA 4: Média semanal da distância percorrida durante 6 semanas de corrida voluntária em camundongos.



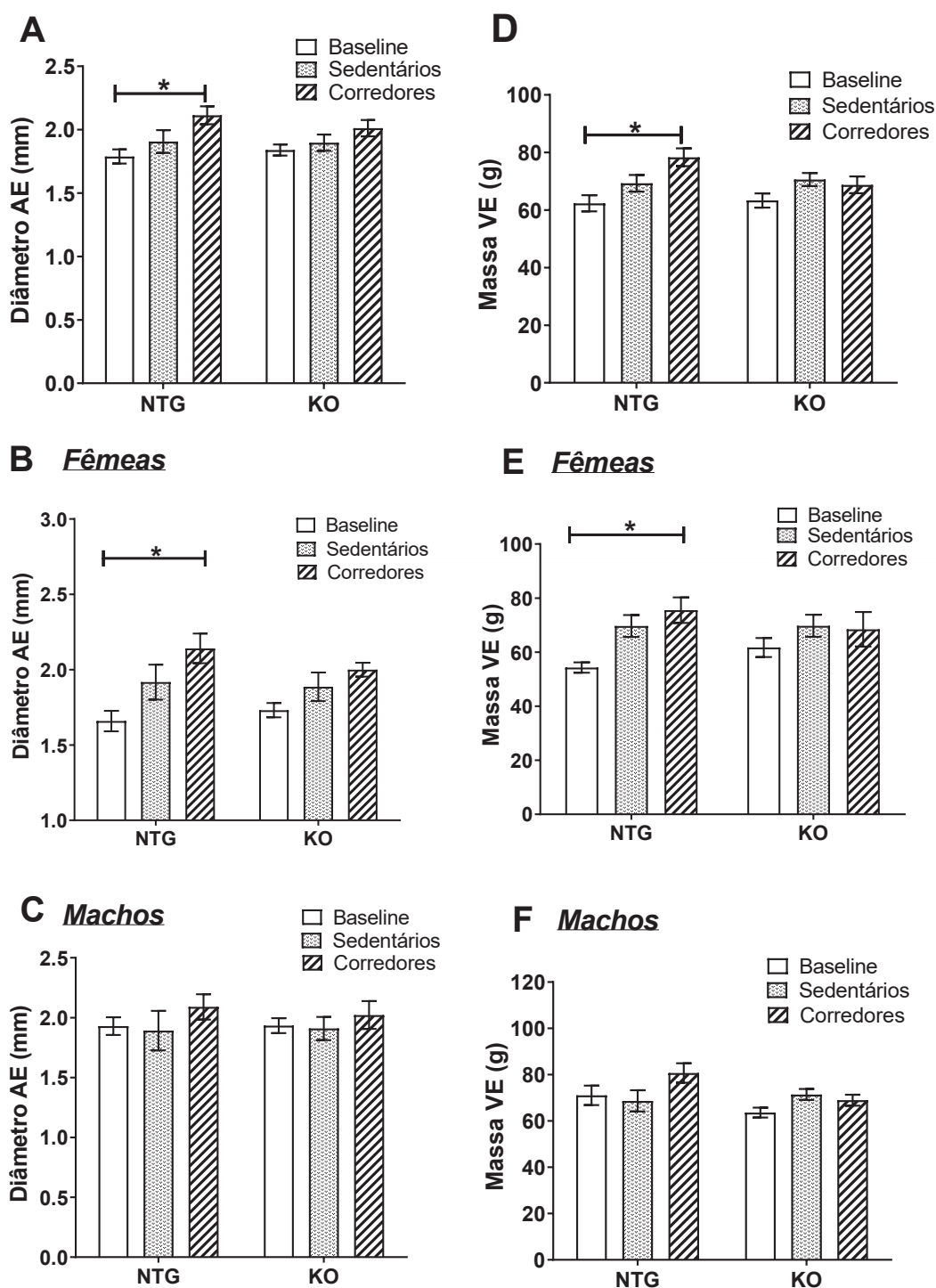
LEGENDA: (A) Comparação entre grupos NTG e KO. (B) Comparação entre NTG e KO separados por sexo. * Representa valor de $p < 0.05$ entre fêmeas NTG e KO na mesma semana. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

FONTE: A autora (2020).

4.2 FÊMEAS BARR2 KO APRESENTAM INCAPACIDADE DE DESENVOLVER HIPERTROFIA FISIOLÓGICA CARDÍACA POR EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO

Na análise da função cardíaca realizada no momento basal por ecocardiografia, não foi observada diferença nas medidas das câmaras e paredes cardíacas entre os grupos, demonstrando não haver efeito basal do nocaute de BARR2 nestes parâmetros ($P > 0,05$). Porém, ao final das seis semanas de atividade física voluntária pode-se observar diferença relacionada ao sexo nos parâmetros: diâmetro do átrio esquerdo (FIGURA 5A, $p = 0,0001$ e $F = 12,13$); massa do ventrículo esquerdo (FIGURA 5D, $p = 0,0007$ e $F = 8,674$) e diâmetro diastólico interno do ventrículo esquerdo (FIGURA 6A, $p = 0,0001$ e $F = 12,57$). Observou-se aumento destas variáveis nas fêmeas no grupo NTG, em comparação ao momento basal ($p < 0,05$), o que não foi observado nas fêmeas KO (FIGURA 5B, 5E e 6B, respectivamente). Não houve impacto significativo nestas medidas após o exercício em machos. Os valores das variáveis do ecocardiograma podem ser encontrados nas FIGURAS 5 e 6 e na TABELA 1.

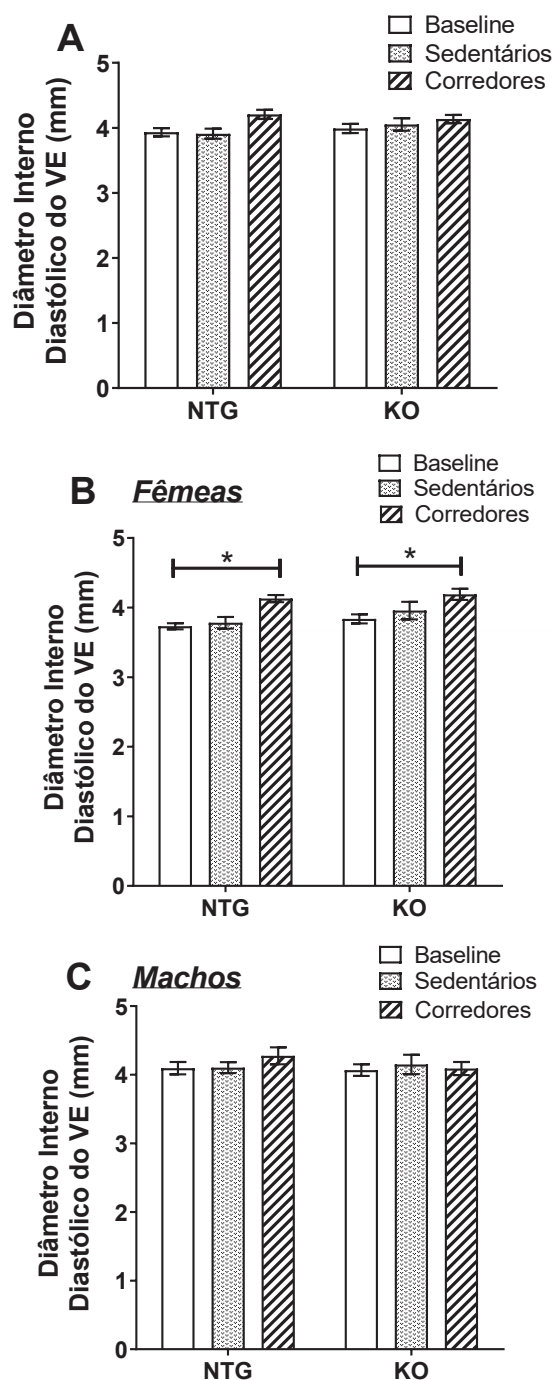
FIGURA 5: Avaliação ecocardiográfica do diâmetro do AE e massa de VE no momento basal e após 6 semanas de exercício voluntário.



LEGENDA: (A) Diâmetro do átrio esquerdo em ambos os sexos (mm), (B) diâmetro do átrio esquerdo nas fêmeas (mm), (C) (A) diâmetro do átrio esquerdo em machos (mm), (D) massa do ventrículo esquerdo em ambos os sexos (mg), (E) massa do ventrículo esquerdo em fêmeas (mg) e (F) massa do ventrículo esquerdo em machos (mg). * Simboliza valor de $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 6: Análise ecocardiográfica do diâmetro interno do ventrículo esquerdo no momento basal e após 6 semanas de exercício voluntário.



LEGENDA: (A) Diâmetro diastólico interno do ventrículo esquerdo em ambos os sexos (mm), (B) diâmetro diastólico interno do ventrículo esquerdo em fêmeas (mm) e (C) diâmetro diastólico interno do ventrículo esquerdo em machos (mm) * Representa valor de $p < 0.05$. Dados estão apresentados como média $\pm$ erro da média.

FONTE: A autora (2020).

Ainda em relação aos dados de ecocardiografia, pode-se observar diferença entre os grupos de fêmea no parâmetro velocidade média do encurtamento circunferencial (Vcf) onde as fêmeas NTG e KO exercitadas apresentaram diminuição dos valores em relação as fêmeas do grupo de sedentárias correspondente (TABELA 1, $p = 0,0001$ e $F = 15,78$). Já no parâmetro Pico de velocidade sistólico (Sm) houve diferença apenas entre as fêmeas NTG, onde as corredoras apresentaram diminuição dos valores quando comparadas ao grupo de fêmeas NTG sedentárias (TABELA 1, $p = 0,0075$ e $F = 5,497$).

Outro índice de medida de trofismo avaliado foi a razão massa do coração/comprimento da tíbia (FIGURA 7). Foi observado aumento deste índice nas fêmeas do grupo NTG corredoras em comparação ao grupo de fêmeas NTG sedentárias (FIGURA 7A, $p = 0,0120$ e $F = 4,182$). Não foi observada alteração neste mesmo índice em fêmeas KO. Não foram observadas alterações de trofismo medido pela razão massa do coração/comprimento da tíbia em machos, independente do genótipo (FIGURA 7B, $p = 0,1073$ e $F = 2,180$).

TABELA 1: Parâmetros ecocardiográficos em camundongos NTG e Beta arrestina KO após 6 semanas de corrida voluntária.

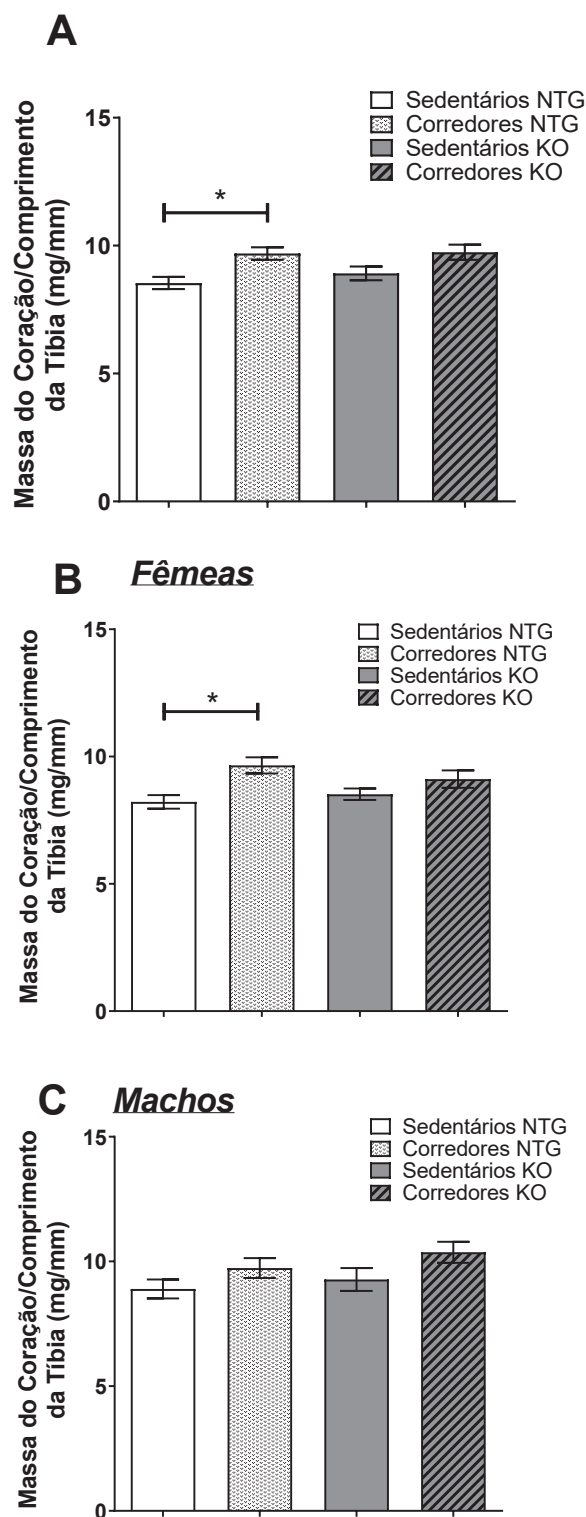
Parâmetro	Sedentários NTG		Sedentários KO		Corredores NTG		Corredores KO	
	M (n=5)	F (n=6)	M (n=6)	F (n=6)	M (n=7)	F (n=6)	M (n=6)	F (n=5)
<i>FE (%)</i>	63,07 ±4,10	71,28 ±2,97	62,40 ±2,12	70,01 ±1,37	58,93 ±2,59	59,39 ±3,92	59,89 ±2,72	62,43 ±2,41
<i>E/A</i>	1,84 ±0,38	1,86 ±0,33	1,96 ±0,20	1,69 ±0,12	1,96 ±0,23	2,21 ±0,17	1,65 ±0,14	2,44 ±0,24
<i>E/E</i>	34,70 ±4,92	28,12 ±1,74	30,41 ±2,65	25,18 ±1,54	33,62 ±1,18	28,23 ±1,93	28,71 ±1,94	28,95 ±3,50
<i>TRIV (ms)</i>	12,08 ±1,13	11,38 ±0,90	11,81 ±0,49	11,90 ±0,92	12,66 ±0,90	13,08 ±0,95	10,91 ±0,62	14,44 ±1,65
<i>TD (ms)</i>	24,24 ±1,40	16,51 ±1,68	20,97 ±1,44	18,15 ±2,80	27,78 ±1,05	19,51 ±1,86	20,78 ±2,09	19,11 ±1,16
<i>Vcf (circ/s)</i>	7,08 ±0,52	9,40 ±0,82	7,07 ±0,40	9,31 ±0,37	6,75 ±0,44	6,61 * ±0,47	7,07 ±0,40	6,12 * ±0,39
<i>Sm (cm/s)</i>	24,37 ±1,09	27,82 ±1,94	24,16 ±0,33	25,22 ±1,54	23,59 ±0,81	21,06* ±1,21	22,48 ±1,44	21,87 ±1,19

LEGENDA: Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média.

NTG, não transgênico; KO, nocaute; EF, Fração de Ejeção; E/A, razão entre diástole inicial/contração atrial; E/E ; TD, tempo de desaceleração; TRIV, tempo de relaxamento isovolumétrico; Vcf, velocidade média de encurtamento circunferencial; Sm, pico de velocidade sistólica; circ/s, circunferência por segundo; cm/s, centímetro por segundo; ms, milissegundos. * Representa valor de $p < 0,05$ na comparação entre as fêmeas do mesmo genótipo antes e após o exercício.

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 7: Razão entre massa do coração e comprimento da tíbia.

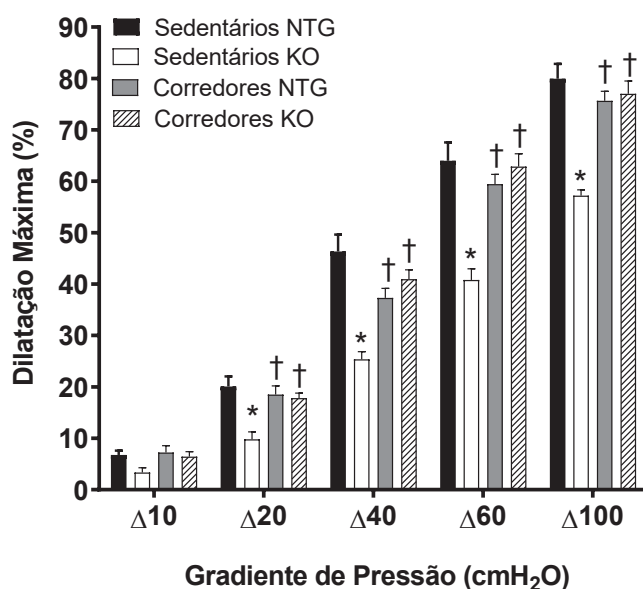


LEGENDA: (A) Ambos os sexos, (B) Fêmeas, (C) Machos. * Representa valor de $p < 0,05$ na comparação. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.
 FONTE: A autora (2020).

4.3 O EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO RECUPERA A CAPACIDADE DE DILATAÇÃO DOS VASOS PERIFÉRICOS EM ANIMAIS BARR2 KO

Foi inicialmente observada redução na dilatação fluxo-induzida (DFI) em arteríolas mesentéricas nos animais KO sedentários em relação aos animais NTG. Este efeito ocorreu a partir de delta 20 cmH₂O de pressão ($p = 0,0048$) e perdurou até 100 cmH₂O ($p = 0,0002$). Pode-se ainda observar que nos animais KO corredores houve recuperação da capacidade de dilatação dos vasos periféricos, que alcançou níveis semelhantes aos animais NTG, após o exercício voluntário (FIGURA 8). O número de animais observado em cada grupo está apresentado na TABELA 2.

FIGURA 8: A redução da Dilatação Fluxo-Induzida (DFI) em vasos mesentéricos isolados de camundongos BARR2 KO é recuperada após 6 semanas de exercício voluntário.

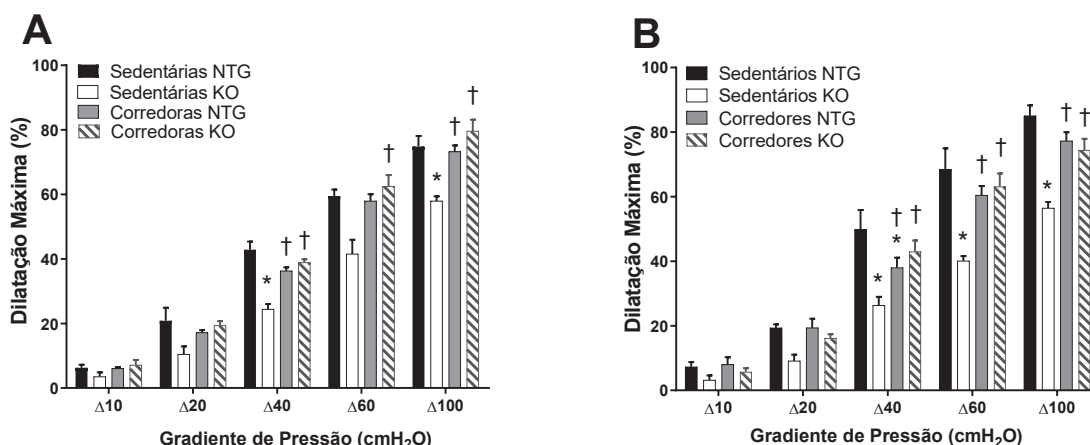


LEGENDA: Dilatação máxima dos vasos versus gradiente de pressão em cmH₂O em ambos os genótipos. * Representa valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo sedentários NTG; † Representa valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo sedentário KO. Dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

FONTE: A autora (2020).

No entanto, não foram encontradas diferenças além das previamente relatadas acima, relacionadas ao sexo dos animais, quando observado separadamente fêmeas de machos (FIGURA 9 A e B).

FIGURA 9: Diferenças na Dilatação Fluxo-Induzida (DFI) em vasos mesentéricos isolados de camundongos BARR2 KO e NTG.

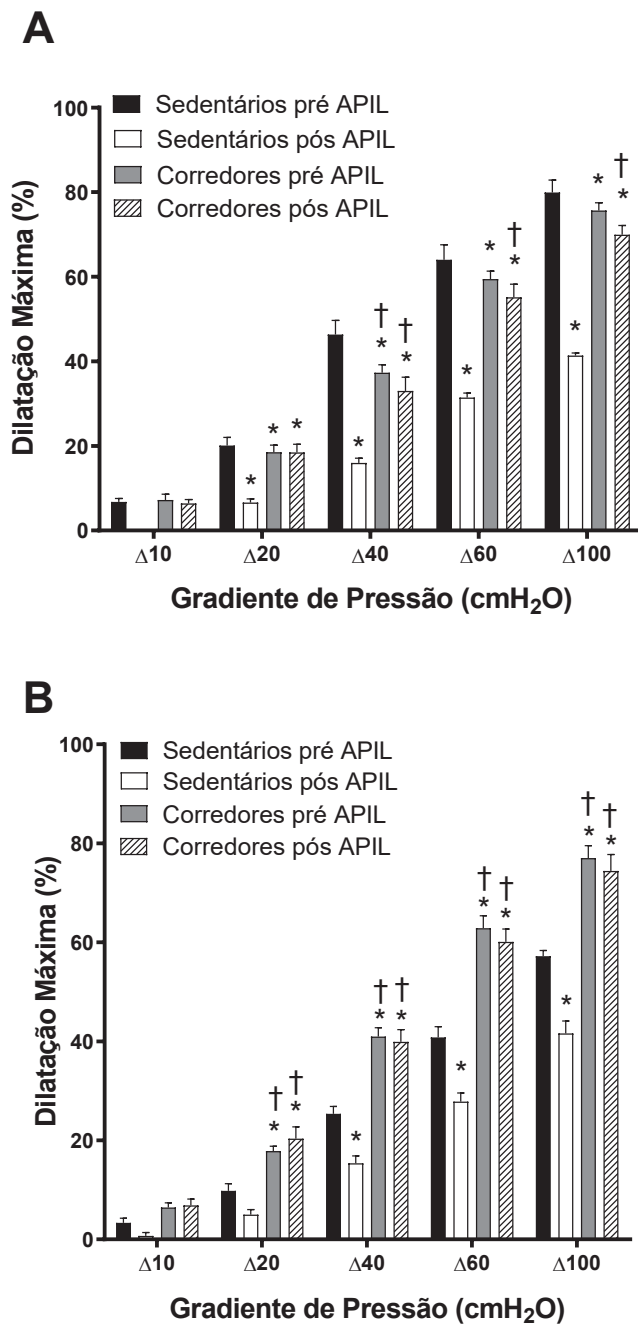


LEGENDA: (A) Dilatação máxima dos vasos versus gradiente de pressão em cmH₂O em fêmeas. (B) Dilatação máxima dos vasos versus gradiente de pressão em cmH₂O em machos. * Representa valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo sedentários NTG; † Representa valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo sedentário KO. Dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

FONTE: A autora (2020).

De maneira similar, quando expostos a alta pressão intraluminal (APIL) por 30 minutos, os vasos dos animais sedentários NTG apresentam dificuldade de dilatação quando recrutados desde 20 cmH₂O mantendo a deficiência na dilatação durante todo o experimento até 100 cmH₂O quando comparados aos vasos de animais sedentários sem exposição a APIL. De maneira oposta, os animais que realizaram o exercício físico voluntário recuperaram a capacidade de dilatação quando expostos a alta pressão, quando comparados aos corredores que não passaram por APIL (FIGURA 10 A, $p = 0,0238$ e $F = 5,289$). No grupo de animais BARR2 KO, mesmo os vasos na situação basal, sem nenhuma exposição a alta pressão, apresentam capacidade de dilatação diminuída em relação aos animais corredores na mesma situação. Quando expostos a APIL, os vasos dos animais KO sedentários são ainda mais afetados na capacidade de dilatação, com valores que representam aproximadamente metade dos valores dos animais corredores também expostos a alta pressão (FIGURA 10 B, $p = 0,0001$ e $F = 309,5$).

FIGURA 10: Diferenças na Dilatação Fluxo-Induzida (DFI) em vasos mesentéricos isolados de camundongos BARR2 KO e NTG pós alta pressão intraluminal (APIL).



LEGENDA: (A) Dilatação máxima dos vasos versus gradiente de pressão em cmH₂O após alta pressão intraluminal em NTG. (B) Dilatação máxima dos vasos versus gradiente de pressão em cmH₂O após alta pressão intraluminal em KO. * Representa valor de $p < 0,05$ quando comparado ao grupo de sedentários pré APIL; † representa valor de $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sedentários pós APIL. Dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

FONTE: A autora (2020).

A fim de observar o papel de diferentes vias de ativação do Óxido Nítrico (NO) na DFI das arteríolas, observamos a resposta dos vasos aos compostos L-Name e PEG-Catalase (TABELA 2). De maneira similar ao que apresentamos anteriormente, os animais sedentários KO têm capacidade de dilatação reduzida em relação aos sedentários NTG. Não houve diferença após o uso de L-NAME entre os grupos. No entanto, com o uso de PEG-Catalase, a DFI é reduzida nos animais sedentários KO comparado aos sedentários NTG na mesma situação. Além disso, a PEG-Catalase foi capaz de reduzir a DFI apenas nos animais BARR2KO.

TABELA 2: Dilatação fluxo-induzida (DFI) após a exposição a L-Name e PEG-Catalase em animais ARRB2 KO e NTG após 6 semanas de exercício físico voluntário.

Sedentários	Baseline		L-Name		PEG-Catalase	
	NTG (n=8)	KO (n=8)	NTG (n=8)	KO (n=8)	NTG (n=8)	KO (n=8)
Δ10	6,76 ±0,82	3,35 ±0,93	0,34 ±0,17	2,61 ±0,77	5,30 ±0,76	0,75 ±0,75
Δ20	20,09 ±1,94	9,80 ^a ±1,46	8,59 ^d ±0,73	8,50 ±1,07	16,98 ±1,96	6,29 ^c ±2,50
Δ40	46,33 ±3,32	25,38 ^a ±1,47	18,47 ^d ±0,88	17,05 ±1,55	33,96 ^{ef} ±2,32	15,56 ^c ±3,25
Δ60	63,99 ±3,57	40,81 ^a ±2,16	34,13 ^d ±1,50	26,58 ^d ±2,30	48,16 ^{ef} ±2,41	24,65 ^{ce} ±3,15
Δ100	79,94 ±2,89	57,20 ^a ±1,51	45,66 ^d ±3,05	38,66 ^d ±1,65	63,89 ^{ef} ±2,04	37,21 ^{ce} ±3,42
Corredores	NTG (n=9)	KO (n= 9)	NTG (n=9)	KO (n= 9)	NTG (n=9)	KO (n= 9)
Δ10	6,64 ±1,37	6,73 ±1,01	0,61 ±0,46	2,35 ±1,71	3,94 ±0,84	4,42 ±1,05
Δ20	18,49 ±1,87	17,58 ±1,05	8,72 ^d ±1,55	8,51 ^d ±2,11	10,90 ±1,62	13,88 ±1,85
Δ40	37,85 ±1,97	40,44 ±1,94	18,08 ^d ±1,60	18,29 ^d ±2,69	22,27 ^e ±2,63	25,36 ±1,49
Δ60	60,37 ±1,82	63,21 ±2,76	30,40 ^d ±3,23	29,84 ^d ±3,03	36,80 ^e ±2,60	41,94 ^{ef} ±2,41
Δ100	78,82 ±1,58	77,81 ±2,65	47,47 ^d ±3,61	44,99 ^d ±3,28	55,77 ^e ±3,27	56,38 ^{ef} ±2,46

LEGENDA: a – representa valor de $p < 0,05$ quando comparado NTG e KO pré-exposição a L-Name ou PEG-Catalase; b - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado NTG e KO pós uso de L-Name; c - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado NTG e KO pós uso de PEG-Catalase; d - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado os valores pré e pós uso de L-Name no mesmo grupo; e - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado os valores pré e pós uso de PEG-Catalase no mesmo grupo; f - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado os valores no mesmo grupo comparando o uso de L-Name e PEG-Catalase.

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média.

FONTE: A autora (2020).

Os vasos mesentéricos dos animais sedentários e NTG de ambos os grupos, foram por fim testados quanto a sua capacidade de dilatação após a exposição aos compostos L-name e PEG-Catalase e pós-estresse por APIL (TABELA 3). Nesse contexto não foi possível observar diferenças entre os grupos KO e NTG pós APIL no momento basal, nem após a exposição ao L-NAME e PEG-Catalase (TABELA 3) ou seja, o efeito se manteve igual, independente da APIL.

TABELA 3: Dilatação Fluxo-Induzida (DFI) após Alta Pressão Intraluminal (APIL) e exposição a L-Name e PEG-Catalase em artérias mesentéricas de animais BARR2 KO e NTG após exercício físico voluntário por 6 semanas.

	Baseline (pós APIL)		L-Name (pós APIL)		PEG-Catalase (pós APIL)	
Sedentários	NTG (n=8)	KO (n=7)	NTG (n=8)	KO (n=7)	NTG (n=8)	KO (n=7)
$\Delta 10$	0.24 ± 0.18	0.79 ± 0.79	0	0	0	0
$\Delta 20$	6.61 ± 0.88	5.17 ± 1.17	7.59 ± 1.00	5.14 ± 0.66	4.27 ± 1.32	2.44 ± 1.03
$\Delta 40$	16.03 ± 1.09	15.54 ± 1.73	16.15 ± 2.10	11.91 ± 1.37	11.90 ± 1.74	11.00 ± 1.91
$\Delta 60$	31.71 ± 1.01	27.01 ^a ± 1.77	29.54 ± 1.45	21.39 ^b ± 2.22	21.88 ^e ± 1.77	17.89 ^e ± 2.79
$\Delta 100$	41.30 ± 0.58	40.70 ^a ± 2.75	36.06 ± 1.79	30.79 ^b ± 0.92	32.31 ^e ± 1.59	26.01 ^e ± 4.06
Corredores	NTG (n=9)	KO (n=9)	NTG (n=9)	KO (n=9)	NTG (n=9)	KO (n=9)
$\Delta 10$	6.76 ± 0.95	7.12 ± 1.42	2.36 ± 0.59	1.84 ± 0.64	0	0
$\Delta 20$	19.09 ± 2.06	21.26 ± 2.47	11.07 ± 0.84	10.61 ± 1.09	6.73 ± 0.65	6.29 ± 0.40
$\Delta 40$	35.58 ± 2.58	39.86 ± 2.77	21.87 ^d ± 1.97	22.31 ^d ± 1.51	11.63 ^{ef} ± 0.91	14.31 ^e ± 1.52
$\Delta 60$	57.66 ± 2.08	60.86 ± 2.79	33.99 ^d ± 3.48	37.81 ^d ± 2.67	22.56 ^{ef} ± 1.36	22.58 ^{ef} ± 1.49
$\Delta 100$	72.39 ± 1.35	75.86 ± 3.33	53.47 ^d ± 3.57	52.70 ^d ± 2.16	35.33 ^{ef} ± 1.75	31.59 ^{ef} ± 2.40

LEGENDA: a – representa valor de $p < 0,05$ quando comparado NTG e KO pré-exposição a L-Name ou PEG-Catalase; b - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado NTG e KO pós uso de L-Name; c - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado NTG e KO pós uso de PEG-Catalase; d - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado os valores pré e pós uso de L-Name no mesmo grupo; e - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado os valores pré e pós uso de PEG-Catalase no mesmo grupo; f - representa valor de $p < 0,05$ quando comparado os valores no mesmo grupo comparando o uso de L-Name e PEG-Catalase.

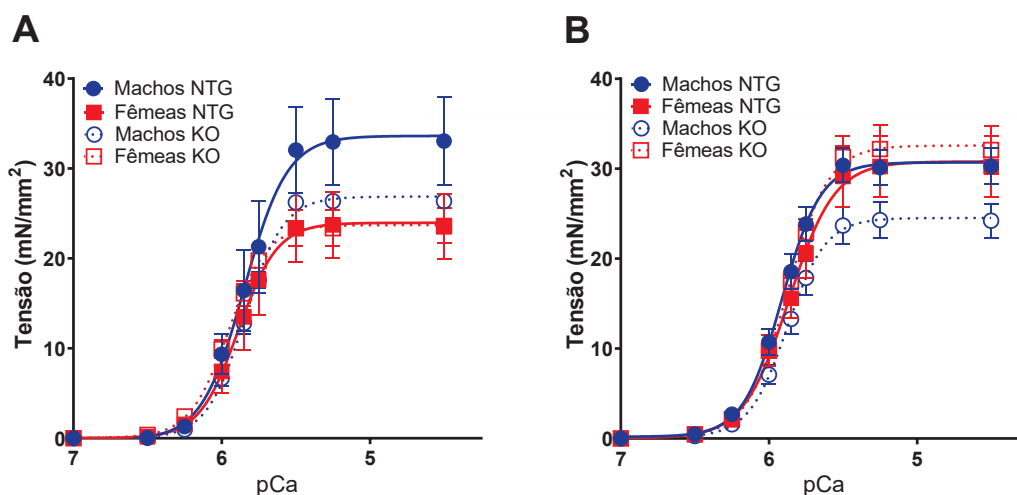
Dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

FONTE: A autora (2020).

4.4 A FORÇA DESENVOLVIDA E RESPONSIVIDADE DO MIOFILAMENTO AO CÁLCIO NÃO É ALTERADA COM O EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO

A fim de entender as mudanças biofísicas do sarcômero em resposta ao exercício voluntário, foi avaliada a geração de tensão e a sensibilidade ao cálcio em fibra cardíaca isolada. No entanto, não houve diferença na sensibilidade ao cálcio em diferentes comprimentos de sarcômero, assim como, não foi observada diferença significativa na inclinação das curvas na relação força-pCa em animais corredores (FIGURA 11 A) ou em animais sedentários (FIGURA 11 B) (APÊNDICE 6).

FIGURA 11: Efeitos do exercício voluntário na relação Força- Ca^{+2} em animais NTG e BARR2 KO.

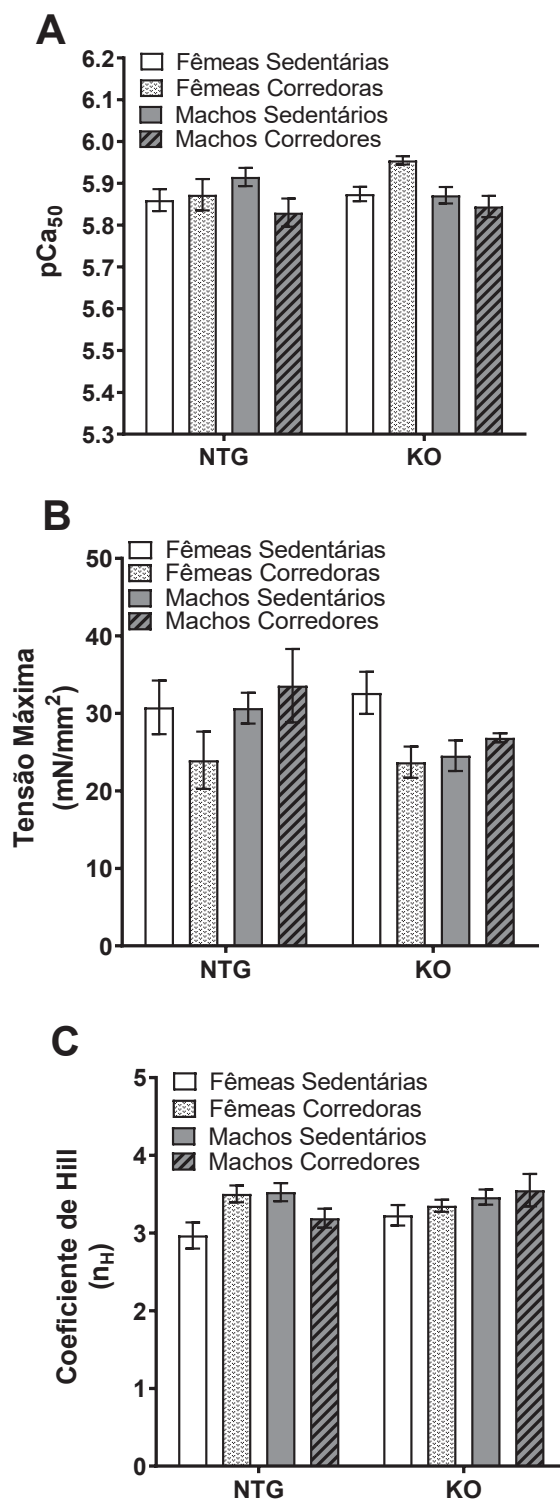


LEGENDA: (A) Relação Força- Ca^{+2} em fibras isoladas de camundongos corredores. (B) Relação Força- Ca^{+2} em fibras isoladas de animais sedentários. Dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

FONTE: A autora (2020).

Não foi encontrada diferença significativa na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (pCa_{50}) ou no coeficiente de Hill, que está relacionado à cooperatividade da ligação dos miofilamentos. Também não houve diferença na tensão máxima desenvolvida pelos miofilamentos quando se comparou ambos os sexos, nem quando considerado o exercício físico (FIGURA 12).

FIGURA 12: Efeitos do exercício voluntário na sensibilidade ao cálcio e na geração de força em miofilamentos provenientes de camundongos NTG e KO.



LEGENDA: (A) pCa_{50} ; (B) tensão máxima desenvolvida em fibras isoladas; (C) cooperatividade de tensão (Coeficiente de Hill) em fibras isoladas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

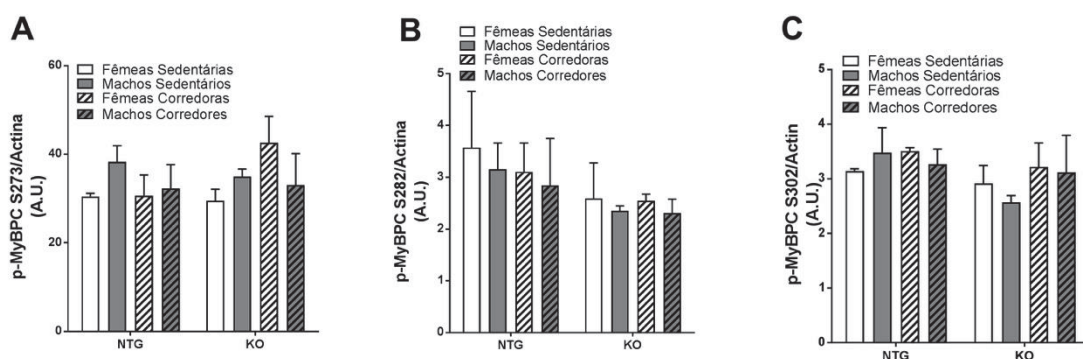
FONTE: A autora (2020).

4.5 A FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS SARCOMÉRICAS E REGULATÓRIAS NÃO É ALTERADA COM O EXERCÍCIO FÍSICO VOLUNTÁRIO

pela expressão total da proteína. (D) Western blot para identificação de sítios fosfo-específicos (Ser 23/24) para Troponina I (cTnI) cardíaca e representação gráfica da fosforilação normalizada pela expressão total da proteína. Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. FONTE: A Autora (2020).

Ainda utilizando amostras obtidas da preparação de miofilamento, foi avaliada a ativação dos 3 sítios de Proteína C de ligação à Miosina (*Myosin Binding protein C* - MyBPC) 273 (FIGURA 14 A), 282 (FIGURA 14 B) e 302 (FIGURA 14 C), os quais não apresentaram nenhuma diferença estatística na fosforilação.

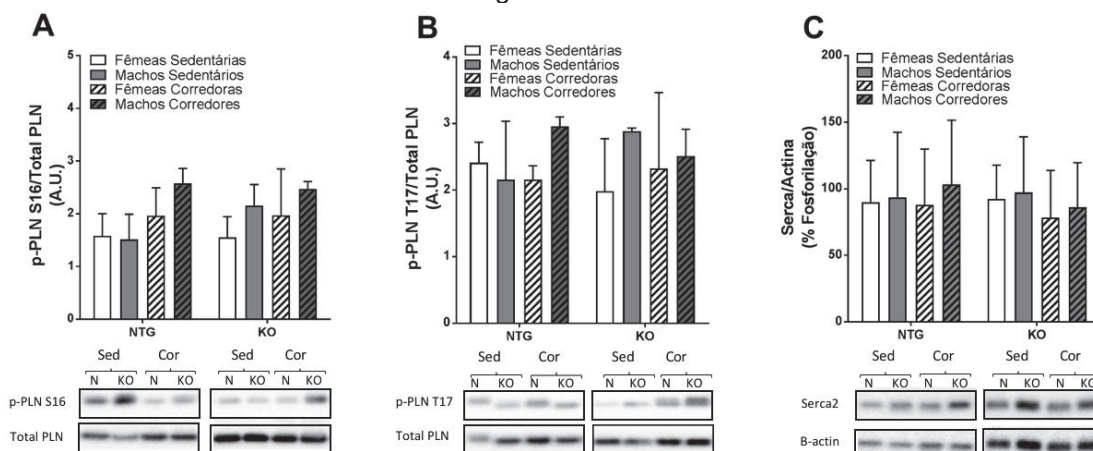
FIGURA 14: Fosforilação de sítios específicos de Proteína C de ligação à Miosina em amostras de camundongos NTG e BARR2 KO.



LEGENDA: (A) Representação gráfica da quantificação da fosforilação do sítio S273, (B) do sítio S282 e (C) do sítio S302. Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. FONTE: A autora (2020).

Por fim, foram analisadas as proteínas envolvidas com o transporte de íons cálcio no miocárdio, Fosfolamabano e SERCA. De maneira similar aos dados prévios, não houve diferença significativa entre os animais BARR2 KO e NTG, nem mesmo após o exercício voluntário (FIGURA 15).

FIGURA 15: Fosforilação de Fosfolambano e expressão total de SERCA e Fosfolambano no miocárdio de camundongos NTG e ARRB2 KO.



LEGENDA: (A) Western blot para avaliação da fosforilação de Fosfolambano (PLN) na Ser16 normalizada pela expressão total da proteína. (B) Western blot para avaliação da fosforilação de Fosfolambano na Thr17 normalizada pela expressão total da proteína. (C) Western blot para avaliação da expressão de SERCA 2 normalizado pela expressão de beta-actina. Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

FONTE: A autora (2020)

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, fêmeas nocaute para a proteína BARR2 apresentaram limitação do exercício voluntário e atenuação da hipertrofia cardíaca fisiológica quando comparadas às fêmeas NTG. Este efeito não foi identificado em machos. Adicionalmente, nossos achados demonstraram de maneira inédita o papel da sinalização por beta-arrestina 2 na dilatação induzida por fluxo em vasos periféricos e o papel do exercício físico na prevenção ou reversão da redução da dilatação induzida por fluxo apresentado por animais nocaute para BARR2.

O nocaute de BARR2 está associada à redução do exercício voluntário em fêmeas.

Ao longo das semanas de exercício voluntário, pode-se observar aumento da quantidade de exercício realizada por fêmeas controle (semanas 3 e 4), contudo não

houve aumento significativo nas fêmeas nocaute. Adicionalmente, a quantidade de exercício realizado foi significativamente menor em fêmeas nocaute da terceira à sexta semana quando comparadas às não-transgênicas.

O fato de apenas fêmeas (controles) apresentarem um aumento significativo da quantidade de exercício, considerando que machos não apresentam a mesma performance também foi descrito por outros autores. Vários autores encontraram o sexo como fator determinante durante a performance do exercício, seja ele voluntário ou forçado (MANZANARES et al., 2019; REGITZ-ZAGROSEK et al., 2013; FORYST-LUDWIG et al., 2011; KONHILAS et al., 2004). Em relação ao exercício voluntário, De Bono e colaboradores (2006), utilizando rodas de corrida anguladas durante cinco semanas em camundongos não transgênicos do background C57BL/6 de ambos os sexos obtiveram dados similares aos encontrados no presente estudo. O tempo gasto correndo aumentou rapidamente nos primeiros dias e as fêmeas atingiram um platô de treinamento entre os dias 5-6. Já os machos levaram mais tempo de corrida e não atingiram um platô até o dia 14-16. Em relação à distância percorrida, as fêmeas percorreram uma metragem 40% superior aos machos.

Konhilas e colaboradores (2004) realizaram protocolo de corrida voluntária e corrida forçada em camundongos C57BL/6J durante 7, 10 e 21 dias. Como resultado da corrida voluntária, descreveram maior duração e distância percorrida por fêmeas C57BL/6J quando comparadas a machos do mesmo genótipo. Em busca de comparar o efeito estressor da corrida forçada em esteiras, os autores obtiveram, de maneira similar, melhor performance em fêmeas. O grupo de pesquisadores ainda quis avaliar se o genótipo era o que poderia levar a disparidade entre os sexos e, então, avaliaram camundongos FVB/NJ, linhagem similar ao deste estudo. Em ambos os protocolos de exercícios e, surpreendentemente, apesar do aumento da duração de exercício em ambos os sexos, houve maior performance em fêmeas comparas aos machos do mesmo grupo.

Em abordagem diferente da citada acima, em exercício forçado em esteiras, Foryst-Ludwig e colaboradores (2011) avaliaram camundongos C57BL/6J após protocolo de corrida em esteira durante 4 semanas. As fêmeas corredoras apresentaram valores maiores de distância percorrida se comparado aos dos machos quando normalizados pela massa magra em gramas. Reportando que mesmo em protocolos diferentes, exercício voluntário ou forçado, existe um padrão similar onde as fêmeas percorrem distâncias maiores que machos.

Purohit e colaboradores (2020), embora utilizando outros roedores, ratos Wistar, descreveram uma interação interessante entre sexo, exercício e idade. Ratos de ambos os sexos que realizaram exercício voluntário a partir da adolescência percorreram a mesma distância, enquanto quando o exercício era iniciado na fase adulta, as fêmeas corriam mais que os machos.

Vasta parte da literatura relacionada a atividade física em animais dos últimos anos sugere que esta pode ser governada por fatores biológicos como, por exemplo, fatores hormonais (LIGHTFOOT, 2008). Gorzek e colaboradores (2007), observaram que camundongos fêmeas são voluntariamente menos ativas após a perda dos hormônios ovarianos, no entanto esses mesmos animais hormônio-deficientes após receberem o agente estrogênico (estradiol) retornam a níveis normais de atividade física rapidamente, demonstrando o impacto direto do estrógeno na atividade física voluntária. Outro hormônio de extrema importância é a testosterona, Roy e Wade (1975) demonstraram que a administração de diversas doses de testosterona em ratos machos castrados, aumentou significativamente a corrida voluntária nesses animais. Esses são alguns estudos que demonstram a relação entre os hormônios e a atividade física voluntária de roedores.

Com base nestes estudos citados, podemos deduzir que naturalmente é de se esperar que as fêmeas apresentem melhor desempenho na corrida que machos. De fato, foi o observado nas fêmeas controle. Assim, podemos deduzir que o nocaute do gene para BARR2 está relacionado à diminuição do desejo voluntário ao exercício em fêmeas. Pode-se assim especular o mecanismo da interação entre fatores hormonais, exercício e BARR2 nestes animais. O mecanismo dessa regulação parece ser mediado via receptor de estrógeno alfa (α) para fêmeas, que requer a aromatização da testosterona para estrogênio em machos. Pouca literatura existe para explicar o mecanismo que leva a ativação do receptor de estrogênio- α após aumento da atividade física, no entanto sugere-se que alterações no sistema dopaminérgico bem como possíveis ações não-genômicas do estrógeno possam estar envolvidas (LIGHTFOOT, 2008).

A relação entre o mecanismo que leva a uma maior atividade física em fêmeas do que em machos, citado anteriormente, com a diminuição da distância percorrida nas fêmeas BARR2KO apresentadas no presente estudo, pode estar relacionada com a propriedade da BARR2 de participar da internalização dos GPCRs. O estradiol regula

o receptor de estrogênio- α através de mecanismos de sinalização mediada e internalização do receptor (Wong et al., 2015). A internalização é importante para imediata redução dos receptores na superfície celular o que leva a cessação da sinalização ou reciclagem dos receptores para nova estimulação. Nesse contexto, a BARR tem papel importante na sinalização iniciada pela membrana bem como internalização dos receptores de estrogênio- α de membrana, fazendo a *downregulation* desses receptores (Wong et al., 2015; Dominguez et al., 2009). Sendo assim, supõe-se que o nocaute da BARR2 está associado a disfunção da regulação dos receptores de ER α , quando o seu nocaute diminuiria a capacidade de atividade física voluntária nas fêmeas, pela redução da reciclagem dos receptores ER α , responsável pela renovação desses em prol de uma nova estimulação.

A hipertrofia fisiológica induzida pelo exercício em fêmeas não ocorre em animais nocaute para o gene da BARR2

Apenas as fêmeas controle apresentaram sinais de hipertrofia cardíaca fisiológica, representada pelo aumento do diâmetro do átrio esquerdo, aumento na massa do ventrículo esquerdo, e aumento no diâmetro diastólico interno do ventrículo direito. Houve também redução no pico de velocidade sistólico nas fêmeas controle corredoras em relação as fêmeas controle sedentárias. Em ambos os grupos de fêmeas corredoras (KO e NTG), a velocidade média de encurtamento também estava reduzida em comparação às fêmeas sedentárias correspondentes. Esses achados, associados ao aumento da razão da massa do coração / comprimento da tíbia, apenas em fêmeas controle, reforçam os sinais de hipertrofia cardíaca fisiológica, os quais não foram observados nas fêmeas nocaute.

Esta hipertrofia já foi observada em outros estudos (FORYST-LUDWIG et al., 2011; DE BONO et al., 2006; KONHILAS et al., 2004) e pode ser consequência do maior desempenho das fêmeas controle no exercício voluntário.

De Bono e colaboradores (2006) observaram hipertrofia cardíaca apenas em fêmeas (*wild type*) corredoras, por meio da massa do coração absoluto e massa do coração normalizado pelo comprimento da tíbia e massa corporal, após as cinco semanas de treinamento voluntário. No estudo de Foryst-Ludwig e colaboradores (2011), os pesquisadores observaram aumento na massa do ventrículo esquerdo

apenas em fêmeas corredoras após quatro semanas de exercício forçado em esteira. Esses estudos, corroboram com a observação de hipertrofia fisiológica em fêmeas, mas não em machos, obtidas no presente estudo.

Konhilas e colaboradores (2004) observaram a hipertrofia fisiológica cardíaca em dois fenótipos de camundongos, C57BL/6J e FVB/NJ. Após os protocolos de treinamento de corrida voluntária e forçada, houve aumento da massa cardíaca em fêmeas C57BL/6J comparado aos machos do mesmo grupo, em valores normalizados de massa cardíaca pelo tempo e distância no período de 24 horas. De maneira oposta, não houve diferença entre sexos nos animais FVB/NJ após normalização por tempo e distância. Esses dados sugerem que a resposta hipertrófica cardíaca das fêmeas FVB/NJ é menor do que as fêmeas C57BL/6J.

Sabendo que o fenótipo dos animais do presente estudo, FVBN, é o mesmo que o discutido no estudo de Konhillas e colaboradores (2004), os achados desse grupo corrobora com os nossos quando, apresentamos que em relação à hipertrofia fisiológica cardíaca não existe diferença entre os sexos. Essa diferença hipertrófica existe apenas entre os grupos de fêmeas corredoras NTG (FVBN) e KO, não se repetindo entre os animais machos. Podemos deduzir que há uma alteração específica no nocaute da BARR2 que leva à perda da capacidade de hipertrofia fisiológica cardíaca apenas no sexo feminino.

Retomando a ligação entre o receptor de estrogênio- α com as isoformas de BARR, sabe-se da importância do estrogênio na manutenção da saúde cardiovascular em mulheres, bem como em homens, através da aromatização da testosterona em estrogênio (LIGHTFOOT 2008). Os efeitos cardioprotetores do estrogênio são mediados pelos receptores de estrogênio- α e β . Tais efeitos devem-se à vasodilatação arterial mediada pela ativação da óxido nítrico sintase em células endoteliais e mudanças na expressão gênica, como o aumento na expressão de importantes enzimas vasodilatadoras como a prostaciclina sintase e a óxido nítrico sintase endotelial. Os estrogênios também aceleram o crescimento celular e a reposição celular em caso de lesões vasculares, o que pode ser parcialmente atribuído ao aumento local da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (MENDELSON, 2002; MENDELSON & KARAS, 1999).

Associado ao fato de que o nocaute da BARR2 leva a consequente atividade reduzida do (AT1R), que é de extrema importância para a ativação das cascatas ERK e MAPK (SANNI et al., 2010; AHN et al., 2004), o estrogênio também modula a

atividade das vias da MAPK nos cardiomiócitos (NUEDLING et al., 1999). A MAPK é uma cascata de sinalização importante para o início da hipertrofia cardíaca fisiológica e está envolvida no desenvolvimento das hipertrofias cardíacas patológicas, como por exemplo, a insuficiência cardíaca (ELCKELS et al., 2001; NUEDLING et al., 1999).

Sendo assim, a perda da capacidade de hipertrofia fisiológica cardíaca que foi apresentada apenas em fêmeas nocaute em resposta ao exercício voluntário, poderia ser explicada em parte pela redução da atividade da cascata metabólica de MAPK, tanto como pela redução de disponibilidade dos ER- α e consequente diminuição da reciclagem desses receptores, bem como pela diminuição da atividade dos AT1R. Nos machos nocaute esse fato não é evidente devido a deficiência na produção de estrogênio, utilizando de outras vias para a cascata de sinalização para hipertrofia cardíaca (LIGHTFOOT, 2008; SKAVDAHL et al., 2005).

A beta-arrestina 2 tem papel de sinalização vascular e o exercício físico voluntário recupera a capacidade de dilatação dos vasos periféricos

Entre os achados do presente estudo, o de maior impacto foi a capacidade do exercício físico voluntário prevenir a redução na dilatação induzida por fluxo, evidente em artérias de animais nocaute sedentários, porém sem diferença relacionada ao sexo. Observamos também que após a exposição dos vasos a alta pressão intraluminal, os animais sedentários, tanto controle como nocaute, têm a capacidade de dilatação reduzida em relação aos animais corredores correspondentes.

Estudos sugerem que as BARRs desempenham um papel importante não somente na dessensibilização e internalização dos GPCR, mas também na mecanotransdução (CARNEIRO et al., 2017; KUCHAN et al., 1994). Dentre as forças que os vasos são constantemente expostos, o estresse de cisalhamento que é uma força de atrito tangencial gerada pelo fluxo sanguíneo na parede do vaso (CARNEIRO et al., 2017; LI et al., 2005; DAVIES, 2009), esse estresse pode ser convertido em sinais bioquímicos intracelulares e apresentar papel importante na regulação da função e do remodelamento vascular; essa capacidade de resposta do endotélio é conhecida como mecanotransdução (CHATTERJEE & FISHER 2014; LI et al., 2005). Os mecanismos de regulação da função vascular através do estresse de cisalhamento não são completamente entendidos, mas estudos propõem diferentes moléculas de membranas e microdomínios como sensores mecânicos, como por exemplo os

GPCRs, nesse contexto, o AT1R é um mecanossensor de estresse de cisalhamento, na ausência do seu ligante (CARNEIRO et al., 2017; BARAUNA et al., 2013). Fisiologicamente, o estresse de cisalhamento é o principal estímulo fisiológico para a produção de NO causada pela fosforilação e ativação da eNOS. O NO é importante na regulação do tônus vascular, controlando a dilatação dos vasos em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo (BARAUNA et al., 2013).

Nesse contexto, Carneiro e colaboradores (2017) investigaram se a sinalização mediada por BARRs estaria envolvida na produção de NO em células endoteliais submetidas ao estresse de cisalhamento e concluíram haver um papel importante tanto da BARR1 quanto da BARR2. Este efeito envolve a via de sinalização Akt/eNOS. Estes dados corroboram os achados do presente estudo, que demonstraram redução da capacidade de dilatação induzida por fluxo em animais nocaute sedentários, reforçando a teoria de que a ausência da BARR2 pode levar a uma diminuição da sensibilidade mecanossensora do AT1R, reduzindo a produção de NO e consequente redução do controle do tônus vascular.

Por outro lado, o exercício físico voluntário foi capaz de prevenir a redução da capacidade de dilatação induzida por fluxo dos animais BAAR2 KO, igualando a capacidade de DFI dos animais controle. Como bem descrito na literatura, o exercício físico; seja ele aeróbico, de resistência ou combinado, melhora a função endotelial significativamente (ASHOR et al., 2015). Alguns fatores bioquímicos envolvidos nessa melhora que podem ser citados são, por exemplo, a sinalização intracelular das quinases Akt/proteína quinase B (Akt), proteína quinase A (PKA) e proteína quinase ativada por AMP (AMKP); as quais são fosforiladas em resposta ao aumento de força mecânica na célula endotelial e, como resposta, fosforilam eNOS. Tais quinases podem contribuir para subsequente ativação de eNOS durante o exercício (ASHOR et al., 2015; ZHANG et al., 2009).

Estudos em humanos e animais têm demonstrado que o treinamento físico leva ao aumento da vasodilatação dependente de NO em grandes e pequenos vasos (GREEN et al., 2004; NIEBAUER & COOKE, 1996). Assim, a vasodilatação mediada pelo endotélio aumentada pelo fluxo ocorreria devido a expressão aumentada de eNOS e consequente maior disponibilidade de NO (NIEBAUER & COOKE, 1996).

Zhang e colaboradores (2009), compararam artérias de animais sedentários e animais corredores em esteira com intuito de observar a sinalização vascular em resposta ao exercício dinâmico. Como resultado, eles observaram que

aproximadamente 50 minutos de exercício forçado foi capaz de aumentar a fosforilação e a atividade enzimática de eNOS nos corredores, bem como a fosforilação de Akt e AMPK, mas não de ERK 1/2.

Kang e colaboradores (2019), em seus estudos com exercício voluntário por 12 semanas, obtiveram aumento significativo das vias de sinalização Akt/AMPK/eNOS nos camundongos corredores e consequentemente aumento na disponibilidade de NO. Em nossos achados, embora não tenhamos realizado estudos bioquímicos do tecido vascular periférico, observamos que o exercício voluntário levou a melhora/recuperação da capacidade de dilatação induzida por fluxo nos animais KO.

Similar aos nossos dados em animais controle, Robinson e colaboradores (2017) observaram os efeitos de um protocolo de exercício voluntário por duas semanas em camundongos C57BL/6J sedentários e corredores. Como resultado, após ao estresse causado pela exposição à hipertensão intraluminal a dilatação induzida por fluxo foi mais intensa em animais corredores a partir de 10 cmH₂O quando comparada aos animais controle. Esses dados vão de encontro aos obtidos no presente estudo, onde os animais sedentários, controle e nocaute, tiveram dilatação fluxo-induzida reduzida em comparação aos corredores do grupo correspondente, após hipertensão intraluminal.

Em resumo, a perda da capacidade de dilatação induzida por fluxo encontrada nos animais BARR2 KO está relacionada com o importante papel da BARR2 para a sinalização, possivelmente via AT1R, que teria função mecanosensorial no mecanismo de dilatação induzida por estresse de cisalhamento, principal estímulo para a produção de NO pela eNOS. No entanto, essa perda de capacidade vasodilatadora pode ser revertida devido aos demais mecanismos e vias de sinalização ativados no exercício físico regular, os quais estão envolvidos no processo de fosforilação de eNOS e consequentemente maior biodisponibilidade de NO, que é o principal regulador do tônus vascular derivado do endotélio vascular.

O nocaute da beta-arrestina 2 associado ao exercício voluntário não altera a contratilidade e responsividade do miofilamento ao cálcio.

Nossos achados de contratilidade e responsividade do miofilamento ao cálcio, não demonstraram diferença na sensibilidade ao cálcio ou desenvolvimento de força nos diferentes comprimentos de sarcômero testados, da mesma forma que não houve

diferença na inclinação das curvas na relação força-pCa, indicativo da cooperatividade de ativação dos miofilamentos.

Além de todas as funções associadas às BARRs, já descritas anteriormente, uma delas está relacionada com o mecanismo de Frank-Starling. A teoria desse mecanismo refere-se à habilidade intrínseca de aumento da contratilidade cardíaca em resposta ao aumento da pré-carga do coração (ABRAHAM et al., 2016). Uma das propriedades mais conhecidas desse mecanismo é a relação comprimento-tensão, onde o aumento do comprimento do sarcômero leva ao aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Cálcio (Ca^{2+}) (KENTISH et al., 1986). Além das diversas modificações no miofilamento que afetam a propriedade comprimento-tensão, algumas são derivadas da ativação dos GPCRs (KOBAYASHI & SOLARO, 2005). A relação entre o mecanismo de Frank Starling e as BARRs está relacionada com a preferência que alguns agonistas tendenciosos (*biased ligands*) tem por ativar sinalização mediada pelas beta arrestinas, sugerindo um papel da ativação do AT1R mediada pelas beta arrestinas na regulação da contratilidade cardíaca (ABRAHAM et al., 2016, RAJAGOPAL et al., 2010).

Abraham e colaboradores (2016) testaram o envolvimento das BARRs 1 e 2 no mecanismo de Frank-Starling no coração e observaram que em camundongos C57BL/6, o knockout das beta-arrestinas 1, 2 e do receptor AT1R levou à incapacidade de gerar força em resposta a mudanças no volume cardíaco. Em preparações de fibras isoladas, houve diminuição da sensibilidade ao Ca^{2+} , comprimento-dependente nos animais KO de ARRB1, ARRB2 e AT1R, demonstrando o papel chave regulatório das BARRs no mecanismo de Frank-Starling. Nossos achados não apontaram alteração na sensibilidade ao Ca^{2+} com a alteração do comprimento de sarcômero, um fato que pode explicar essa diferença é o background dos animais, visto que no presente estudo os animais BARR2 KO são de background FVB/N. Adicionalmente, alterações pós-translacionais que poderiam existir nestes modelos, com alterações de fosforilação de proteínas miofilamentares, foram investigadas e descartadas em nosso estudo.

Natali e colaboradores (2004) observaram os efeitos do exercício físico voluntário por 6 semanas em ratas e demonstraram aumento da hipertrofia cardíaca nas ratas corredoras, no entanto quando observado o efeito do treinamento nos picos de Ca^{2+} e na sensibilidade do miofilamento ao Ca^{2+} , não houve diferença estatística entre os grupos de corredoras e sedentárias. Stones e colaboradores (2008) também

realizaram exercício voluntário em ratas durante 6-7 semanas para observar os efeitos do exercício voluntário na expressão dos marcadores de hipertrofia de Ca^{2+} e não encontraram diferenças na modulação das taxas de pico cálcio em relação aos animais controle. Esses dados corroboram com os nossos achados onde não houve efeito entre os grupos pré e pós exercício voluntário em nenhum fenótipo.

Diffie e colaboradores (2001) realizaram um programa de exercício forçado em ratas fêmeas durante 11 semanas de corrida em esteira, e obtiveram aumento na sensibilidade ao Ca^{2+} . De maneira similar, Kemi e colaboradores (2005) realizaram protocolos de corrida em esteira em alta e moderada intensidade durante 10 semanas, em ratas fêmeas e obtiveram aumento da contratilidade e sensibilidade dos miócitos ao Ca^{2+} . Embora os dados aqui apresentados sejam de roedores de espécie diferente dos observados em nosso estudo, os resultados discutidos nos últimos parágrafos reforçam a teoria de que o aumento da contratilidade e sensibilidade ao Ca^{2+} é obtido em exercício físico forçado de alta e moderada intensidade, mas não é obtido quando realizado exercício voluntário.

Embora todos os níveis de exercício físico resultarão em aumentos de massa miocárdica, os treinamentos intensos e forçados parecem ser os únicos que além das mudanças da massa do coração também podem modificar o manejo e resposta dos miofilamentos ao Ca^{2+} no organismo, feito que o exercício leve e voluntário não demonstra ser capaz de realizar (STONES et al., 2005).

O exercício físico voluntário associado ao nocaute da BARR2 não altera a fosforilação de proteínas sarcoméricas e regulatórias cardíacas

Corroborando com nossos achados prévios que demonstram não haver alteração na responsividade dos miofilamentos ao cálcio relacionada ao exercício físico voluntário, nossos dados bioquímicos que buscavam possíveis alterações que explicassem as alterações na hipertrofia cardíaca também demonstram não haver diferença significativa na fosforilação de proteínas sarcoméricas nem em proteínas regulatórias cardíacas específicas.

Morissette e colaboradores (2019) realizaram exercício voluntário em camundongos de ambos os sexos, transgênicos $\text{AMPK}\alpha_2$ de fenótipo C57Bl/6 e animais controles do mesmo fenótipo, durante 5 meses e como resultado da análise bioquímica do tecido cardíaco demonstraram que o o exercício voluntário não altera

significativamente a expressão de SERCA2a. No entanto, a expressão de PLN foi reduzida nos animais corredores. Devido a inibição da função da SERCA pelo PLN, os pesquisadores calcularam a razão PLN:SERCA2a, demonstrando que o exercício reduz a razão em ambos os grupos. Já em relação a fosforilação de PLN Thr17 (p-PLN^{Thr17}) e PLN Ser16 (p-PLN^{Ser16}) o exercício não alterou a fosforilação no grupo controle. Esses dados demonstram e reforçam os efeitos obtidos num protocolo de exercício a longo prazo, diferente do apresentado em nosso estudo.

De maneira oposta, em protocolo de exercício físico forçado, intervalado, em esteiras, por seis semanas, Kemi e colaboradores (2007) avaliaram 62 camundongos fêmeas C57Bl/6J e obtiveram aumento na expressão de SERCA2a e redução da expressão de PLN, no entanto quando calculada a razão entre PLN:SERCA2a, obteve-se também redução. Em relação à fosforilação, houve redução da p-PLN^{Thr17} em cardiomiócitos, diferente dos achados do presente estudo e de Morissette e colaboradores, o que deve estar relacionado ao tipo e intensidade de exercício físico.

Uma proteína que participa dos mecanismos de contratilidade cardíaca e foi abordada em nosso estudo foi a Troponina I (TnI), que quando fosforilada pela PKA inibe a ligação do Ca^{2+} a troponina C (TnC) aumentando a cinética de relaxamento muscular. O resultado é uma melhor captação do Ca^{2+} e consequentemente do lusitropismo cardíaco (VAN DER VALDEN & STIENEN, 2019, LAYLAND et al., 2005, MAIER & BERS, 2002). A fosforilação da TnI cardíaca (cTnI) pela PKA diminui a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} e permite um desligamento mais rápido do Ca^{2+} dos miofilamentos (VAN DER VALDEN & STIENEN 2019). Kaplan e colaboradores (1994) realizaram exercício forçado de natação durante quatro semanas em camundongos do fenótipo C57/Bl6, em busca de caracterizar a resposta cardíaca ao exercício crônico. Não obtiveram resultados significativos quando observada a fosforilação de cTnI nos animais exercitados em comparação com os sedentários.

A cadeia leve da miosina também é uma proteína regulatória cardíaca que atua nos músculos estriados de forma a potencializar a força e velocidade das contrações musculares. Sua fosforilação em excesso no coração pode levar ao quadro de hipertrofia patológica compensatória (HUANG et al., 2008). Em busca de entender os efeitos regulatórios cardíacos da MLCV em situações que exigiam maior demanda cardíaca, Fewell e colaboradores (1997) observaram camundongos nocaute para MLCV e controle, após 5 semanas de exercício forçado em esteiras. Como resultado,

embora os nocautes tiveram redução na capacidade do exercício comparado aos NTG em alta velocidade, o exercício não foi capaz de causar mudanças na fosforilação da MLCV. Ambos os estudos apresentados anteriormente, tanto em relação a cTnI como em relação MLCV, são estudos que apresentam metodologia diferentes ao do presente estudo em relação ao tipo de exercício.

Outro alvo da PKA é a Proteína C de ligação à miosina (cMyBP-C), um componente associado ao filamento grosso que regula a contração muscular, com papel em manter o completo relaxamento dos cardiomiócitos (FLASHMAN et al., 2004). Alterações nesses componentes podem indicar redução no poder contrátil, resultando em possíveis cardiomiopatias hipertróficas (DIRKZ *et. al.*, 2012). Rosas e colaboradores (2015) realizaram exercício voluntário por 6 semanas buscando observar os efeitos fisiológicos cardíacos da fosforilação da cMyBPC. Foram utilizados camundongos geneticamente modificados, que expressavam fosforilação deficiente de sítio-específicos da cMyBPC e animais controle, com fosforilação normal. Como resultado, demonstraram que a fosforilação cMyBPC gera um efeito lusitrópico positivo, melhorando o mecanismo de relaxamento nos animais treinados controle. No entanto o objetivo do estudo de Rosas e colaboradores era avaliar o papel lusitrópico da fosforilação da cMyBPC, dessa forma não houve comparação entre sedentários e controles dos efeitos do exercício voluntário, diferentemente do presente estudo.

6 CONCLUSÕES

A ausência da BARR2 limita a capacidade de exercício físico voluntário em fêmeas nocaute e, conseqüentemente, reduz o desenvolvimento da hipertrofia fisiológica cardíaca nessas mesmas fêmeas comparado a fêmeas não transgênicas. Adicionalmente, constatou-se a necessidade da Beta-Arrestina 2 no mecanismo de dilatação induzida por fluxo em vasos sanguíneos e o importante papel do exercício físico voluntário na prevenção ou reversão da redução da dilatação induzida por fluxo observada nos animais com nocaute para BARR2.

7 REFERÊNCIAS

- Abraham, D. M., Davis, R. T., Warren, C. M., Mao, L., Wolska, B. M., Solaro, R. J., ... Semenza, G. L. (2016). β -Arrestin mediates the Frank-Starling mechanism of cardiac contractility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(50), 14426–14431. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609308113>
- Ahn, S., Wei, H., Garrison, T.R., Lefkowitz, R.J. (2004). Reciprocal regulation of angiotensin receptor-activated extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestins 1 and 2. *Biol Chem*, v. 279, p: 7807-7811.
- Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *Journal of Applied Physiology*. 2001; 90(5): 1900-08.
- Alves, M. L., Dias, F. A. L., Gaffin, R. D., Simon, J. N., Montminy, E. M., Biesiadecki, B. J., ... Wolska, B. M. (2014). Desensitization of Myofilaments to Ca^{2+} as a Therapeutic Target for Hypertrophic Cardiomyopathy With Mutations in Thin Filament Proteins. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 7(2), 132–143. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000324>
- Ascensão, A., Ferreira, R., & Magalhães, J. (2007, April 12). Exercise-induced cardioprotection - biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *International Journal of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.04.076>
- Ashor, A. W., Lara, J., Siervo, M., Celis-Morales, C., Oggioni, C., Jakovljevic, D. G., & Mathers, J. C. (2015, February 1). Exercise Modalities and Endothelial Function: A Systematic Review and Dose–Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Sports Medicine*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0272-9>
- Atlas A. Steven. (2007). The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13(8), 9–20.
- Barauna, V. G., Magalhaes, F. C., Campos, L. C. G., Reis, R. I., Kunapuli, S. P., Costa-Neto, C. M., ... Krieger, J. E. (2013). Shear stress-induced Ang II AT1 receptor activation: G-protein dependent and independent mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(3), 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.005>
- Bernardo, B.C.; Weeks, K.L.; Pretorius, L.; McMullen, J.R. (2010) Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. v. 128, p: 191-227.
- Benetti, M. (1997). Condicionamento físico aplicado a doenças cardiovasculares. *Revista Brasileira de Medicina Do Esporte*, 3(1), 22–26. <https://doi.org/10.1590/s1517-86921997000100006>

Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov R.R., Peppel, K., Caron, M.G., Lin, F.T. (1999). Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science*. v. 286, p 2495-2498.

Burnier, M. (2001). Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers. *Circulation*, v.103, p:904-912.

Chatterjee, S., & Fisher, A. B. (2014). Mechanotransduction in the Endothelium: Role of Membrane Proteins and Reactive Oxygen Species in Sensing, Transduction, and Transmission of the Signal with Altered Blood Flow. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(6), 899–913. doi:10.1089/ars.2013.5624

Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiologica*, 219(2), 382–408. doi:10.1111/apha.12725

Conner, D.A., Mathier, M.A., Mortensen, R.M., Christe, M., Vatner, S.F., Seidman, C.E., Seidman, J.G. (1997). Beta-Arrestin 1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circulation Research*. v. 81(6), p:1021-1026.

Davies, P. F. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio1397>

De Bono JP, Adlam D, Paterson DJ, Channon KM. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2006; 290(4): 926-34.

Diffie, G. M., Seversen, E. A., & Titus, M. M. (2001). Exercise training increases the Ca²⁺ sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. *Journal of Applied Physiology*, 91(1), 309–315. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.1.309>

Dirkx, E., Cazorla, O., Schwenk, R. W., Lorenzen-Schmidt, I., Sadayappan, S., van Lint, J., ... Luiken, J. J. F. P. (2012). Protein kinase D increases maximal Ca²⁺-activated tension of cardiomyocyte contraction by phosphorylation of cMyBP-C- Ser 315. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 303(3), 323–331. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00749.2011>

Dominguez, R., Hu, E., Zhou, M., & Baudry, M. (2009). 17 β -estradiol-mediated neuroprotection and ERK activation require a pertussis toxin-sensitive mechanism involving GRK2 and β -arrestin-1. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 4228–4238. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0550-09.2009>

Eickels MV, Grohé C, Cleutjens JPM, Janssen, BJ, Wellens HJJ, Doevandans PA. 17 β -Estradiol Attenuates the Development of Pressure-Overload Hypertrophy. *Circulation*, 2001; 104(12): 1419-23.

Feng, X., Wang, W., Liu, J., & Liu, Y. (2011, April). β -Arrestins: Multifunctional signaling adaptors in type 2 diabetes. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0389-3>

Foryst-Ludwig, A., Kreissl, M. C., Sprang, C., Thalke, B., Böhm, C., Benz, V., ... Kintscher, U. (2011). Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301(1). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01222.2010>

Fernandes, T., Soci, U. P. R., & Oliveira, E. M. (2011, September). Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: MicroRNAs and molecular determinants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500112>

Gorzek, J. F., Hendrickson, K. C., Forstner, J. P., Rixen, J. L., Moran, A. L., & Lowe, D. A. (2007). Estradiol and tamoxifen reverse ovariectomy-induced physical inactivity in mice. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(2), 248–256. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000241649.15006.b8>

Green, D. J., Maiorana, A., O'Driscoll, G., & Taylor, R. (2004, November 15). Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.068197>

Huang, J., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Kamm, K. E., & Stull, J. T. (2008). Myosin regulatory light chain phosphorylation attenuates cardiac hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19748–19756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802605200>

Hunyady, L.; Catt, K.J. (2005). Pleiotropic AT₁ Receptor Signaling Pathways Mediating Physiological and Pathogenic Actions of Angiotensin II. *Molecular Endocrinology*, v. 20, n. 5, p: 953-970.

Jean-Charles, P. Y., Kaur, S., & Shenoy, S. K. (2017, September 1). G Protein-Coupled Receptor Signaling Through β -Arrestin-Dependent Mechanisms. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000482>

Kang JJ, Treadwell TA, Bodary PF, Shayman JA (2019) Voluntary wheel running activates Akt/AMPK/eNOS signaling cascades without improving profound endothelial dysfunction in mice deficient in α -galactosidase A. *PLoS ONE* 14(5): e0217214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217214>

Kaschina, E., Unger, T. (2018). Prehypertension and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Prehypertension and Cardiometabolic Syndrome*, 307–318. doi:10.1007/978-3-319-75310-2_22

Kemi, O. J., Haram, P. M., Loennechen, J. P., Osnes, J. B., Skomedal, T., Wisløff, U., & Ellingsen, Ø. (2005). Moderate vs. high exercise intensity: Differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovascular Research*, 67(1), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.03.010>

- Kemi, O. J., Ellingsen, Ø., Ceci, M., Grimaldi, S., Smith, G. L., Condorelli, G., & Wisløff, U. (2007). Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 43(3), 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.06.013>
- Kentish, J. C., Ter Keurs, H. E. D. J., Ricciardi, L., Bucx, J. J., & Noble, M. I. (1986). Comparison between the sarcomere length-force relations of intact and skinned trabeculae from rat right ventricle. Influence of calcium concentrations on these relations. *Circulation Research*, 58(6), 755–768. <https://doi.org/10.1161/01.RES.58.6.755>
- Kim, K. S., Abraham, D., Williams, B., Violin, J. D., Mao, L., & Rockman, H. A. (2012). β -arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 303(8). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00475.2012>
- Kobayashi, Y. (2020). New perspectives on GPCRs: GPCR heterodimer formation (melanocortin receptor) and GPCR on primary cilia (melanin concentrating hormone receptor). *General and Comparative Endocrinology*, 293. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113474>
- Kobayashi, T., & Solaro, R. J. (2005). CALCIUM, THIN FILAMENTS, AND THE INTEGRATIVE BIOLOGY OF CARDIAC CONTRACTILITY. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 39–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.114025>
- Konhilas, J.P., Maass, A.H., Luckey, S.W., Stauffer, B.L., Olson, E.N., Leinwand, L.A. (2005). Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 287, p:H2768-2776.
- Konhilas, J.P., Chen, H., Luczak, E., Mckee, L.A., Regan, J., Watson, P.A., Stauffer, B.L., Khalpey, Z.I., Mckinsey, T.A., Horn, T., Lafleur, B., Leinwand, L.A. (2015) Diet and sex modify exercise and cardiac adaptation in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.308, p:H135-145, 2015.
- Krupnick, J.G.; Benovic, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 38, p. 289-319.
- Kuchan, M. J., Jo, H., & Frangos, J. A. (1994). Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 267(3), C753–C758. doi:10.1152/ajpcell.1994.267.3.c753
- Layland, J., Solaro, R. J., & Shah, A. M. (2005, April 1). Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.12.022>
- Lefkowitz, R.J.; Shenoy, S.K. (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, n. 308, v. 5721, p: 512-7.

Li, Y.-S. J., Haga, J. H., & Chien, S. (2005). Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *Journal of Biomechanics*, 38(10), 1949–1971. doi:10.1016/j.jbiomech.2004.09.030

Lightfoot JT. Sex Hormones' Regulation of Rodent Physical Activity: A review. 2008; 4(3): 126-132.

Liu, C. H., Gong, Z., Liang, Z. L., Liu, Z. X., Yang, F., Sun, Y. J., ... Sun, J. P. (2017). Arrestin-biased AT1R agonism induces acute catecholamine secretion through TRPC3 coupling. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14335>

Maier, L. S., & Bers, D. M. (2002, August 1). Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: Heartbeat to heartbeat and beyond. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2038>

Manzanares, G., Brito-Da-Silva, G., & Gandra, P. G. (2019). Voluntary wheel running: Patterns and physiological effects in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52(1). <https://doi.org/10.1590/1414-431X20187830>

Melo, S. F. S., Barauna, V. G., Fernandes, T., Carmo, E. C., Carvalho, C. R. O., & Oliveira, E. M. (2017). Cardiac AT1 receptor-dependent and IGF1 receptor-independent signaling is activated by a single bout of resistance exercise. *Physiological Research*, 66(6), 1061–1065. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933563>

Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The American Journal of Cardiology*. 2002; 89(12): 12-17.

Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340: 1801-11.

Mirabito Colafella, K. M., Bovée, D. M., & Danser, A. H. J. (2019, September 1). The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Experimental Eye Research*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.020>

Monasky, M. M., Taglieri, D. M., Henze, M., Warren, C. M., Utter, M. S., Soergel, D. G., ... John Solaro, R. (2013). The β -arrestin-biased ligand TRV120023 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy while preserving enhanced myofilament response to calcium. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 305(6). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00327.2013>

Moore, C.A.C.; Milano, S.K.; Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and Arrestins. *Ann Rev Physiol*, v. 69, p:451-82.

Morissette, M. P., Susser, S. E., Stammers, A. N., Moffatt, T. L., Wigle, J. T., Wigle, T. J., ... Duhamel, T. A. (2019). Exercise-induced increases in the expression and activity of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium atpase 2 is attenuated in ampk α 2 kinase-dead mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 97(8), 786–795. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2018-0737>

Müller, A. L., & Dhalla, N. S. (2012). Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. *Heart Failure Reviews*, 17(3), 395–409. <https://doi.org/10.1007/s10741-011-9269-8>

Natali, A. J., Wilson, L. A., Peckham, M., Turner, D. L., Harrison, S. M., & White, E. (2002). Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology*, 541(3), 863–875. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013415>

Nehme, A., Zouein, F. A., Zayeri, Z. D., & Zibara, K. (2019). An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 6(2), 14. <https://doi.org/10.3390/jcdd6020014>

Niebauer, J., & Cooke, J. P. (1996). Cardiovascular effects of exercise: Role of endothelial shear stress. *Journal of the American College of Cardiology*, 28(7), 1652–1660. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(96\)00393-2](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(96)00393-2)

Noor, N.; Patel, C.B.; Rochman, H.A. (2011) β -Arrestin: A signaling molecule and potential therapeutic target for heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 51, n. 4, 2011, pp. 534-541.

Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Rainer M, Vetter H, Grohé C. Differential effects of 17 β -Estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes. *FEBS Letters*. 1999; 454(3): 271-76.

Nystoriak, M.A., Bhatnagar, A. (2018). Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, 1-11.

Pena JR & Wolska BM (2004). Troponin I phosphorylation plays an important role in the relaxant effect of beta-adrenergic stimulation in mouse hearts. *Cardiovasc Res* **61**, 756-763.

Purohit, D. C., Mandyam, A. D., Terranova, M. J., & Mandyam, C. D. (2020). Voluntary wheel running during adolescence distinctly alters running output in adulthood in male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 377. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112235>

Rajagopal, K., Whalen, E. J., Violin, J. D., Stiber, J. A., Rosenberg, P. B., Premont, R. T., ... Lefkowitz, R. J. (2006). β -arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16284–16289. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607583103>

Rakesh, K., Yoo, B. S., Kim, I. M., Salazar, N., Kim, K. S., & Rockman, H. A. (2010). β b-arrestin-biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. *Science Signaling*, 3(125). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000769>

Ramkhelawon, B., Rivas, D., & Lehoux, S. (2013). Shear stress activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 via the angiotensin II type 1 receptor. *FASEB Journal*, 27(8), 3008–3016. <https://doi.org/10.1096/fj.12-222299>

Regitz-Zagrosek, V., Dworatzek, E., Kintscher, U., & Dragun, D. (2013, February). Sex and sex hormone-dependent cardiovascular stress responses. *Hypertension*.

Robinson, A. T., Fancher, I. S., Sudhahar, V., Bian, J. T., Cook, M. D., Mahmoud, A. M., ... Phillips, S. A. (2017). Short-term regular aerobic exercise reduces oxidative stress produced by acute in the adipose microvasculature. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 312(5), H896–H906. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00684.2016>

Rosas, P. C., Liu, Y., Abdalla, M. I., Thomas, C. M., Kidwell, D. T., Dusio, G. F., ... Tong, C. W. (2015). Phosphorylation of Cardiac Myosin-Binding Protein-C Is a Critical Mediator of Diastolic Function. *Circulation: Heart Failure*, 8(3), 582–594. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001550>

Rosenfeld CS. Sex-Dependent Differences in Voluntary Physical Activity. *Physiology & behavior*. 2017; 176: 139-48.

Roy EJ, Wade GN. Role of estrogens in Androgen-Induced Spontaneous Activity in Male Rats. *Journal of Comparative and physiological Psychology*. 1975; 89(6): 573-9.

Ryba, D.M.; Cowan, C.L.; Russel, B.; Wolska, B.M.; Solaro, R.J. (2017). Long-Term Biased β -Arrestin Signaling Improves Cardiac Structure and Function in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, v. 135, n. 11, p: 1056-1070.

Sanni, S.J.; Hansen, J.T.; Bonde, M.M.; Speerschneider, T.; Christensen, G.L.; Munk, S.; Gammeltoft, S.; Hansen, J.L. (2010). β -Arrestin 1 and 2 stabilize the angiotensin II type 1 receptor in distinct high-affinity. *British Journal of Pharmacology*, v. 161, p:150-161.

Santos, A. P. C, Fonseca-Alaniz, M. H., Dallan, L. A. O., Miyakawa, A. A., & Krieger, J. E. (2017). β -arrestin is critical for early shear stress-induced Akt/eNOS activation in human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), 75–81. doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.003

Skavdahl, M., Steenbergen, C., Clark, J., Myers, P., Demianenko, T., Mao, L., ... Murphy, E. (2005). Estrogen receptor- β mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 288(2), 57-2). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00723.2004>

Stones, R., Natali, A., Billeter, R., Harrison, S., & White, E. (2008). Voluntary exercise-induced changes in β 2-adrenoceptor signalling in rat ventricular myocytes. *Experimental Physiology*, 93(9), 1065–1075. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.042598>

Suleymanova, N., Crudden, C., Shibano, T., Worrall, C., Oprea, I., Tica, A., ... Girnita, L. (2017). Functional antagonism of β -arrestin isoforms balance IGF-1R expression and signalling with distinct cancer-related biological outcomes. *Oncogene*, 36(41), 5734–5744. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.179>

Shenoy, S.K.; Lefkowitz, R.J. (2011). β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 32, n.9, p: 521-533.

van der Velden, J., & Stienen, G. J. M. (2019, January 1). Cardiac disorders and pathophysiology of sarcomeric proteins. *Physiological Reviews*. American Physiological Society.

Van Gastel, J., Hendrickx, J. O., Leysen, H., Santos-Otte, P., Luttrell, L. M., Martin, B., & Maudsley, S. (2018, November 28). β -Arrestin based receptor signaling paradigms: Potential therapeutic targets for complex age-related disorders. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01369>

Vasan RS, Larson MG, Levy D, Evans JC, Benjamin EJ. Distribution and Categorization of Echocardiographic Measurements in Relation to Reference Limits. *Circulation*. 1997; 96: 1863-73.

Vega, R.B.; Konhilas, J.P.; Kelly, D.P.; Leinwand, L.A. (2017). Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise. *Cell Metabolism*, v. 25, p: 1012-1024.

Violin, J. D., DeWire, S. M., Yamashita, D., Rominger, D. H., Nguyen, L., Schiller, K., ... Lark, M. W. (2010). Selectively engaging β -arrestins at the angiotensin II type 1 receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3), 572–579. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.173005>

Violin, J. D., & Lefkowitz, R. J. (2007, August). β -Arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.006>

Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S. K., Karnik, S. S., Hunyady, L., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2003). Independent β -arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 10782–10787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834556100>

Wilson, M. G., Ellison, G. M., & Cable, N. T. (2015, May 1). Basic science behind the cardiovascular benefits of exercise. *Heart*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2014-306596>

Wong, A. M., Abrams, M. C., & Micevych, P. E. (2015). β -Arrestin regulates estradiol membrane-initiated signaling in hypothalamic neurons. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120530>

Yasuda, N., Akazawa, H., Qin, Y., Zou, Y., & Komuro, I. (2008). A novel mechanism of mechanical stress-induced angiotensin II type 1-receptor activation without the

involvement of angiotensin II. In *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (Vol. 377, pp. 393–399). <https://doi.org/10.1007/s00210-007-0215-1>

Zhang, Q. J., Mcmillin, S. L., Tanner, J. M., Palionyte, M., Abel, E. D., & Symons, J. D. (2009). Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: Role of vascular signalling kinases. *Journal of Physiology*, 587(15), 3911–3920. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172916>

8 APÊNDICES

APÊNDICE 1– MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE DISTÂNCIA PERCORRIDA POR SEMANA

PERÍODO	Fêmeas NTG (n = 9)	Fêmeas KO (n = 9)	Machos NTG (n = 5)	Machos KO (n = 9)
1ª SEMANA	3173,90 ± 391,57	2600,31 ± 818,82	1176,51 ± 405,32	1640,78 ± 546,29
2ª SEMANA	4782,67 ± 808,77	4278,61 ± 1076,89	2713,41 ± 452,95	3676,24 ± 886,45
3ª SEMANA	6942,97 ± 966,29	3979,71* ± 717,82	3867,71 ± 701,67	4451,31 ± 996,03
4ª SEMANA	6977,54 ± 1028,41	3986,97* ± 560,17	4542,41 ± 1142,40	5197,04 ± 1176,25
5ª SEMANA	5510,84 ± 883,67	2834,67* ± 499,15	5036,41 ± 648,14	5143,89 ± 1164,03
6ª SEMANA	4994,11 ± 807,87	2416,26* ± 304,15	4777,88 ± 949,94	4514,61 ± 1269,69

* Representa valor de $p < 0.05$ entre fêmeas NTG e KO na mesma semana.

**APÊNDICE 2 – MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE
ECOCARDIOGRAFIA APRESENTADOS NA FIGURA 2**

Parâmetro	Sedentários NTG		Sedentários KO		Corredores NTG		Corredores KO	
	<i>M</i> (<i>n</i> =4)	<i>F</i> (<i>n</i> =6)	<i>M</i> (<i>n</i> =6)	<i>F</i> (<i>n</i> =6)	<i>M</i> (<i>n</i> =7)	<i>F</i> (<i>n</i> =6)	<i>M</i> (<i>n</i> =6)	<i>F</i> (<i>n</i> =5)
<i>Diâmetro AE (mm)</i>	1,89 ±0,17	1,92 ±0,12	1,91 ±0,10	1,89 ±0,09	2,09 ±0,11	2,14 * ±0,10	2,02 ±0,12	2,00 ±0,05
<i>Massa VE (g)</i>	68,69 ±4,61	69,69 ±4,05	71,44 ±2,37	69,77 ±4,10	80,74 ±4,22	75,54* ±4,73	68,97 ±2,40	68,47 ±6,41
<i>Diâmetro Interno diastólico do VE (mm)</i>	4,10 ±0,08	3,78 ±0,08	4,15 ±0,14	3,96 ±0,13	4,28 ±0,12	4,13 * ±0,05	4,09 ±0,10	4,19* ±0,08

* $p < 0.05$ diferença significativa entre fêmeas do mesmo grupo.

**APÊNDICE 3 – MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE HIPERTROFIA
FISIOLÓGICA CARDÍACA APRESENTADO NA FIGURA 4.**

Parâmetro	Sedentários NTG		Sedentários KO		Corredores NTG		Corredores KO	
	<i>M</i> (<i>n</i> =8)	<i>F</i> (<i>n</i> =9)	<i>M</i> (<i>n</i> =12)	<i>F</i> (<i>n</i> =11)	<i>M</i> (<i>n</i> =8)	<i>F</i> (<i>n</i> =9)	<i>M</i> (<i>n</i> =12)	<i>F</i> (<i>n</i> =11)
<i>Massa do Coração/Comprimento da tíbia (razão)</i>	8,90 ±0,38	8,22 ±0,27	9,28 ±0,46	9,65 ±0,32	9,74 ±0,40	8,52* ±0,23	10,37 ±0,42	9,12 ±0,34

* $p < 0.05$ diferença significativa entre fêmeas do mesmo grupo.

**APÊNDICE 4 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DADOS DE DILATAÇÃO
FLUXO-INDUZIDA.**

	Sedentários NTG (n = 8)	Sedentários KO (n = 8)	Corredores NTG (n = 10)	Corredores KO (n = 10)
Δ10	6,76 ± 2,34	3,35 ± 2,62	7,22 ± 4,28	6,44 ± 3,00
Δ20	20,09 ± 5,51	9,80 * ± 4,12	18,51 † ± 5,28	17,83 † ± 3,08
Δ40	46,33 ± 9,40	25,38 * ± 4,16	37,33 † ± 5,81	40,95 † ± 5,72
Δ60	63,99 ± 10,11	40,81 * ± 6,13	59,47 † ± 5,87	62,86 † ± 7,88
Δ100	79,94 ± 8,18	57,20 * ± 3,26	75,67 † ± 5,77	77,04 † ± 7,87

* Representa valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo sedentários NTG; † Representa valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo sedentário KO.

**APÊNDICE 5 – MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS DADOS DE DILATAÇÃO
FLUXO-INDUZIDA SEPARADA POR SEXO.**

Parâmetro	Sedentários NTG		Sedentários KO		Corredores NTG		Corredores KO	
	<i>M</i> (n=4)	<i>F</i> (n=4)	<i>M</i> (n=4)	<i>F</i> (n=4)	<i>M</i> (n=6)	<i>F</i> (n=4)	<i>M</i> (n=5)	<i>F</i> (n=5)
Δ10	7,28 ±2,92	6,25 ±1,88	3,18 ±2,93	3,53 ±2,71	8,00 ±5,53	6,05 ±0,92	5,76 ±1,13	7,12 ±2,52
Δ20	19,33 ±2,21	20,85 ±8,02	9,13 ±3,88	10,48 ±4,83	19,38 ±6,83	17,20 ±1,48	16,26 ±1,13	19,40 ±2,52
Δ40	49,83 ±12,12	42,83 ±5,16	26,33 * ±5,27	24,43 * ±3,18	38,02 *† ±7,51	36,30 † ±2,25	43,02 † ±3,40	38,88 † ±7,61
Δ60	68,45 ±13,03	59,53 ±3,98	40,08 * ±3,00	41,55 ±8,78	60,47 † ±6,99	57,98 ±4,11	63,20 † ±3,99	62,52 † ±8,91
Δ100	85,05 ±6,53	74,83 ±6,63	56,45 * ±3,81	57,95 ±2,95	77,27 † ±6,61	73,28 † ±3,79	74,46 † ±3,46	79,62 † ±7,75

* Representa valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo sedentários NTG; † Representa valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo sedentário KO.

**APÊNDICE 6 – MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS DE PCA50,
COEFICIENTE DE HILL E TENSÃO MÁXIMA EM FIBRAS ISOLADAS.**

Parâmetro	Sedentários NTG		Sedentários KO		Corredores NTG		Corredores KO	
	<i>M</i> (<i>n</i> =11)	<i>F</i> (<i>n</i> =7)	<i>M</i> (<i>n</i> =10)	<i>F</i> (<i>n</i> =7)	<i>M</i> (<i>n</i> =4)	<i>F</i> (<i>n</i> =4)	<i>M</i> (<i>n</i> =5)	<i>F</i> (<i>n</i> =6)
<i>pCa50</i>	5,91 ±0,02	5,86 ±0,03	5,87 ±0,02	5,88 ±0,02	5,83 ±0,03	5,87 ±0,04	5,85 ±0,03	5,96 ±0,01
<i>Tensão Máxima</i>	30,68 ±1,99	30,79 ±3,46	24,57 ±1,63	32,65 ±2,71	33,58 ±4,73	23,95 ±3,69	26,86 ±0,58	23,70 ±2,02
<i>Coeficiente de Hill</i>	3,53 ±0,12	2,97 ±0,17	3,46 ±0,10	3,23 ±0,13	3,19 ±0,12	3,50 ±0,11	3,55 ±0,21	3,35 ±0,08

**APÊNDICE 7 – MÉDIA E ERRO DA MÉDIA DOS DADOS FOSFORILAÇÃO DE
PROTEÍNAS SARCOMÉRICAS E REGULADORAS CARDÍACAS.**

Proteína	Sedentários NTG		Sedentários KO		Corredores NTG		Corredores KO	
	M (n=3)	F (n=3)	M (n=3)	F (n=3)	M (n=3)	F (n=3)	M (n=3)	F (n=3)
<i>p</i> -PLN Ser 16/PLN total (A.U.)	1,52 ±0,28	1,58 ±0,24	2,15 ±0,23	1,55 ±0,23	2,58 ±0,17	1,96 ±0,31	2,48 ±0,08	1,97 ±0,51
<i>p</i> -PLN Thr 17/PLN total (A.U.)	2,16 ±0,51	2,41 ±0,18	2,89 ±0,03	1,98 ±0,56	2,96 ±0,08	2,16 ±0,12	2,51 ±0,23	2,33 ±0,66
SERCA2a/Actina (%Fosforilação)	93,67 ±28,20	90,00 ±18,08	97,33 ±24,13	92,33 ±14,75	103,33 ±27,84	88,00 ±24,17	86,33 ±19,20	78,33 ±20,54
<i>p</i> -MLCV2/total MLCV2 (%fosforilação)	0,28 ±0,03	0,29 ±0,06	0,31 ±0,05	0,28 ±0,02	0,30 ±0,08	0,31 ±0,04	0,32 ±0,02	0,28 ±0,04
<i>p</i> -cTnl/ Total cTnl (%fosforilação)	0,42 ±0,11	0,49 ±0,01	0,55 ±0,01	0,52 ±0,03	0,48 ±0,10	0,52 ±0,03	0,56 ±0,003	0,53 ±0,03
<i>p</i> -MyBPC S273/Actina (A.U.)	38,29 ±2,11	30,48 ±0,39	34,96 ±0,99	29,47 ±1,52	32,29 ±3,09	30,68 ±2,67	33,03 ±5,04	42,59 ±4,22
<i>p</i> -MyBPC S282/Actina (A.U.)	3,16 ±0,29	3,57 ±0,62	2,35 ±0,07	2,59 ±0,48	2,85 ±0,52	3,11 ±0,32	2,31 ±0,19	2,54 ±0,09
<i>p</i> -MyBPC S302/Actina (A.U.)	3,48 ±0,26	3,14 ±0,02	2,57 ±0,07	2,91 ±0,19	3,27 ±0,16	3,50 ±0,04	3,12 ±0,39	3,21 ±0,26

9 ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL

UIC UNIVERSITY OF ILLINOIS
AT CHICAGO

Office of Animal Care and
Institutional Biosafety Committees (MC 672)
Office of the Vice Chancellor for Research
206 Administrative Office Building
1737 West Polk Street
Chicago, Illinois 60612-7227

March 30, 2017

R. John Solaro
Physiology & Biophysics
M/C 901

Dear Dr. Solaro:

The protocol indicated below was reviewed at a convened ACC meeting in accordance with the Animal Care Policies of the University of Illinois at Chicago on **2/21/2017**. *The protocol was not initiated until final clarifications were reviewed and approved on 3/30/2017. The protocol is approved for a period of 3 years with annual continuation.*

Title of Application: Transmembrane Receptor Signaling in Cardiac Disorders

ACC Number: 17-020

Initial Approval Period: 3/30/2017 to 2/21/2018

Current Funding: *Portions of this protocol are supported by the funding sources indicated in the table below.*

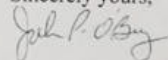
Number of funding sources: 2

Funding Agency	Funding Title			Portion of Proposal Matched
NIH	Beta-arrestin Signaling and Sarcomere-Calcium Response in Familial Dilated Cardiomyopathy (Institutional # 00001626)			All matched
Funding Number	Current Status	UIC PAF NO.	Performance Site	Funding PI
F31 HL127996 (original years 1-3)	Funded	201500510	UIC	David M. Ryba
Funding Agency	Funding Title			Portion of Proposal Matched
NIH	Integrated Mechanisms of Cardiac Maladaptation (Institutional # 00021004)			Protocol is linked to form G 16-026
Funding Number	Current Status	UIC PAF NO.	Performance Site	Funding PI
PO1 HL062426 (years 16-20 A1 version)	Pending	201503159	UIC and Other Loyola University	John Solaro

This institution has Animal Welfare Assurance Number A3460.01 on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), NIH. **This letter may only be provided as proof of IACUC approval for those specific funding sources listed above in which all portions of the funding proposal are matched to this ACC protocol.**

In addition, all investigators are responsible for ensuring compliance with all federal and institutional policies and regulations related to use of animals under this protocol and the funding sources listed on this protocol. Please use OLAW's "*What Investigators Need to Know about the Use of Animals*" (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/InvestigatorsNeed2Know.pdf>) as a reference guide. Thank you for complying with the Animal Care Policies and Procedures of UIC.

Sincerely yours,



John P. O'Bryan, PhD
Chair, Animal Care Committee
JPO /mbb

cc: BRL, ACC File, Beata M. Wolska, David Ryba, Shamim Chowdhury