

AURORA CORRÊA RODRIGUES

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE AS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS  
E MECÂNICAS EM CARDIOMIÓCITOS DE CAMUNDONGOS KNOCKOUT PARA OS  
RECEPTORES  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ADRENÉRGICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R696e  
2014

Rodrigues, Aurora Corrêa, 1989-  
Efeitos do treinamento físico sobre as propriedades  
morfológicas e mecânicas em cardiomiócitos de camundongos  
knockout para os receptores b1- e b2- adrenérgicos / Aurora  
Corrêa Rodrigues. – Viçosa, MG, 2014.  
ix, 44f. : il. (algumas color.); 29 cm.

Orientador: Thales Nicolau Primola Gomes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Aptidão física - Testes. 2. Teste de esforço.  
3. Cardiomiócito. 4. Receptor adrenérgico beta. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Educação Física. Programa  
de Pós-graduação em Educação Física. II. Título.

CDD 22. ed. 613.7

AURORA CORRÊA RODRIGUES

EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE AS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS  
E MECÂNICAS EM CARDIOMIÓCITOS DE CAMUNDONGOS KNOCKOUT PARA OS  
RECEPTORES  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ADRENÉRGICOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Educação Física, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de março de 2014.



Paulo Sérgio Lacerda Beirão



Simonton de Andrade Silveira



Thales Nicolau Prímola Gomes ,  
(Orientador)

Aos meus pais e irmão.

Ao meu esposo.

Aos animais experimentais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter iluminado meu caminho e tornado possível essa conquista.

Aos meus pais e irmão pelo exemplo de vida, apoio e amor incondicional. Tudo que eu sou devo a vocês.

Ao meu esposo por estar sempre ao meu lado me incentivando, me apoiando e me dando forças, pelo grande amor, respeito e companheirismo.

Aos meus familiares, em especial minha avó, pelo apoio e carinho durante minha trajetória.

Aos professores Thales e Natali pela orientação e competência, pelos apoios e ensinamentos, por contribuírem na minha formação profissional e pelos exemplos de profissionais.

À professora Patrícia Brum pela parceria e disponibilização dos animais utilizados na pesquisa, sem esta parceria a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Ney pela paciência e disponibilização de seu tempo para preparar e enviar os animais utilizados neste trabalho.

Ao professor Jader Cruz por receber os animais em seu laboratório e esclarecer as dúvidas que surgiram ao longo do experimento.

Ao professor Leonardo Bonato Félix pela criação dos programas para análise dos parâmetros celulares no Departamento de Engenharia Elétrica da UFV.

Aos professores Paulo Sérgio Lacerda Beirão e Simonton de Andrade Silveira por aceitarem o convite de participar da minha banca.

À Daise pelo cuidado para com os animais e pela realização do ECO e do ECG.

Aos amigos Victor, Lucas, Filipinho, Anselmo, Helton, Miguel, Judson, Marcinha, Luís Henrique, Juliana, Gilton, Felipe Rios, Mateus, Camila, Thamires, Regiane, Joel, Karina, Helder e Claudia pela amizade e momentos de trabalho e de descontração.

Ao Alexandre pelo auxílio e presença durante todo o período experimental e pelo cuidado e atenção para com os animais.

Às minhas grandes amigas Ediane, Lili, Renata e Deyliane pelo apoio e grande amizade.

À Universidade Federal de Viçosa e a todos os funcionários que possibilitaram a realização desse trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma participaram direta ou indiretamente da realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>09</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
3.1. Animais de experimentação e tratamentos.....	10
3.2. Grupos experimentais.....	10
3.3. Capacidade para o exercício.....	11
3.4. Protocolo de treinamento físico.....	11
3.5. Isolamento dos cardiomiócitos.....	12
3.6. Soluções de isolamento.....	13
3.7. Comprimento, largura e volume celular.....	14
3.8. Contração celular.....	15
3.9. Análise estatística.....	17
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Peso corporal.....	19
4.2. Capacidade para o exercício.....	19
4.3. Morfologia celular.....	20
4.4. Contração celular dos grupos C57 e KO $\beta$ 1.....	22
4.5. Contração celular dos grupos FVB e KO $\beta$ 2.....	24
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
5.1. Peso corporal.....	27
5.2. Capacidade para o exercício.....	27
5.3. Morfologia celular.....	28
5.4. Contração celular.....	29
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	- Adenilato ciclase
AEC	- Acoplamento excitação-contração
Akt	- Proteína quinase B
AMPC	- Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	- Análise de variância
ATP	- Trifosfato de adenosina
$\alpha 1$ -AR	- Receptor $\alpha 1$ -adrenérgico
$\alpha$ -AR	- Receptor $\alpha$ -adrenérgico
$\alpha 2a/2c$ -ARs	- Receptores $\alpha 2a/2c$ -adrenérgico
$\alpha$ -MCP	Miosina de cadeia leve
$\beta$	- Beta
$\beta 1$ -AR	- Receptor - $\beta 1$ adrenérgico
$\beta 2$ -AR	- Receptor $\beta 2$ -adrenérgico
$\beta 3$ -AR	- Receptor $\beta 3$ -adrenérgico
$\beta$ -AR	- Receptor $\beta$ -adrenérgico
C57	- Camundongos da linhagem C57BL/6J
$Ca^{2+}$	- Íon Cálcio
CaCl	- Cloreto de cálcio
CO	- Camundongos do grupo controle
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DC	- Débito cardíaco
DKO	- Camundongos com inativação gênica dos receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ -adrenérgicos
EGTA	- Ácido etilenoglicol tetracético
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	- Erro padrão da média
FC	- Frequência cardíaca
FLB	- Fosfolambam
FLB <sub>Ser16</sub>	- Fosfolambam fosforilada no resíduo de serina 16
FVB	- Camundongos da linhagem FVB/N
GDP	- Guanosina difosfato
G <sub>i</sub>	- Proteína G inibitória
GPCRs	- Receptores acoplados à proteína G
GRK	- Receptor de quinase acoplado à proteína G
G <sub>s</sub>	- Proteína G estimulatória
GTP	- Guanosina trifosfato
G $\alpha$	- Subunidade G $\alpha$ da proteína G
G $\beta$	- Subunidade G $\beta$ da proteína G
G $\beta\gamma$	- Dímero G $\beta\gamma$ da proteína G
G $\gamma$	- Subunidade G $\gamma$ da proteína G
HCl	- Ácido clorídrico
HEPES	- Ácido etanosulfônico-hidroxietil piperazina
Hz	- Hertz (frequência)
I/R	- Isquemia/reperfusão
IC	- Insuficiência cardíaca
IM	- Infarto do miocárdio
ISO	- Isoproterenol
K <sup>+</sup>	- Íon Potássio



KCl	- Cloreto de potássio
KO	- <i>Knockout</i>
KO $\beta$ 1	- Camundongos com inativação gênica dos receptores $\beta$ 1-adrenérgicos
KO $\beta$ 2	- Camundongos com inativação gênica dos receptores $\beta$ 2-adrenérgicos
$\mu$	- Média aritmética de uma população de dados
MgCl <sub>2</sub>	- Cloreto de magnésio
MyBP-C	- Proteína C de ligação à miosina
n	- Número de animais
Na <sup>+</sup>	- Íon Sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Fosfato monossódico
NaOH	- Hidróxido de sódio
NCX	- Canais trocadores de Na <sup>+</sup> e Ca <sup>2+</sup>
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub>	- Oxigênio
PC	- Peso corporal
PI3K	- Fosfatidilinositol 3 quinase
PKA	- Proteína quinase A
PM	- Peso Molecular
PP1	- Fosfatase 1
PTX	- Toxina pertussis
PVN	- Núcleo paraventricular
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	- RNA mensageiro
RS	- Retículo sarcoplasmático
RyR2	- Canais receptores de rianodina do tipo 2
s <sup>2</sup>	- Variância em uma amostra de dados
SERCA2a	- Isoforma cardíaca da Ca <sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático
$t_{\alpha:gl}$	- Tabela de valores críticos da distribuição <i>t</i> de Student
TG	- Transgênico
TKO	- Camundongos com inativação gênica dos receptores $\beta$ 1, $\beta$ 2- e $\beta$ 3-adrenérgicos
TnI	- Troponina I
VM	- Velocidade máxima
VO <sub>2max</sub>	- Volume máximo de oxigênio
X	- Uma variável qualquer, geralmente quantitativa

## RESUMO

RODRIGUES, Aurora Corrêa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014. **Efeitos do treinamento físico sobre as propriedades morfológicas e mecânicas em cardiomiócitos de camundongos *knockout* para os receptores  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-adrenérgicos.** Orientador: Thales Nicolau Primola Gomes. Co-orientadores: Antônio José Natali e Daise Nunes Queiroz da Cunha.

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do treinamento físico sobre as propriedades morfológicas e mecânicas de cardiomiócitos de camundongos *knockout* (KO) para receptores os  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-adrenérgicos. Camundongos C57BL/6J, KO para os receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos, FVB/N e KO para os receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos com 4 meses de idade, foram inicialmente separados aleatoriamente em 8 grupos: C57c, C57t, KO  $\beta$ 1c, KO  $\beta$ 1t, FVBc, FVBt, KO  $\beta$ 2c e KO  $\beta$ 2t. Os animais dos grupos treinados (C57t, KO  $\beta$ 1t, FVBt, KO  $\beta$ 2t) foram submetidos a um protocolo de treinamento aeróbico de 8 semanas, 5 dias por semana, 1 hora por dia, com intensidade de 60% da velocidade máxima de corrida. 3 a 4 animais de cada grupo foram separados para a análise de contração celular com perfusão do agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (ISO) [100nM]. Após a eutanásia, os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foram isolados por dispersão enzimática. O comprimento e a largura dos cardiomiócitos foram medidos utilizando um sistema de captação de imagens e o volume celular foi calculado. As contrações celulares foram medidas através da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos, após estimulação elétrica a 1 Hz, em temperatura controlada à 37°C, usando-se um sistema de detecção de bordas. Os resultados mostraram que os camundongos KO  $\beta$ 1 apresentaram menor comprimento celular comparados aos C57. O grupo KO  $\beta$ 2t apresentou maior comprimento celular comparado ao grupo KO  $\beta$ 2c. O protocolo de treinamento aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos dos animais KO  $\beta$ 1t e KO  $\beta$ 2t. O ISO não alterou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e de relaxamento nos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta$ 1+ISO, já os animais KO  $\beta$ 2+ISO apresentaram aumento nas mesmas propriedades mecânicas. Conclui-se que o protocolo de treinamento aeróbico: a) aumentou as propriedades mecânicas dos cardiomiócitos dos animais KO  $\beta$ 1 e KO  $\beta$ 2; b) aumentou o comprimento dos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta$ 2; c) associado ao ISO não alterou as propriedades mecânicas nos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta$ 1 e reduziu nos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta$ 2.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Aurora Corrêa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2014. **Effects of exercise training on the morphological and mechanical properties in cardiomyocytes from  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors knockout mice.** Adviser: Thales Nicolau Prímola Gomes. Co-advisers: Antônio José Natali and Daise Nunes Queiroz da Cunha.

The aim of this study was to investigate the effects of endurance training on cardiovascular parameters and morphological and mechanical properties of isolated cardiomyocytes from the left ventricle of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors knockout mice. 4 months old C57BL/6J,  $\beta$ 1-adrenergic receptor knockout (KO  $\beta$ 1), FVB/N and  $\beta$ 2-adrenergic receptor knockout (KO  $\beta$ 2) mice were randomly allocated into one of the 8 groups: C57c, C57t, KO  $\beta$ 1c, KO  $\beta$ 1t, FVBc, FVBt, KO  $\beta$ 2c e KO  $\beta$ 2t. The animals of the trained groups (C57t, KO  $\beta$ 1t, FVBt, KO  $\beta$ 2t) underwent a protocol of aerobic training 8 weeks, 5 days/week, 1 hour/day, intensity of 60% of maximal speed. 3 to 4 animals in each group were divided for the analysis of cellular contraction with infusion of  $\beta$ -adrenergic agonist isoproterenol (ISO) [100nM]. At sacrifice, the heart was removed and left ventricular myocytes were enzymatically dispersed. Cell length and width were measured using an image capture system and cell volume was calculated. Myocytes were stimulated at 1 Hz at controlled temperature (37°C) and cell contractility was measured by using an edge detection system. The results showed that KO  $\beta$ 1 mice showed lower cell length compared to C57. The KO  $\beta$ 2t group showed higher cell length compared to the KO  $\beta$ 2c group. The training protocol increased the contraction amplitude, maximum contraction velocity and maximum relaxation velocity of cardiomyocytes of KO  $\beta$ 1t and KO  $\beta$ 2t animals. The ISO did not alter the amplitude of contraction, maximum contraction velocity and maximum relaxation velocity of cardiomyocytes from KO  $\beta$ 1+ISO animals, while the KO  $\beta$ 2+ISO animals showed an increase in the same mechanical properties. It is concluded that the aerobic training protocol: a) increased the mechanical properties of cardiomyocytes from KO  $\beta$ 1t and KO  $\beta$ 2t animals; b) increased the length of cardiomyocytes from  $\beta$ 2 KO mice; c) associated with the ISO did not alter the mechanical properties of cardiomyocytes from KO  $\beta$ 1mice and reduced of cardiomyocytes from KO  $\beta$ 2 mice.

## 1. INTRODUÇÃO

Há nove subtipos de receptores adrenérgicos identificados por clonagem molecular, incluindo três  $\beta$ -ARs ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) e seis  $\alpha$ -ARs ( $\alpha_1A$ ,  $\alpha_1B$ ,  $\alpha_1D$ ,  $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$ ,  $\alpha_2C$ ) (Bylund *et al.*, 1994). No coração os dois principais receptores adrenérgicos são os  $\beta$ -ARs e os  $\alpha_1$ -ARs, que representam 90% e 10% dos receptores adrenérgicos presentes no coração, respectivamente (O'connell *et al.*, 2014). Os seis subtipos de receptores adrenérgicos expressos nos cardiomiócitos são  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - e  $\beta_3$ -ARs e  $\alpha_1A$ -,  $\alpha_1B$ - e  $\alpha_1D$ -ARs (Hein e Kobilka, 1997).

Para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na via de sinalização adrenérgica e na fisiopatologia da insuficiência cardíaca (IC), estudos utilizam de modelo animal geneticamente modificado, transgênico (TG) ou *knockout* (KO) (Naga Prasad *et al.*, 2001; Brum *et al.*, 2006). A deleção genética de um subtipo de receptor permite criar respostas precisas sobre sua função específica em condições que frequentemente não é possível utilizando agonistas farmacológicos, devido a falta de seletividade suficiente para o subtipo específico (Rohrer *et al.*, 1996; Chruscinski *et al.*, 2001). A caracterização fenotípica das manipulações genéticas, em animais intactos e/ou em cardiomiócitos isolados, proporciona novos conhecimentos a respeito da função cardíaca (Izumo e Shioi, 1998; Kadambi e Kranias, 1998). Como exemplo, o camundongo KO para os  $\beta_1$ -ARs foi um modelo utilizado para demonstrar que este subtipo de  $\beta$ -AR é o maior responsável pelos efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivo no coração sob estímulo agonista não seletivo (Rohrer *et al.*, 1996).

Embora os  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -ARs sejam funcionalmente e estruturalmente mais semelhantes entre si, do que com os  $\beta_3$ -ARs (Devic *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2002), as evidências demonstram que há diferenças nos papéis dos subtipos de  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -ARs na função e na estrutura cardíaca (Bristow *et al.*, 1986; Bernstein *et al.*, 2005).

Embora a razão entre o  $\beta_1$ - e o  $\beta_2$ -AR possa variar entre as espécies, a sinalização do  $\beta_2$ -AR é específica da espécie e dependente da idade e do estágio de desenvolvimento (Xiao *et al.*, 1999; Xiang e Kobilka, 2003). Os subtipos de  $\beta_1$ - e  $\beta_2$ -ARs apresentam uma razão de 70-80%:20-30%, respectivamente, nos ventrículos de humano (Wallukat, 2002), similar aos camundongos que apresentam razão de 75:25% (Brodde, 1999). Na IC a razão passa para 60:38%, respectivamente (Bristow *et al.*, 1986).

O  $\beta$ 1-AR é o subtipo de receptor adrenérgico predominante no coração em termos de densidade e de modulação da contração cardíaca (Bristow *et al.*, 1986; Zhu *et al.*, 2001). Este receptor exerce papel dominante no aumento do cronotropismo e do inotropismo nos cardiomiócitos. Em roedores, a ativação do  $\beta$ 1-AR no tecido cardíaco é responsável, em grande parte, pelo aumento da contração (inotropismo), frequência cardíaca (cronotropismo) e velocidade de relaxamento (lusitropismo) (Xiang e Kobilka, 2003). Já o  $\beta$ 2-AR produz menor efeito cronotrópico e inotrópico (Zhu *et al.*, 2001; Xiang, 2011).

O  $\beta$ 2-AR foi considerado o principal subtipo de  $\beta$ -AR vascular (Chruscinski *et al.*, 2001), desempenhando um importante papel no relaxamento vascular periférico (Chruscinski *et al.*, 1999) e contribuindo para a distribuição do fluxo sanguíneo para diferentes tecidos.

O  $\beta$ 3-AR tem sido detectado no coração de humanos e de murinos, embora em menor nível que os  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs. O papel fisiológico deste receptor na regulação da função cardíaca é menos conhecido, porém sabe-se que a estimulação dos  $\beta$ 3-ARs nos ventrículos de humano reduz a força de contração dos cardiomiócitos por um mecanismo dependente da proteína G inibitória ( $G_i$ ) (Zhu *et al.*, 2001; Calvert e Lefer, 2013).

Os  $\beta$ -ARs pertencem à grande família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs – *guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor*), receptores compostos de sete domínios transmembrânicos. Eles realizam a interface entre o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema cardiovascular (Bernstein *et al.*, 2005). Na presença extracelular do ligante, os GPCRs alteram sua conformação e, conseqüentemente, recrutam e estimulam a proteína G, que é heterotrímica e apresenta três subunidades:  $G_\alpha$ ,  $G_\beta$  e  $G_\gamma$  (Rockman *et al.*, 2002; Kobilka, 2007).

No seu estado inativo a subunidade  $G_\alpha$  permanece acoplada à guanosina difosfato (GDP) e quando ativada acopla-se à guanosina trifosfato (GTP). O acoplamento à GTP desencadeia a dissociação da subunidade  $G_\alpha$  do dímero  $G_\beta\gamma$  (Rockman *et al.*, 2002; Katz, 2003). Assim,  $G_\alpha$ -GTP e  $G_\beta\gamma$  podem ativar diferentes cascatas de sinalização. Essas subunidades amplificam e propagam sinais intracelulares, modulando a atividade de uma ou mais moléculas efetoras, como a adenilato ciclase (AC) (Clapham e Neer, 1997; Pitcher *et al.*, 1998; Ferrara *et al.*, 2014). A atividade das moléculas efetoras regula a concentração intracelular de moléculas conhecidas como “segundo mensageiro”, que induzem respostas celulares aos agonistas ligados aos receptores (Pitcher *et al.*, 1998).

As catecolaminas ativam os  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs acoplados à proteína G estimulatória (Gs), que irá ativar a AC. Quando ativada, a AC catalisa a adenosina trifosfato (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Este segundo mensageiro liga-se e ativa a proteína quinase A (PKA) dependente de AMPC. A PKA, por sua vez, fosforila diversas proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração dos cardiomiócitos (Xiao *et al.*, 1999; Bers, 2002; Foerster *et al.*, 2003; Katz, 2003; Xiang e Kobilka, 2003; Ferrara *et al.*, 2014), como mostra a figura 1.

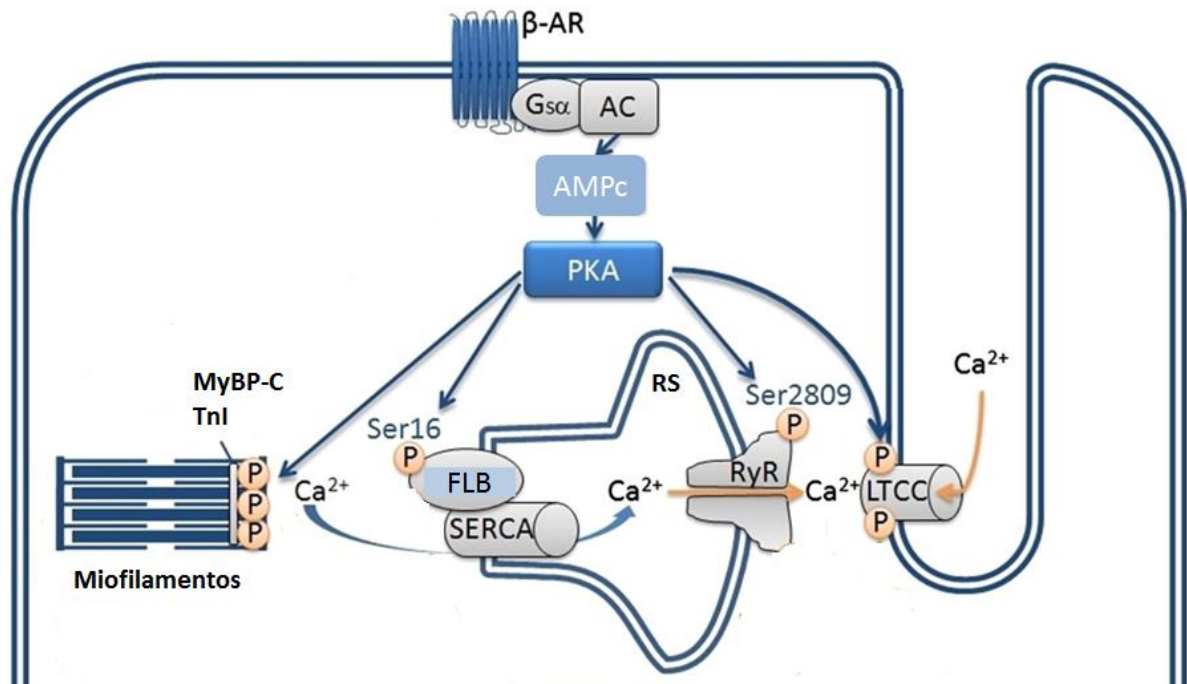


Figura 1: A via de sinalização  $\beta$ -adrenérgica nos cardiomiócitos. Receptor  $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ -AR); proteína estimulatória (Gsa); adenilato ciclase (AC); monofosfato de adenosina cíclico (AMPC); proteína quinase A (PKA); canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L (LTCC); retículo sarcoplasmático (RS); receptor de rianodina (RyR); resíduo serina 2809 (Ser2809); proteína C de ligação à miosina (MyBP-C); troponina I (TnI); resíduo serina 16 (Ser16); fosfolambam (FLB); ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (SERCA). Adaptado de Grimm e Brown (2010).

A ativação  $\beta$ -adrenérgica acarreta em: 1) aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L e dos receptores de rianodina tipo 2 (RyR2) (Katz, 2003; Xiang e Kobilka, 2003; Bers, 2008); 2) aceleração da recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático (RS), através da fosfolambam (FLB) e da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do RS (SERCA2a) (Mundina-Weilenmann *et al.*, 1996; Xiang e Kobilka, 2003); 3) redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ , por meio da troponina I (TnI) e da proteína C de ligação à miosina (MyBP-C) (Bers, 2002; Xiang e Kobilka, 2003).

Quando ativado, o  $\beta$ 2-AR pode acoplar-se também a proteína Gi, subunidade da proteína G que inibe a ativação da AC nos cardiomiócitos (Xiang e Kobilka, 2003). O acoplamento bifásico dos  $\beta$ 2-ARs sob estímulo agonista apresenta acoplamento predominante à proteína Gs no início da estimulação, seguido de acoplamento à proteína Gi (Devic *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2002). Entretanto, o rompimento do acoplamento dos  $\beta$ 2-ARs à proteína Gi com toxina pertussis (PTX) aumentou a estimulação da AC (Kilts *et al.*, 2000) e a fosforilação de FLB no resíduo serina 16 (FLB<sub>Ser16</sub>), levando a um lusitropismo positivo em cardiomiócitos de ratos (Kuschel *et al.*, 1999b). A ação cardioprotetora dos  $\beta$ 2-ARs pode estar relacionada com sua capacidade de ativar a via de sinalização Gi-G $\beta\gamma$ -PI3K-Akt (Chesley *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001; Fujita e Ishikawa, 2011; Cannavo *et al.*, 2013). Um estudo observou que a estimulação dos  $\beta$ 2-ARs aumentou a atividade de PI3K e a ativação de Akt, o que promoveu a sobrevivência dos cardiomiócitos (Fujio *et al.*, 2000). A resposta cardioprotetora dos  $\beta$ 2-ARs se opõe a apoptose induzida pela via de sinalização dos  $\beta$ 1-ARs (Communal *et al.*, 1999; Bernstein, 2003). Estudos observaram que a estimulação dos  $\beta$ 1-ARs com o agonista não seletivo isoproterenol (ISO) causou disfunção cardíaca e aumento na apoptose de cardiomiócitos em camundongos KO para os  $\beta$ 2-ARs (Zhu *et al.*, 2003; Patterson *et al.*, 2004).

A expressão 60 vezes maior nos níveis endógenos de  $\beta$ 2-ARs levou a um efeito inotrópico positivo a longo prazo, porém níveis de expressão acima de 100 vezes desencadeou IC e morte prematura (Liggett *et al.*, 2000). Por outro lado, a expressão 5 vezes maior nos níveis endógenos de  $\beta$ 1-ARs foi suficiente para desencadear IC em poucas semanas (Engelhardt *et al.*, 1999).

Estudos apontam que reduzir a ativação dos  $\beta$ 1-ARs e aumentar a regulação da via de sinalização  $\beta$ 2-AR/Gi na hipertrofia cardíaca compensatória ou no estágio inicial da IC pode representar um mecanismo cardioprotetor (Xiang e Kobilka, 2003). Entretanto, cabe ressaltar que a sinalização excessiva de  $\beta$ 2-AR/Gi pode atenuar o suporte contrátil mediado pela proteína Gs, contribuindo para o fenótipo de IC descompensada (Xiang e Kobilka, 2003).

No estágio de compensação da IC, ocorre a dessensibilização e a redução dos  $\beta$ -ARs. A dessensibilização é um importante mecanismo dos GPCRs que refere-se a uma variedade de processos nos quais a interação do receptor com a proteína G é prejudicada, levando a redução na resposta celular as catecolaminas (Hein e Kobilka, 1997). Esse processo de

dessensibilização é uma resposta adaptativa ao elevado nível de catecolaminas na IC (Engelhardt, 2005).

Os receptores de quinase acoplados à proteína G (GRK - *G protein-coupled receptor kinases*), membros da família quinase dos GPCRs, estão envolvidos na dessensibilização dos  $\beta$ -ARs (Briston *et al.*, 2011). O GRK fosforila os GPCRs ligados ao agonista e aumenta a afinidade destes receptores à proteína  $\beta$ -arrestina, que desacoplará o  $\beta$ -AR da proteína G através da internalização dos receptores (Rockman *et al.*, 2002; Cannavo *et al.*, 2013). Esse processo previne mais ativações das proteínas Gs e a subsequente estimulação de AC, o que levaria a uma responsividade reduzida dos  $\beta$ -ARs às catecolaminas (Lefkowitz, 1998; Pitcher *et al.*, 1998). Hipotetiza-se que a dessensibilização dos  $\beta$ -ARs na hipertrofia cardíaca e na IC é ocasionada, em partes, por níveis elevados de GRK2, um GRK expresso no coração (Choi *et al.*, 1997).

Estudos recentes têm observado o papel benéfico dos  $\alpha$ 1-ARs na função cardíaca, principalmente na condição de comprometimento da via de sinalização  $\beta$ 1-adrenérgica (Korzick *et al.*, 2004). Oposto aos  $\beta$ 1-ARs que sofrem dessensibilização, a sinalização dos  $\alpha$ 1-ARs é elevada na IC e desempenha um papel cardioprotetor por ativar uma hipertrofia fisiológica, prevenir a apoptose celular e aumentar a função contrátil na IC (Wang *et al.*, 2010; O'connell *et al.*, 2014). A via de sinalização dos  $\alpha$ 1-ARs no coração permanece a ser esclarecida. Em condição fisiológica normal o nível de expressão desses receptores é baixo, o que dificulta a definição de sua função cardíaca (Mohl *et al.*, 2011).

O uso de  $\beta$ -bloqueadores é uma estratégia terapêutica farmacológica reconhecida, que protege os cardiomiócitos do estímulo adrenérgico excessivo (Mann, 1998). Os resultados de diversos estudos comprovando a eficácia dos  $\beta$ -bloqueadores no tratamento da IC dão suporte à inclusão destes medicamentos em muitas diretrizes de tratamento a IC (Barrese e Tagliatela, 2013). Por outro lado, o treinamento físico é considerado uma estratégia terapêutica não farmacológica, por seu efeito benéfico em nível sistêmico e local nos músculos esqueléticos, no sistema vascular periférico, no coração e no sistema nervoso autônomo (Snoek *et al.*, 2013). Além disso, o treinamento é capaz de reduzir os fatores de risco associados a doenças cardiovasculares (Powers *et al.*, 2002).

Em pacientes com IC o treinamento físico melhorou a tolerância ao exercício e a qualidade de vida, além de reduzir a taxa de hospitalização (Mcmurray *et al.*, 2012). Em 12 semanas de treinamento aeróbico contínuo ou intervalado pacientes com IC apresentaram



melhora na capacidade aeróbica, aumento na resposta cronotrópica e redução no tempo de recuperação da FC pós-exercício. Os resultados de resposta cronotrópica e de recuperação da FC indiretamente demonstram o efeito benéfico do treinamento no tônus autonômico de indivíduos com IC (Dimopoulos *et al.*, 2006).

O treinamento físico desempenha um papel oposto ao da IC sobre a atividade do sistema nervoso autônomo, aumentando o tônus vagal e reduzindo a atividade simpática em repouso, o que pode contribuir para a saúde cardiovascular (Goldsmith *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2003; Billman, 2006; 2009; Piepoli *et al.*, 2010; Leosco *et al.*, 2013).

Estudos observaram que o treinamento de 3-4 semanas reduziu a atividade simpática em ratos com IC por meio da normalização dos níveis de angiotensina II no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo, região que medeia a atividade nervosa simpática (Zheng *et al.*, 2012; Llewellyn *et al.*, 2014). O elevado nível de angiotensina II pode causar aumentos nas respostas simpática e hemodinâmica (Llewellyn *et al.*, 2014).

O treinamento também pode ter efeito cardioprotetor por meio da estimulação dos  $\beta$ -ARs. No exercício agudo a estimulação desses receptores via catecolaminas é elevada (Calvert *et al.*, 2011). Existem evidências da participação dos  $\beta$ -ARs na atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Aragon *et al.*, 2011; Calvert *et al.*, 2011). Um estudo observou que após 4 semanas de exercício voluntário, camundongos com injúria por isquemia/reperfusão (I/R) apresentaram alterações no estado de fosforilação da eNOS através dos  $\beta$ -ARs, o que levou ao aumento na produção de ON e de seus metabólitos (nitrito e nitrosotiol) (Calvert *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que o treinamento pode desempenhar um papel cardioprotetor por meio da estimulação dos  $\beta$ -ARs e, conseqüentemente, do aumento na biodisponibilidade de NO.

Os benefícios do treinamento físico na função cardíaca estão relacionados, pelo menos em partes, à alterações na expressão das proteínas envolvidas na homeostase de  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos (Brum *et al.*, 2011; Locatelli *et al.*, 2013).

Um protocolo de treinamento aeróbico de 10 semanas foi capaz de reverter a redução na densidade dos  $\beta$ -ARs e na produção de AMPc em cardiomiócitos de ratos com IC pós-isquemia, além de reduzir a superexpressão de GRK2 no grupo IC treinado (Leosco *et al.*, 2008). Um estudo utilizando um protocolo de treinamento de 12 semanas em esteira, com ratas SHR também observou redução na GRK2, melhoras na sinalização e responsividade dos

$\beta$ -ARs e aumentos nas proteínas envolvidas na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  (Macdonnell *et al.*, 2005). O exercício voluntário de 8 semanas aumentou a produção de AMPc em camundongos pós-IM (De Waard *et al.*, 2007).

Em cardiomiócitos de ratos treinados saudáveis e pós-IM submetidos a um protocolo de treinamento aeróbico intervalado foi observado redução no tempo para o pico e para 50% do relaxamento, aumento na expressão de SERCA2a e na sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Wisloff *et al.*, 2002). Com o mesmo protocolo de treinamento foi observado aumento na contração, na amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  e na atividade de SERCA2a, bem como redução na atividade de NCX e no vazamento de  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico do RS nos cardiomiócitos atriais de ratos com IC pós-IM treinados (Johnsen *et al.*, 2013). O treinamento também aumentou a fração de encurtamento nos ratos com IC pós-IM (Kraljevic *et al.*, 2013). Esses resultados indicam que o treinamento pode reverter a disfunção cardíaca ocasionada pela IC pós-IM.

Em camundongos KO para  $\alpha 2a/2c$ -ARs, um modelo genético de IC induzida por hiperatividade simpática, o protocolo de treinamento de 8 semanas de natação melhorou a intolerância ao exercício e a fração de encurtamento, prevenindo a disfunção sistólica, além de reduzir a FC basal, opondo-se à taquicardia observada no grupo KO controle (Medeiros *et al.*, 2008). Quanto às proteínas envolvidas na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ , o treinamento aumentou a expressão de SERCA2a e de  $\text{FLB}_{\text{Ser16}}$ , e a razão SERCA2a:NCX (Medeiros *et al.*, 2008).

No mesmo modelo animal, o treinamento aeróbico de intensidade moderada em esteira melhorou a tolerância ao exercício e a função sistólica, aumentou a expressão de SERCA2a e de  $\text{FLB}_{\text{Ser16}}$  e  $\text{Thr17}$  e reduziu a expressão de NCX e de fosfatase 1 (PP1) (Rolim *et al.*, 2007). Os resultados deste estudo indicaram que a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  foi prejudicada neste modelo de IC e a melhora na função ventricular induzida pelo treinamento foi associada à alterações nas proteínas envolvidas na homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  dos cardiomiócitos (Rolim *et al.*, 2007).

Em um estudo mais recente, camundongos KO para  $\alpha 2a/2c$ -ARs treinados apresentaram aumento na fosforilação de  $\text{FLB}_{\text{Ser16}}$  e redução no tempo de decaimento do  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico (Vanzelli *et al.*, 2013). Esses resultados sugeriram que o aumento na fosforilação de FLB pode levar à maior recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA2a, como indicado pela tempo de decaimento de  $\text{Ca}^{2+}$  diastólico mais rápido no grupo KO treinado (Vanzelli *et al.*, 2013).

Até onde vai nosso conhecimento, nenhum estudo verificou o efeito do treinamento sobre a função e a estrutura cardíaca de camundongos KO para  $\beta$ -ARs. Apenas sabe-se que durante

o exercício agudo camundongos KO para os  $\beta$ 1-ARs e DKO para os  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs foram capazes de responder à demanda aeróbica mesmo na ausência dos receptores, indicando que o estímulo cronotrópico e inotrópico por meio dos  $\beta$ -ARs não foi fundamental durante exercício máximo (Rohrer *et al.*, 1999). Assim, o presente estudo hipotetizou que as propriedades morfológicas e mecânicas de cardiomiócitos isolados estariam reduzidas em camundongos KO para os  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs, e que o treinamento físico promoveria alterações nestas propriedades.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento físico sobre as propriedades morfológicas e mecânicas em cardiomiócitos de camundongos *knockout* para os receptores  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-adrenérgicos.

### 2.2 Objetivos Específicos:

Verificar se o protocolo de corrida em esteira, de intensidade moderada, alteraria:

- A morfologia dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo;
- A amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo;
- O tempo para 50% do pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo;
- A amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo sob estímulo de agonista não seletivo para receptores  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol);
- O tempo para 50% do pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo sob estímulo de agonista não seletivo para receptores  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol);

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais de experimentação e tratamentos

Foram utilizados camundongos machos com 3 a 4 meses de idade, sendo da linhagem C57BL/6J: 29 selvagens e 28 KO  $\beta$ 1; e da linhagem FVB/N: 29 selvagens e 34 KO  $\beta$ 2. Os animais usados no presente estudo foram provenientes do Biotério do Laboratório de Fisiologia Celular e Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFEUSP) - SP. Os camundongos foram alojados em gaiolas individuais, receberam água e ração comercial *ad libitum*, sendo mantidos em ambiente com temperatura média controlada de 22°C e regime de luminosidade de claro/escuro de 12 horas. Os animais foram pesados no primeiro dia de cada semana, utilizando uma balança eletrônica digital (Marte – Brasil, modelo AS5500C).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob supervisão de uma médica veterinária (CRMV – SP 26.410). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa sob o protocolo nº 59/2012.

#### 3.2. Grupos experimentais

O número de animais foi calculado a partir da fórmula:  $n = \frac{s^2}{(x-\mu)^2} \times (t_{\alpha;gl})^2$  (Callegari-Jacques, 2003), onde: n – número de animais;  $s^2$  – variância em uma amostra de dados; x – uma variável qualquer;  $\mu$  – média aritmética de uma população de dados;  $t_{\alpha;gl}$  – tabela de valores críticos da distribuição *t* de Student. O desvio-padrão da amplitude de contração em cardiomiócitos do estudo de Tang et al. (2010) e a média do mesmo parâmetro do estudo de Cheng et al. (2012), para o nível de significância e o grau de liberdade adotamos, respectivamente, 95% ( $\alpha=0,05$ ) e a fórmula  $(n - 1)$ . Visto que não conhecíamos o “n”, utilizamos um “n0” (n inicial)= 16, baseado no estudo de Cheng et al. (2012).

Os animais foram separados aleatoriamente em 8 grupos, a saber:

- 1) Grupo Controle C57BL/6J (C57c, n= 14): camundongos que não foram submetidos ao treinamento;
- 2) Grupo Exercitado C57BL/6J (C57t; n= 15): camundongos que foram submetidos ao treinamento;

- 3) Grupo Controle  $\beta$ 1KO (KO $\beta$ 1c; n= 14): camundongos que não foram submetidos ao treinamento;
- 4) Grupo Exercitado  $\beta$ 1KO (KO $\beta$ 1t; n= 14): camundongos que foram submetidos ao treinamento;
- 5) Grupo Controle FVB (FVBc; n= 13): camundongos que não foram submetidos ao treinamento;
- 6) Grupo Exercitado FVB (FVBt; n= 16): camundongos que foram submetidos ao treinamento;
- 7) Grupo Controle  $\beta$ 2KO (KO $\beta$ 2c; n= 16): camundongos que não foram submetidos ao treinamento;
- 8) Grupo Exercitado  $\beta$ 2KO (KO $\beta$ 2t; n= 18): camundongos que foram submetidos ao treinamento;

Posteriormente, 3 a 4 animais de cada grupo foram separados para a análise de contratilidade celular com perfusão de ISO.

### **3.3. Capacidade para o exercício**

A capacidade para o exercício dos animais foi medida pela distância total percorrida, avaliada por um protocolo de exercício progressivo em esteira (Panlab/Harvard Apparatus), como previamente descrito (Ferreira *et al.*, 2007). O teste foi realizado em todos os grupos experimentais antes e após o período de treinamento.

Após 1 semana de adaptação à esteira, com 10 minutos cada sessão, os animais foram colocados nas baias 30 minutos antes do início do teste. A intensidade do exercício foi aumentada em 3m/min a cada 3 minutos, iniciando em 6m/min, com 0% inclinação até a exaustão, quando o animal não conseguia manter a corrida de acordo com a velocidade da esteira. O teste foi realizado antes e após o protocolo experimental para estimar a capacidade de exercício. Na 4ª semana de treinamento foi realizado o mesmo teste para ajustar a intensidade de treinamento dos animais treinados (C57t, KO $\beta$ 1t, FVBt e KO $\beta$ 2t). A intensidade do treinamento de cada grupo foi determinada pela média do respectivo grupo.

### **3.4. Protocolo de treinamento físico**

Com 4 meses de idade os animais dos grupos C57t, KO $\beta$ 1t, FVBt e KO $\beta$ 2t foram submetidos a um protocolo de treinamento de corrida de intensidade moderada, como previamente descrito (Oliveira *et al.*, 2009). O treinamento consistiu de 8 semanas de corrida em uma esteira rolante (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil), 5 dias por semana, por 60 minutos. A velocidade e o tempo foram progressivamente aumentados até alcançar 60% da velocidade máxima e 60 minutos na 2ª semana de treinamento. O protocolo de treinamento está representado na tabela 1.

O treinamento físico foi realizado no Laboratório de Biologia do Exercício (BIOEX) do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1. Protocolo de treinamento:

Primeira Semana				
2ª feira	3ª feira	4ª feira	5ª feira	6ª feira
10% da VM	20% da VM	30% da VM	40% da VM	50% da VM
10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
Segunda Semana				
60% da VM	60% da VM	60% da VM	60% da VM	60% da VM
60 min	60 min	60 min	60 min	60 min
Terceira Semana – Quarta Semana (2ª feira a 4ª feira)				6ª feira
60% da VM				AJUSTE DE INTENSIDADE
60 min				
Quinta Semana – Oitava Semana				
60% da VM	60% da VM	60% da VM	60% da VM	60% da VM
60 min	60 min	60 min	60 min	60 min

VM = velocidade máxima

### 3.5. Isolamento dos cardiomiócitos

Após 48 horas da última sessão de treinamento, os animais foram pesados e sacrificados por decapitação. Em seguida, para a remoção cirúrgica do coração, os pelos da região torácica foram removidos e o esterno foi pinçado, abaixo foi realizado o corte sentido a axila, e então o esterno foi rebatido para cima. Após a exposição da cavidade torácica, o timo foi deslocado da caixa torácica e retirado juntamente com os pulmões e coração. O tecido foi depositado em

um recipiente com a Solução *EGTA* livre de cálcio contendo *ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA)* (Solução 1).

Após este procedimento o coração foi transferido para uma placa de petri, a artéria aorta ascendente foi seccionada com uma tesoura de microcirurgia na altura de sua segunda ramificação (tronco braquicefálico), fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), e acoplada a uma seringa de 1 mL com a solução *EGTA* (Solução 1), para a remoção do sangue nos vasos coronários. A agulha foi então fixada a um sistema de *Langendorff* caseiro (37°C), com controle manual da perfusão por meio de uma torneira.

Para o isolamento dos cardiomiócitos o coração foi perfundido com a solução *EGTA* (Solução 1), em um fluxo constante, durante 6 minutos, até que os vasos coronários estivessem totalmente limpos de sangue, a fim de destruir as bandas escalariformes entre os cardiomiócitos. Posteriormente, foi perfundido a Solução Enzimática (Solução 2), contendo 10mg/mL de colagenase tipo II (Worthington, EUA) e 0,8 μM de CaCl<sub>2</sub>, durante 10 minutos, para destruir as fibras colágenas extracelulares. Todas as soluções foram oxigenadas (O<sub>2</sub> 100% – White Martins, Brasil) e mantidas em temperatura de 37°C.

Após a perfusão os ventrículos foram separados dos átrios, e posteriormente o ventrículo esquerdo foi separado do ventrículo direito. Por sua vez, o ventrículo esquerdo foi aberto na região do septo interventricular e picotado (cortado em pequenos pedaços). Em seguida, o tecido foi transferido para um tubo falcon contendo 10 mL da Solução Enzimática (colagenase) (Solução 2). O tecido foi disperso por uma pipeta de transferência durante 3 minutos, em “banho-maria” a 37°C. A seguir, o conteúdo do tubo foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 30s. O sobrenadante foi removido e as células foram suspensas na Solução Lavado 1 (Solução 3) contendo 2,5 μM de CaCl<sub>2</sub>. Esse procedimento foi repetido com a Solução Lavado 2 (Solução 4) contendo 5 μM de CaCl<sub>2</sub>. Por último as células foram armazenadas em Solução Estoque (Solução 5) contendo 10 μM de CaCl<sub>2</sub>, a temperatura ambiente, até serem utilizadas. Os registros foram sempre feitos entre uma e três horas após o isolamento.

### **3.6. Soluções de isolamento**

As soluções utilizadas para o isolamento dos cardiomiócitos ventriculares foram feitas utilizando-se uma solução *Tyrode* (estoque concentrada 10X) com água milli-Q e a seguinte



composição (em mM) para 500ml: NaCl (130) – 37,986 g; KCl (5,4) – 2,015 g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4) – 0,240 g; MgCl<sub>2</sub> (1,43) – 2,5 ml; (HEPES) (25) – 29,785 g; pH = 7,4; dividida em alíquotas de 25ml e armazenada em congelador à -20°C.

Para o dia do isolamento dos cardiomiócitos foi preparada a solução *Tyrode* básica, que consistia da *Tyrode* (estoque concentrada 10X) com milli-Q e a seguinte composição para 250ml: glicose (22mM) – 0,991 g; insulina (0,01µg/ml) - 25µL; pH = 7,4 com NaOH; armazenada em temperatura -5°C.

- **SOLUÇÃO EGTA (SOLUÇÃO 1):** Para se fazer a solução *EGTA*, foram adicionados 57,5µL de HEPES-EGTA (1 M) em 25 mL da solução *Tyrode* básica.
- **SOLUÇÃO ENZIMÁTICA (SOLUÇÃO 2):** Para a solução enzimática, foram adicionados 10 mg de colagenase e 0,8 µL de CaCl<sub>2</sub> (1 M) em 15 ml da solução *Tyrode* básica.
- **SOLUÇÃO LAVADO 1 (SOLUÇÃO 3):** Para a solução lavado 1, foram adicionados 2,5 µL de CaCl<sub>2</sub> (1 M) em 10 ml da solução *Tyrode* básica.
- **SOLUÇÃO LAVADO 2 (SOLUÇÃO 4):** Para a solução lavado 2, foram adicionados 5 µL de CaCl<sub>2</sub> (1 M) em 10 ml da solução *Tyrode* básica.
- **SOLUÇÃO ESTOQUE (SOLUÇÃO 5):** Para a solução estoque, foram adicionados 10 µL de CaCl<sub>2</sub> (1 M) em 10 ml da solução *Tyrode* básica.

### 3.7. Comprimento, largura e volume celular

Os cardiomiócitos foram acomodados em uma câmara experimental, banhados pela solução tampão (Solução Estoque) à temperatura ambiente e visualizados em um monitor com um aumento de 400x, através de uma lente de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). O comprimento e a largura dos cardiomiócitos foram medidos utilizando-se um sistema de captação de imagens.

As imagens das células foram visualizadas em um monitor de um computador através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA), utilizando-se um programa de captação de imagens (M-Vision 5XX, Ionoptix, EUA). O comprimento foi definido através da medição da imagem gerada no monitor, desde a borda direita até a borda esquerda das células. A largura foi definida através da medição da imagem gerada no monitor, desde a borda superior até a borda inferior, no ponto médio dos cardiomiócitos.

Para as medições do comprimento e da largura dos cardiomiócitos foi utilizada uma régua com precisão de 1 mm. Somente foram escolhidas para as medições as células que estavam em boas condições, com as bordas (direita/esquerda e superior/inferior) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxadas em repouso, sem apresentarem contrações voluntárias. O volume celular foi calculado usando-se a fórmula proposta por Satoh et al. (1996):

$$\text{Volume (pl)} = \text{comprimento (mm)} \times \text{largura (mm)} \times (7,59 \times 10^{-3} \text{ pl/mm}^2)$$

Onde:

\* pl – picolitros

\* mm – micrômetros

\*  $7,59 \times 10^{-3} \text{ pl/mm}^2$  – constante obtida pela medida direta do volume celular através de microscopia confocal, dada em picolitros por micrômetros ao quadrado, conforme Satoh et al. (1996).

### 3.8. Contração celular

As contrações celulares foram medidas através da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos utilizando o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA), conforme previamente descrito (Natali *et al.*, 2001).

Os cardiomiócitos foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro e banhados pela solução de perfusão tampão (Solução Estoque) à temperatura controlada (37°C). Os cardiomiócitos de 29 animais (3-4 por grupo) foram banhados pela solução de perfusão tampão (Solução Estoque) com a adição de ISO *hydrochloride* (PM = 247,72g) a uma concentração de 100 nM (Altschuld *et al.*, 1995).

Os cardiomiócitos foram visualizados em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com uma frequência de 240 Hz.

Os cardiomiócitos foram estimulados externamente à frequência de 1Hz (40 Volts, duração de 5 ms) utilizando um par de eletrodos de aço, acoplado nos dois lados internos da câmara, através de um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). As bordas dos cardiomiócitos foram identificadas e as contrações dos cardiomiócitos após a

estimulação elétrica foram capturadas pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) e armazenadas para análise posterior (Figura 2).

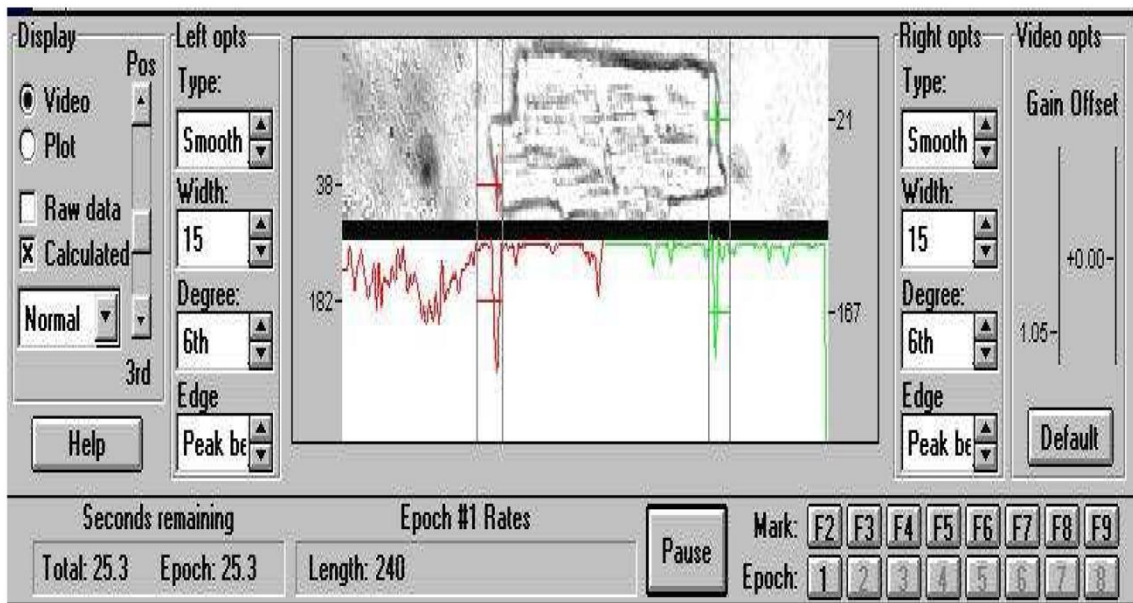


Figura 2. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através dos picos verde e vermelho, respectivamente. Fonte: Carneiro-Junior (2009).

Foram utilizados somente os cardiomiócitos que apresentavam boas condições, ou seja, as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram sempre realizados até três horas após o isolamento dos cardiomiócitos.

A partir das séries temporais de contração celular, obtidas usando o programa de registro (Ionoptix, EUA), os picos de contração foram detectados através de varredura dos pontos da série e comparação com um limiar. Esse limiar foi três vezes o desvio-padrão da série, ou seja, qualquer ponto maior que esse limiar foi considerado um ponto de máxima contração. Em torno dos pontos de máximo, os picos foram recortados, alinhados e promediados, sendo que o número mínimo de picos para promediação foi cinco. Em seguida, o início (ponto de deflexão da curva descendente do pico de contração) e o fim (ponto correspondente ao retorno da curva ascendente a condição basal) do pico de contração médio foram determinados através de inspeção visual.

A partir da determinação dos pontos inicial e final o programa calculava automaticamente os valores das variáveis de contração celular, como amplitude de contração (variação do

comprimento celular de repouso), tempo para 50% do pico de contração (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até 50% da amplitude máxima de contração, ms), tempo para 50% do relaxamento (tempo compreendido desde a amplitude máxima de contração até 50% do relaxamento, ms), velocidade máxima de contração (velocidade pico de encurtamento celular,  $\mu\text{m/s}$ ) e velocidade máxima de relaxamento (velocidade pico de relaxamento celular,  $\mu\text{m/s}$ ). Estas rotinas foram feitas usando o Matlab.

Os principais parâmetros avaliados são demonstrados na Figura 3. Durante cada dia de experimento, foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

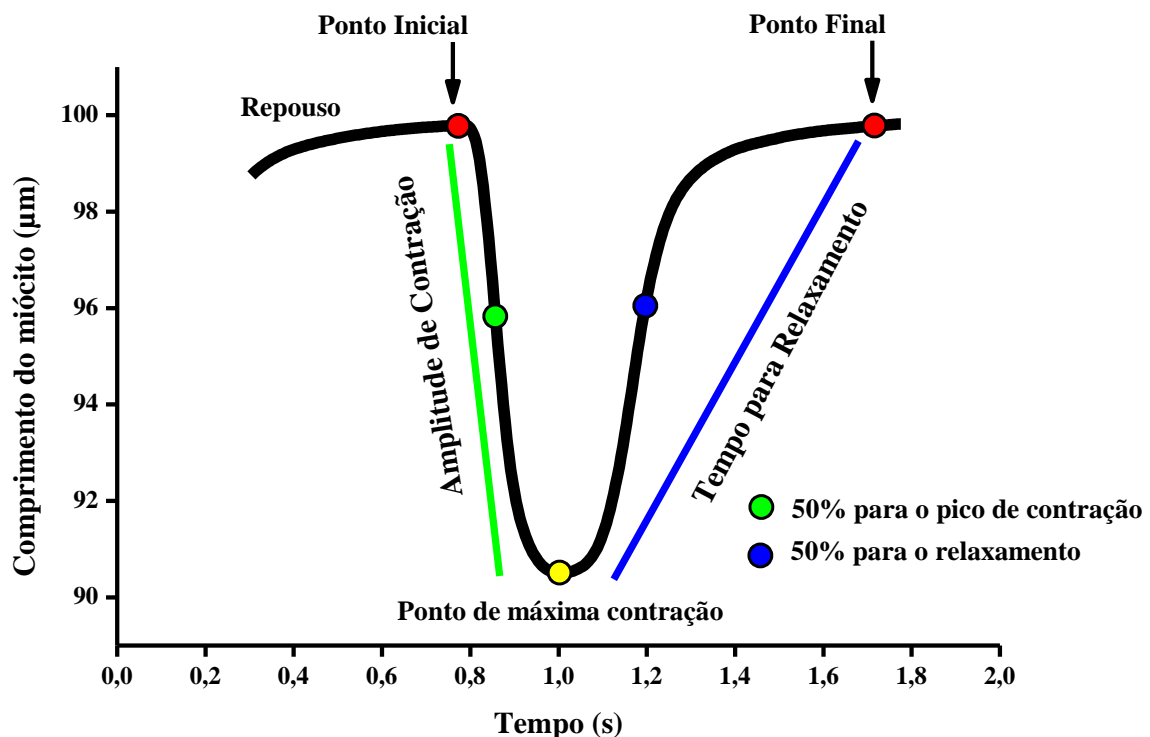


Figura 3. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados. Fonte: Carneiro-Junior (2009).

### 3.9. Análise estatística

Para a escolha dos testes estatísticos foi feita previamente uma análise da normalidade de cada variável medida. A comparação entre os valores iniciais e finais da variável peso corporal entre os grupos experimentais não apresentou distribuição normal. A comparação foi

realizada pelo teste de Wilcoxon de duas vias para medidas repetidas. Ao final dos tratamentos, as comparações entre as médias dos grupos para as variáveis peso corporal, distância total percorrida e de contração celular foram realizadas através de ANOVA de duas vias com *post-hoc* de Tukey. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM). O nível de significância adotado foi de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Peso corporal

Os resultados referentes ao efeito da deleção dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e do protocolo de treinamento aeróbico sobre o peso corporal estão representados na Tabela 2.

O peso corporal ao final do período experimental de todos os animais foi maior comparado com o peso corporal inicial ( $p < 0,05$ ). Os camundongos KO  $\beta 1$  (KO  $\beta 1c$  e KO  $\beta 1t$ ) apresentaram peso corporal inicial e final maior que os C57 (C57c e C57t) ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2. Peso Corporal dos animais

	Peso Corporal Inicial	Peso Corporal Final
C57c (n = 14)	28,3 $\pm$ 0,7	31,5 $\pm$ 0,7 <sup>#</sup>
C57t (n = 15)	28,2 $\pm$ 0,7	31,5 $\pm$ 0,6 <sup>#</sup>
KO $\beta 1c$ (n = 12)	32,1 $\pm$ 0,7*	36,6 $\pm$ 0,7 <sup>#*</sup>
KO $\beta 1t$ (n = 10)	32,0 $\pm$ 0,7 <sup>&amp;</sup>	35,7 $\pm$ 0,8 <sup>#&amp;</sup>
FVBc (n = 11)	28,9 $\pm$ 0,6	32,0 $\pm$ 0,7 <sup>#</sup>
FVBt (n = 12)	28,9 $\pm$ 0,5	30,6 $\pm$ 0,7 <sup>#</sup>
KO $\beta 2c$ (n = 15)	29,1 $\pm$ 0,5	31,6 $\pm$ 0,6 <sup>#</sup>
KO $\beta 2t$ (n = 16)	28,3 $\pm$ 0,5	30,4 $\pm$ 0,6 <sup>#</sup>

Peso Corporal dos camundongos C57, *knockout* para  $\beta 1$ -ARs, FVB e *knockout* para  $\beta 2$ -ARs. Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. n = número de animais; C57c = grupo C57 controle; C57t = grupo C57 treinado; KO  $\beta 1c$  = grupo *knockout* para  $\beta 1$ -ARs controle; KO  $\beta 1t$  = grupo *knockout* para  $\beta 1$ -ARs treinado; FVBc = grupo FVB controle; FVBt = grupo FVB treinado; KO  $\beta 2c$  = grupo *knockout* para  $\beta 2$ -ARs controle; KO  $\beta 2t$  = grupo *knockout* para  $\beta 2$ -ARs treinado. (\*) indica diferença do grupo C57c; (&) indica diferença do grupo C57t; (#) indica diferença do peso corporal inicial. Nível de significância  $p < 0,05$ .

### 4.2. Capacidade para o exercício

Na figura 4 estão apresentados os resultados referentes à distância total percorrida dos camundongos dos grupos C57c, C57t, KO  $\beta 1c$ , KO  $\beta 1t$ , FVBc, FVBt, KO  $\beta 2c$  e KO  $\beta 2t$ .

Todos os grupos treinados apresentaram maior distância total percorrida no teste de esforço progressivo em esteira, comparados com os seus respectivos grupos controles

( $p < 0,05$ ). Os grupos KO  $\beta 1c$  e KO  $\beta 1t$  apresentaram maior distância total percorrida do que os grupos C57c e C57t, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

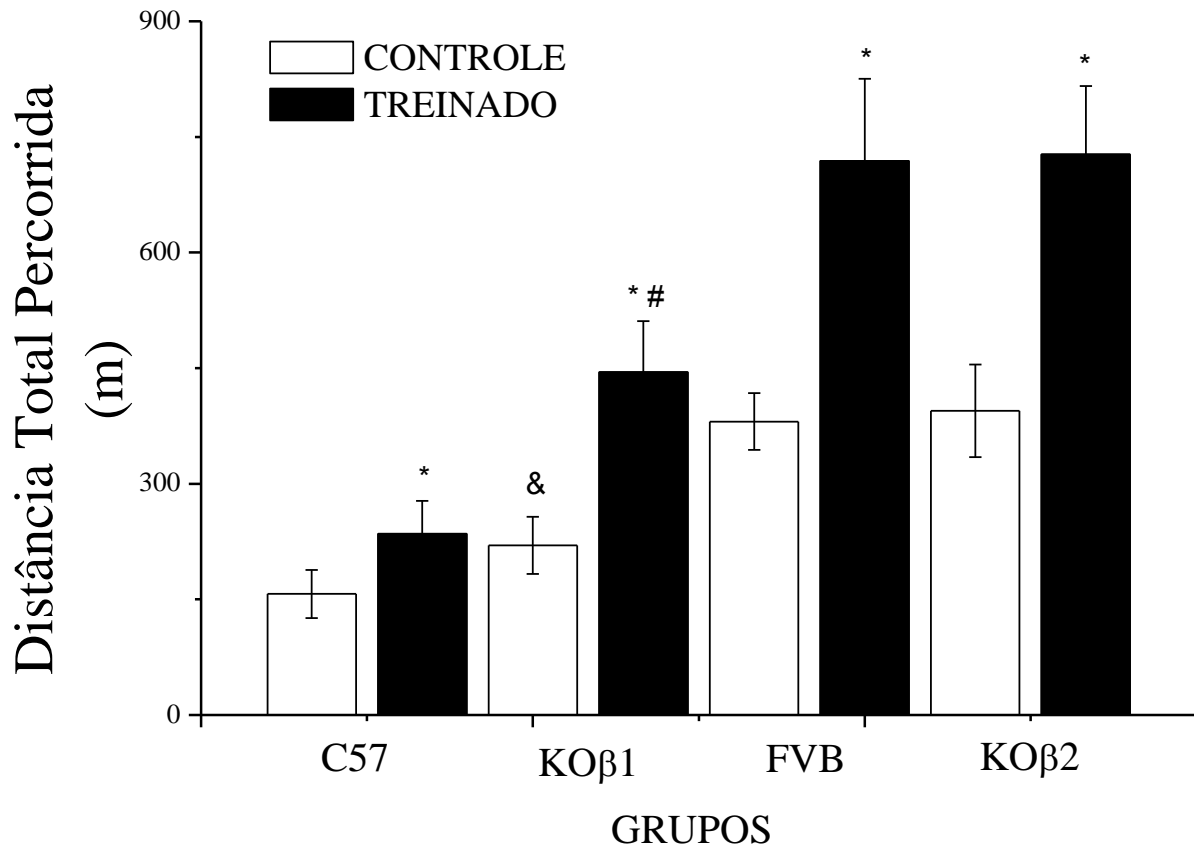


Figura 4. Distância Total Percorrida (m) de camundongos C57, *knockout* para  $\beta 1$ -ARs, FVB e *knockout* para  $\beta 2$ -ARs. Todos os grupos apresentam  $n = 9$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. (\*) indica diferença do respectivo grupo controle; (&) indica diferença de C57c; (#) indica diferença de C57t. Nível de significância  $p < 0,05$ .

### 4.3. Morfologia celular

Na figura 5 são apresentados os resultados referentes ao efeito da deleção dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e do protocolo de treinamento aeróbico sobre o comprimento, a largura e o volume celular dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos.

Os camundongos dos grupos KO  $\beta 1c$  e KO  $\beta 1t$  apresentaram comprimento e volume celular menores que os animais dos grupos C57c e C57t, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

O protocolo de treinamento aumentou o comprimento dos cardiomiócitos dos grupos FVBt e KO  $\beta 2t$  comparado aos grupos FVBc e KO  $\beta 2c$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ).

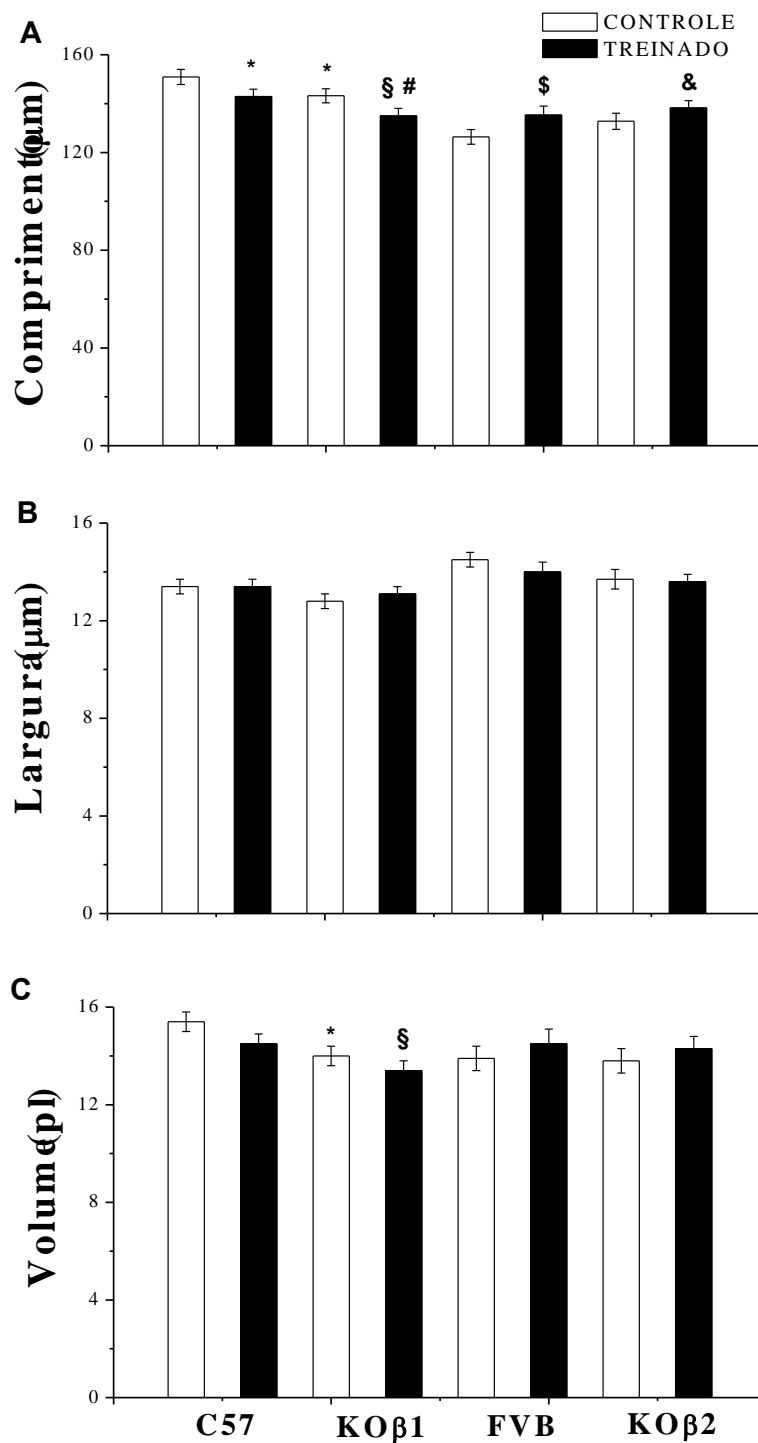


Figura 5. Morfologia dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos C57, *knockout* para  $\beta$ 1-ARs, FVB e *knockout* para  $\beta$ 2-ARs. (A) Comprimento Celular ( $\mu$ m); (B) Largura Celular ( $\mu$ m); (C) Volume Celular ( $\mu$ l). Dados expressos em Média  $\pm$  EPM. C57 controle (n=87); C57 treinado (n=94); KO  $\beta$ 1 controle (n=102); KO  $\beta$ 1 treinado (n=90); FVB controle (n=92); FVB treinado (n=58); KO  $\beta$ 2 controle (n=74); KO  $\beta$ 2 treinado (n=92). (\*) indica diferença do grupo C57c; ( $\$$ ) indica diferença do grupo C57t; (#) indica diferença do grupo KO  $\beta$ 1c; ( $\$$ ) indica diferença do grupo FVBc; (&) indica diferença do grupo KO  $\beta$ 2c. Nível de significância  $p < 0,05$ .



#### 4.4. Contração celular dos grupos C57 e KO $\beta$ 1

O efeito da deleção dos receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos, do protocolo de treinamento aeróbico e da administração de ISO sobre a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração, a velocidade máxima de relaxamento, o tempo para 50% do pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos da linhagem C57BL/6J estão apresentados na Figura 6.

O protocolo de treinamento reduziu a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração, o tempo para 50% do pico de contração e para 50% de relaxamento dos cardiomiócitos dos animais C57t ( $P < 0,05$ ).

A administração do ISO aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e de relaxamento nos cardiomiócitos do grupo C57c+ISO ( $p < 0,05$ ), sem alterações no tempo para 50% do pico de contração e no tempo para 50% de relaxamento.

O protocolo de treinamento somado à administração do ISO aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento, e reduziu o tempo para 50% do pico de contração e para 50% do relaxamento dos cardiomiócitos dos animais C57t+ISO ( $p < 0,05$ ).

Os cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta$ 1c apresentaram aumento na velocidade máxima de contração e de relaxamento ( $p < 0,05$ ). Sob resposta à estimulação  $\beta$ -adrenérgica com ISO não houve qualquer alteração nas mesmas propriedades mecânicas no grupo KO  $\beta$ 1c+ISO.

A ausência dos receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos não proporcionou alterações no tempo para 50% do pico de contração e no tempo para 50% de relaxamento nos cardiomiócitos dos animais KO  $\beta$ 1c. Já a administração do ISO reduziu o tempo para 50% do pico de contração e aumentou o tempo para 50% de relaxamento nos cardiomiócitos do grupo KO  $\beta$ 1c+ISO ( $p < 0,05$ ).

O protocolo de treinamento aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração, a velocidade máxima de relaxamento e o tempo para 50% do pico de contração nos cardiomiócitos dos animais KO  $\beta$ 1t ( $p < 0,05$ ).

O protocolo de treinamento somado à administração do ISO reduziu o tempo para 50% do pico de contração e aumentou o tempo para 50% do relaxamento nos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta 1t+ISO$  ( $p<0,05$ ).

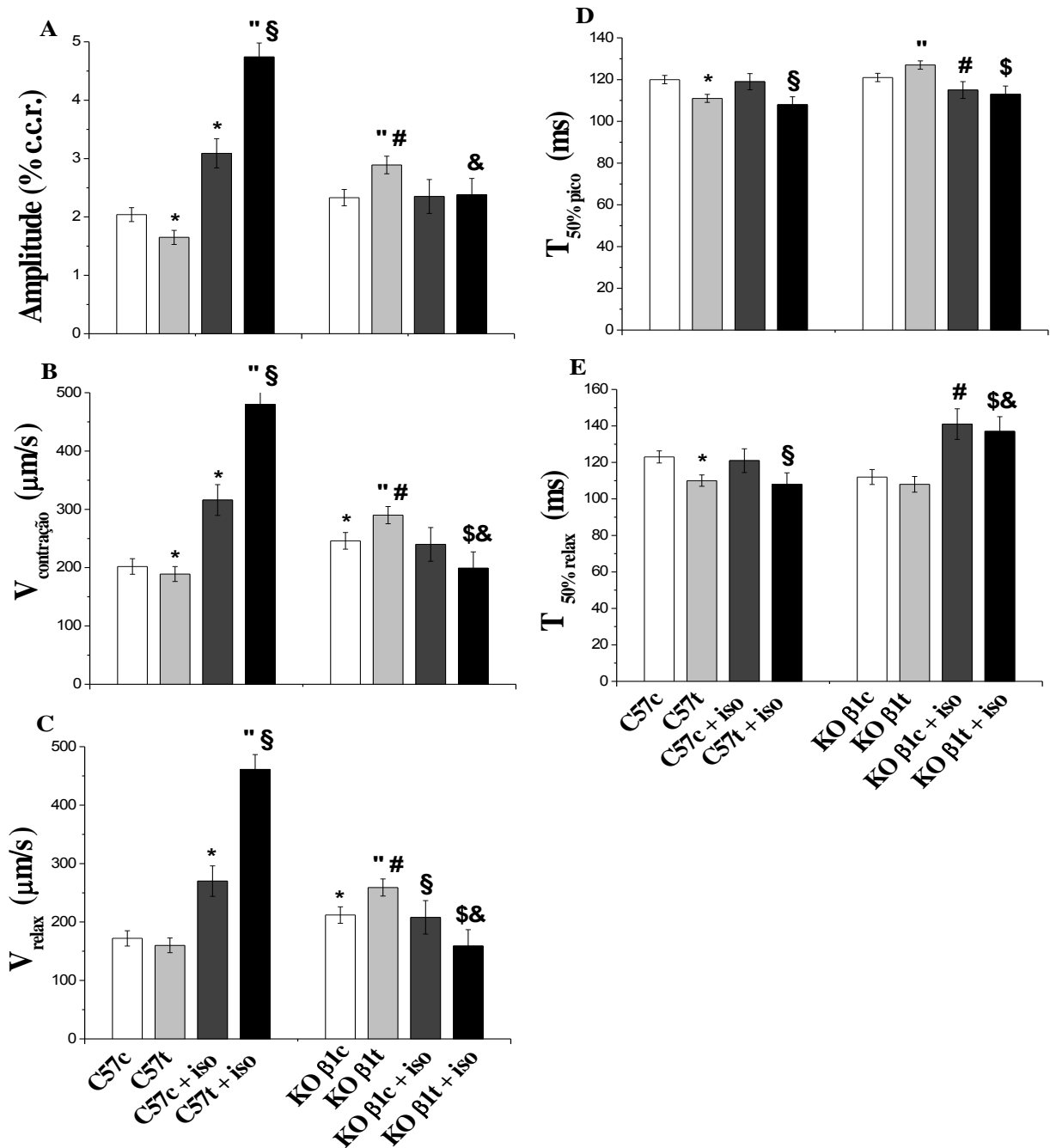


Figura 6. Contração dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos C57 e *knockout* para  $\beta 1$ -ARs. (A) Amplitude de contração (% de variação do comprimento celular de repouso); (B) Velocidade máxima de contração ( $\mu\text{m/s}$ ); (C) Velocidade máxima de relaxamento ( $\mu\text{m/s}$ ); (D) Tempo para 50% do pico de contração (ms); (E) Tempo para 50% do relaxamento (ms). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. C57c= grupo C57 controle (n= 149); C57t= grupo C57 treinado (n=161); C57c+ISO= grupo C57 controle com adição de ISO (n=38); C57t+ISO= grupo C57 treinado com adição de ISO (n=40); KO  $\beta 1c$ = grupo KO  $\beta 1$  controle (n=136); KO  $\beta 1t$ =

grupo KO $\beta$ 1t treinado (126); KO  $\beta$ 1c+ISO= grupo KO $\beta$ 1 controle com adição de ISO (n=33); KO $\beta$ 1t+ISO= grupo KO  $\beta$ 1 treinado com adição de ISO (n=35). (\*) indica diferença de C57c; (") indica diferença de C57t; (#) indica diferença de KO $\beta$ 1c; (\$) indica diferença de C57c+ISO; (&) indica diferença de C57t+ISO; (\$) indica diferença de KO  $\beta$ 1t.. Nível de significância p<0,05.

#### 4.5. Contração celular dos grupos FVB e KO $\beta$ 2

O efeito da deleção dos receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos, do protocolo de treinamento aeróbico e da administração de ISO sobre a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração, a velocidade máxima de relaxamento, o tempo para 50% do pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos da linhagem FVB/N estão apresentados na Figura 7.

O protocolo de treinamento reduziu a velocidade máxima de contração e aumentou o tempo para 50% de relaxamento nos cardiomiócitos dos animais FVBt comparados aos FVBc (P<0,05).

A administração do ISO aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração, a velocidade máxima de relaxamento e o tempo para 50% do relaxamento nos cardiomiócitos do grupo FVBc+ISO (p<0,05).

O protocolo de treinamento somado à administração do ISO reduziu a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento, e aumentou o tempo para 50% do relaxamento nos cardiomiócitos dos animais FVBt+ISO comparados aos FVBc+ISO (p<0,05).

A deleção dos receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos no alterou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento, e reduziu o tempo para 50% do pico de contração nos cardiomiócitos dos grupos KO  $\beta$ 2c.

A administração do ISO aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração, a velocidade máxima de relaxamento e o tempo para 50% do pico de contração dos cardiomiócitos do grupo KO  $\beta$ 2c+ISO (p<0,05).

O protocolo de treinamento aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração, a velocidade máxima de relaxamento e o tempo para 50% do pico de contração nos cardiomiócitos dos animais KO  $\beta$ 2t (p<0,05).

O protocolo de treinamento somado à administração do ISO reduziu a amplitude de contração e a velocidade máxima de relaxamento, e aumentou o tempo para 50% do pico de contração e para 50% do relaxamento dos cardiomiócitos dos animais KO  $\beta 2t$ +ISO comparados aos animais KO  $\beta 2c$ +ISO ( $p < 0,05$ ).

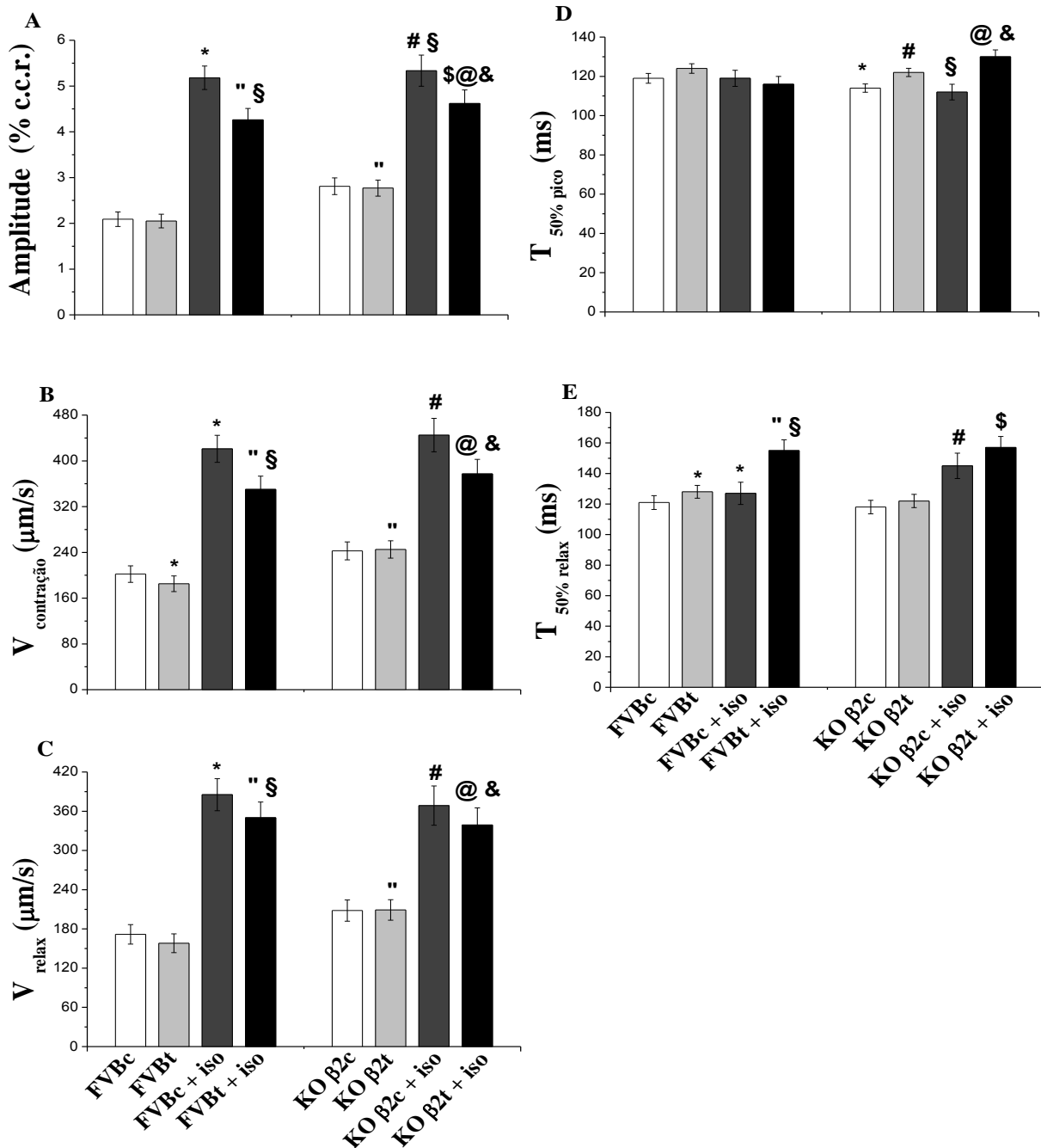


Figura 7. Contração dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos FVB e *knockout* para  $\beta 2$ -ARs. (A) Amplitude de contração (% de variação do comprimento celular de repouso); (B) Velocidade máxima de contração ( $\mu\text{m/s}$ ); (C) Velocidade máxima de relaxamento ( $\mu\text{m/s}$ ); (D) Tempo para 50% do pico de contração (ms); (E) Tempo para 50% do relaxamento (ms). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. FVBc= grupo FVB

controle (n=104); FVBt= grupo FVB treinado (n=115); FVBc+ISO= grupo FVB controle com adição de ISO (n=39); FVBt+ISO= grupo FVB treinado com adição de ISO (n=41); KO $\beta$ 2c= grupo KO $\beta$ 2 controle (n=105); KO $\beta$ 2t= grupo KO $\beta$ 2t treinado (n=111); KO  $\beta$ 2c+ISO= grupo KO $\beta$ 2 controle com adição de ISO (n=30); KO $\beta$ 2t+ISO= grupo KO  $\beta$ 2 treinado com adição de ISO (n=40). (\*) significativamente diferente de FVBc; (") indica diferença de FVBt; (#) indica diferença de KO $\beta$ 2c; (\$) indica diferença de FVBc+ISO; (&) indica diferença de FVBt+ISO; (@) indica diferença de KO $\beta$ 2c+ISO. Nível de significância p<0,05.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento físico sobre as propriedades morfológicas e mecânicas em cardiomiócitos de camundongos *knockout* para os receptores  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-adrenérgicos. Foi observado que os camundongos KO  $\beta$ 1 (KO  $\beta$ 1c e KO  $\beta$ 1t) apresentaram menor comprimento celular comparados aos C57 (C57c e C57t). O grupo KO  $\beta$ 2t apresentou maior comprimento celular comparado ao grupo KO  $\beta$ 2c. Os camundongos KO  $\beta$ 1 e KO  $\beta$ 2 não apresentaram redução nas propriedades mecânicas dos cardiomiócitos. O protocolo de treinamento aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento dos cardiomiócitos dos animais KO  $\beta$ 1t e KO  $\beta$ 2t. O ISO não alterou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento nos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta$ 1+ISO, já os animais KO  $\beta$ 2+ISO apresentaram aumento nestas propriedades mecânicas.

### 5.1. Peso corporal

Todos os camundongos apresentaram ganhos de peso corporal esperados ao longo do período experimental, devido ao crescimento. O peso corporal inicial e final dos animais KO  $\beta$ 1 (KO  $\beta$ 1c e KO  $\beta$ 1t) foram maiores comparados aos animais C57 (C57c e C57t). Assim como na célula cardíaca, a ativação dos  $\beta$ -ARs no tecido adiposo leva a produção de AMPc, que ativa a PKA e estimula a lipólise no tecido adiposo. Apesar do  $\beta$ 3-AR ser predominante no tecido adiposo de roedores, Soloveva *et al.* (1997) mostraram que camundongos com superexpressão de  $\beta$ 1-ARs apresentaram aumento na atividade lipolítica nos adipócitos. Assim, os animais KO  $\beta$ 1 provavelmente apresentaram redução na lipólise, o que influenciou na quantidade de gordura e, conseqüentemente, no peso corporal. (Lafontan e Berlan, 1993). Ueta *et al.* (2012) também observaram maior peso corporal em camundongos KO para os  $\beta$ 1-ARs. Sob estimulação  $\beta$ -adrenérgica a lipólise nos adipócitos foi maior através dos  $\beta$ 1- e  $\beta$ 3-ARs, com pequena participação dos  $\beta$ 2-ARs (Atgie *et al.*, 1997), o que justifica o peso corporal semelhante entre os grupos KO  $\beta$ 2 (KO  $\beta$ 2c e KO  $\beta$ 2t) e FVB (FVBc e FVBt).

### 5.2. Capacidade para o exercício

A distância total percorrida dos grupos treinados (C57t, KO  $\beta$ 1t, FVBt e KO  $\beta$ 2t) foi maior quando comparada aos respectivos controles (C57c, KO  $\beta$ 1c, FVBc e KO  $\beta$ 2c). A maior distância total percorrida indica uma melhora na capacidade aeróbica induzida pelo protocolo de treinamento. O aumento na capacidade para o exercício está associado a

adaptações cardiovasculares, que são consideradas características do estado de treinamento (Moore e Korzick, 1995). O aumento no  $VO_{2\text{máx}}$ , a bradicardia de repouso e o aumento no volume sistólico são exemplos das adaptações ao treinamento. Mesmo não sendo avaliada no presente estudo, a redução na FC é um marcador clássico do estado treinado. A bradicardia pode ser causada por fatores intrínsecos, como o aumento na contração dos cardiomiócitos, e extrínsecos, como a redução na atividade simpática e o aumento na atividade parassimpática (Moore e Korzick, 1995). Nossos achados de capacidade para o exercício corroboram com os estudos prévios que utilizaram o mesmo protocolo de treinamento aeróbico e observaram maior distância total percorrida nos grupos treinados (Ferreira *et al.*, 2007; Rolim *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009; Bueno *et al.*, 2010; Vanzelli *et al.*, 2013).

No teste de esforço progressivo os camundongos KO  $\beta 1$  (KO  $\beta 1c$  e KO  $\beta 1t$ ) apresentaram maior distância total percorrida quando comparados aos selvagens (C57c e C57t). Este resultado era esperado nos animais KO  $\beta 2$ , visto que estudos prévios utilizando protocolo de exercício incremental em esteira mostraram maior distância total percorrida em camundongos KO para  $\beta 2$ -ARs (Chruscinski *et al.*, 1999) e nenhuma alteração em KO para  $\beta 1$ -ARs, quando comparados aos selvagens (Rohrer *et al.*, 1998). Uma possível justificativa para o aumento na distância total percorrida nos animais KO  $\beta 1$  pode ser a redução na mobilização de glicogênio, já que a ativação simpática durante o exercício promove a glicogenólise por meio dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, como alternativa o ácido graxo seria preferencialmente mobilizado durante o exercício (Rohrer *et al.*, 1998). Ao reduzir a glicogenólise durante o exercício, o glicogênio muscular é preservado, o que aumenta a duração do exercício antes que ocorra a depleção do glicogênio muscular (Chruscinski *et al.*, 1999).

### 5.3. Morfologia celular

Quanto à morfologia dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo, foi observado que os camundongos dos grupos C57c e C57t apresentaram maior comprimento e volume celular do que os grupos KO  $\beta 1c$  e KO  $\beta 1t$ , indicando que a ausência desses receptores pode interferir na estrutura dos cardiomiócitos. Múltiplas vias estão envolvidas no crescimento hipertrófico cardíaco, dentre elas a via de sinalização  $\beta$ -adrenérgica (Moore e Korzick, 1995; Maclellan e Schneider, 2000). Segundo Lee *et al.* (2010), para manter um determinado volume celular é necessária uma quantidade adequada de  $\beta$ -ARs, de modo que a deleção de um dos  $\beta$ -ARs ( $\beta 1$ - ou  $\beta 2$ -AR) pode acarretar alterações na razão do peso do coração/peso corporal. Kiriazis

*et al.* (2008) mostraram redução na razão peso do coração/peso corporal e ausência de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica em camundongos DKO para os  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs, esses achados demonstram a participação dos  $\beta$ -ARs na hipertrofia cardíaca. Os camundongos com deleção dos três subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (TKO) apresentaram menor peso do coração (Lee *et al.*, 2010). Além disso, camundongos com superexpressão de  $\beta$ 1-ARs apresentaram maior razão peso do coração/peso corporal, o que levou a uma hipertrofia cardíaca (Engelhardt *et al.*, 1999).

De maneira inesperada, os cardiomiócitos dos grupos C57c e KO  $\beta$ 1c apresentaram maior comprimento celular quando comparados aos animais C57t e KO  $\beta$ 1t, respectivamente. O protocolo de treinamento, a idade do animal, o gênero, a intensidade e/ou a duração do treinamento são aspectos importantes que podem influenciar na resposta adaptativa dos cardiomiócitos ao treinamento (Moore *et al.*, 1995). Em um estudo que utilizou um protocolo de treinamento de intensidade moderada e alta, Kemi *et al.* (2005) demonstraram que o protocolo de alta intensidade foi mais efetivo em aumentar o comprimento, a largura e o volume celular, comparado ao de intensidade moderada. Além disso, utilizando um protocolo de treinamento de alta intensidade Kemi *et al.* (2002) observaram aumentos no comprimento e na largura celular dos cardiomiócitos de camundongos da mesma linhagem (C57BL/6J) e de idade semelhante ao nosso estudo, o que indica que a intensidade do protocolo de treinamento pode influenciar na morfologia celular dos cardiomiócitos de camundongos.

Por outro lado, na linhagem FVB os animais treinados (FVBt e KO  $\beta$ 2t) apresentaram maior comprimento celular que os controles (FVBc e KO  $\beta$ 2c), o que pode indicar uma hipertrofia cardíaca ocasionada pelo protocolo de treinamento aeróbico de intensidade moderada. O treinamento aeróbico induz à hipertrofia fisiológica excêntrica, que está associada à estrutura cardíaca e à função cardíaca normal ou aumentada (Ellison *et al.*, 2012). A hipertrofia excêntrica é caracterizada por um aumento na dimensão interna da câmara ventricular cardíaca (Atchley e Douglas, 2007; Ellison *et al.*, 2012). Estudos prévios utilizando protocolo de treinamento aeróbico também observaram aumentos no comprimento celular dos cardiomiócitos de camundongos (Kemi *et al.*, 2002) e de ratos (Moore *et al.*, 1993; Wisloff *et al.*, 2001).

#### **5.4. Contração celular**

Quanto às propriedades mecânicas, os resultados mostraram que os animais C57c apresentaram maiores amplitude de contração e velocidade máxima de contração do que os



animais C57t. Provavelmente a intensidade do protocolo de treinamento adotado não foi suficiente para acarretar adaptações nas propriedades mecânicas, bem como nas proteínas envolvidas no AEC de animais selvagens. Utilizando um protocolo de natação de intensidade baixa à moderada, Medeiros *et al.* (2008) não observaram diferença na expressão dos RyR, unidades liberadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  responsáveis por aumentar a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS e desencadear aumento transitório nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  no sarcoplasma (Cheng, 1993). Com o mesmo protocolo de treinamento do nosso estudo, Rolim *et al.* (2007) não observaram diferenças na expressão de SERCA2a e de  $\text{FLB}_{\text{Ser16}}$ , proteínas envolvidas na remoção de  $\text{Ca}^{2+}$  do sarcoplasma durante o relaxamento dos cardiomiócitos (Bers, 2002). Por outro lado, estudos prévios observaram melhoras na função contrátil em animais que realizaram um protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade (Wisloff *et al.*, 2001; Kemi *et al.*, 2002; Kemi *et al.*, 2005).

A administração de ISO aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e de relaxamento nos cardiomiócitos de camundongos selvagens (C57c+ISO e C57t+ISO). A resposta ao ISO já era esperada, visto que o ISO é um tipo de catecolamina exógena sintética que tem a função de aumentar os efeitos cronotrópico e inotrópico na célula cardíaca, através da ativação dos  $\beta$ -ARs (Rona, 1985). A estimulação  $\beta$ -adrenérgica com ISO ativa uma cascata de sinalização que irá aumentar a fosforilação de um conjunto de proteínas envolvidas no AEC e, conseqüentemente, aumentará a função contrátil dos cardiomiócitos (Bers, 2002; Xiang e Kobilka, 2003; Grimm e Brown, 2010).

Os resultados mostraram que o protocolo de treinamento aeróbico somado à administração do ISO aumentou as propriedades mecânicas dos cardiomióctios dos animais C57t+ISO, sugerindo que este protocolo de treinamento levou a adaptações na via de sinalização  $\beta$ -adrenérgica. Provavelmente os cardiomiócitos de camundongos selvagens treinados respondem mais prontamente ao estímulo  $\beta$ -adrenérgico (Libonati e Macdonnell, 2011), o que justifica o aumento nas propriedades mecânicas nestes animais. Apesar de controverso, alguns estudos também observaram o efeito do treinamento sobre a via de sinalização  $\beta$ -adrenérgica. Libonati e MacDonnell (2010) mostraram que o treinamento de intensidade moderada aumentou a responsividade dos  $\beta$ -ARs à estimulação  $\beta$ -adrenérgica em cardiomiócitos de ratos. No estudo de Hammond *et al.* (1988) foi observado aumento de proteína Gs na membrana plasmática dos ventrículos de suínos após um protocolo de treinamento aeróbico. Além disso, a responsividade dos  $\beta$ 2-ARs foi atenuada em animais que realizaram corrida voluntária (Stones, 2008), indicando redução na ativação da via de

sinalização inibitória e aumento na atividade da AC e no inotropismo cardíaco (Xiang e Kobilka, 2003).

O menor tempo para 50% do relaxamento e a maior velocidade máxima de relaxamento no grupo C57t+ISO pode estar relacionado com a maior atividade e expressão de FLB. A fosforilação da FLB remove a inibição da SERCA2a, provocando aumento na recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS (Bers, 2002), o que provavelmente reduziu o tempo para 50% do relaxamento e aumento a velocidade máxima de relaxamento. Utilizando um protocolo de natação, Medeiros *et al.* (2008) observaram maior expressão de FLB<sub>ser16</sub> nos animais treinados. Sob estimulação  $\beta$ -adrenérgica com agonista, a via de sinalização  $\beta$ -ARs/Gs/AMPC/PKA é responsável por fosforilar a FLB<sub>ser16</sub> (Mundina-Weilenmann *et al.*, 1996; Xiang e Kobilka, 2003).

Os resultados de amplitude de contração e de tempo para 50% do relaxamento nos cardiomiócitos de camundongos KO  $\beta$ 1 foi similar aos dos controles. A deleção de  $\beta$ -ARs tem pouco impacto na função cardíaca em repouso, com significativa alteração na função cardíaca apenas sob estimulação agonista dos  $\beta$ -ARs (Rohrer *et al.*, 1996). Outros estudos também não observaram diferença na amplitude de contração de camundongos KO para  $\beta$ 1-ARs (Zhu *et al.*, 2005), bem como na amplitude de contração, no tempo para o pico e no tempo para 50% do relaxamento em animais DKO para  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs (Zhou, 2000). Estudos anteriores também não observaram alterações na FC e na pressão arterial basal de camundongos KO para  $\beta$ 1-ARs, KO para  $\beta$ 2-ARs e DKO para  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs (Rohrer *et al.*, 1996; Rohrer *et al.*, 1999; Chruscinski *et al.*, 1999).

Foi observado aumento na velocidade máxima de contração e de relaxamento nos cardiomiócitos dos camundongos KO $\beta$ 1. Estes resultados não eram esperados, já que o  $\beta$ 1-AR é considerado o subtipo de receptor adrenérgico predominante na modulação da contração cardíaca (Bristow *et al.*, 1986). Entretanto, uma possível justificativa pode ser os mecanismos compensatórios para manter a função cardíaca normal (Rohrer *et al.*, 1996). Neuber *et al.* (2014) mostraram aumento na força de contração no tecido cardíaco de ratos com redução de ~70% na densidade de  $\beta$ 1-ARs. Mesmo sem a deleção total, a menor expressão dos  $\beta$ 1-ARs não justifica o aumento na contração basal. Além disso, não houve aumento compensatório na expressão de  $\beta$ 2-ARs ou de outros componentes envolvidos na via de sinalização dos  $\beta$ 1-ARs (Neuber *et al.*, 2014). Entretanto, foi observado maior expressão de  $\alpha$ 1-ARs no tecido cardíaco com densidade reduzida de  $\beta$ 1-ARs (Neyber *et al.*, 2014). O aumento na sinalização

de  $\alpha 1$ -ARs é comum em situações de dessensibilização dos  $\beta 1$ -ARs, onde a redução inotrópica via  $\beta 1$ -ARs é compensada por um aumento mediado pelos  $\alpha 1$ -ARs, preservando a função cardíaca em situações patológicas, como a IC (O'Connell *et al.*, 2014). Wang *et al.* (2010) mostraram que no ventrículo direito de cardiomiócitos isolados de ratos o aumento inotrópico via  $\alpha 1$ -ARs foi dependente da presença de IC, já que os animais saudáveis não apresentaram esse comportamento. O potencial papel terapêutico dos  $\alpha$ -ARs para manter a função cardíaca normal, principalmente em condições de comprometimento da via de sinalização  $\beta 1$ -adrenérgica, tem sido proposto por estudos prévios (Milligan *et al.*, 1994; Korzick e Moore, 1996; Beaulieu *et al.*, 1997; Korzick *et al.*, 2004). Estudos recentes apontam que o aumento na contração dos cardiomiócitos via estimulação  $\alpha 1$ -adrenérgica ocorre através do aumento na entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Mohl *et al.*, 2011), no transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Chu *et al.*, 2013) e na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  por fosforilação da miosina de cadeia leve ( $\alpha$ -MCP) (Wang *et al.*, 2010).

Os resultados demonstraram que os camundongos KO  $\beta 1t$  apresentaram aumento na amplitude de contração, na velocidade máxima de contração e de relaxamento. Até onde vai nosso conhecimento ainda não há estudos que avaliaram o efeito do treinamento físico sobre a função cardíaca de animais KO para  $\beta$ -ARs. Entretanto, o treinamento pode ter potencializado os mecanismos compensatórios nos camundongos KO  $\beta 1t$ . Mesmo não sendo avaliada no presente estudo a via de sinalização  $\alpha 1$ -adrenérgica pode ter contribuído para o aumento das propriedades mecânicas. Estudos anteriores observaram que o treinamento aeróbico aumentou a responsividade inotrópica de cardiomiócitos de ratos via estimulação dos  $\alpha 1$ -ARs (Korzick e Moore, 1996; Korzick *et al.*, 2004).

Outro possível mecanismo compensatório pode ser a redução na responsividade dos  $\beta 2$ -ARs nos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta 1t$ . Ao diminuir o acoplamento dos  $\beta 2$ -ARs à proteína Gi o efeito inibidor destes receptores sobre a AC é reduzido (Xiang e Kobilka, 2003), aumentando a produção de AMPc e, conseqüentemente, a fosforilação das proteínas envolvidas no AEC dos cardiomiócitos. Utilizando um protocolo de corrida voluntária, Stones *et al.* (2008) mostraram redução na responsividade dos  $\beta 2$ -ARs nos animais exercitados, este comportamento pode ser, em partes, devido a redução no número de RNAm dos  $\beta 2$ -ARs e na via de sinalização pós-receptor, visto que a inibição da proteína Gi restaurou a reposta inotrópica positiva dos  $\beta 2$ -ARs.

Apesar dos camundongos KO para  $\beta$ 1-ARs não apresentarem alterações na função cardíaca em condição basal, sob estimulação  $\beta$ -adrenérgica esses animais têm como característica a redução na capacidade contrátil ou, até mesmo, ausência de resposta cronotrópica e inotrópica (Rohrer *et al.*, 1996). A alteração na via de sinalização  $\beta$ -adrenérgica, por redução na densidade e/ou dessensibilização dos  $\beta$ 1-ARs, é uma característica da IC compensatória (Xiang e Kobilka, 2003). Os camundongos com IC induzida por hiperatividade simpática que realizaram o protocolo de treinamento de corrida ou de natação apresentaram mudanças na expressão das proteínas envolvidas no AEC (Rolim *et al.*, 2007; Medeiros *et al.*, 2008; Vanzelli *et al.*, 2013). Mesmo não sendo avaliadas no presente estudo, as alterações na expressão das proteínas envolvidas no AEC pode ajudar a elucidar os resultados referentes às propriedades mecânicas dos cardiomiócitos de camundongos KO $\beta$ 1t.

Como já esperado, a administração do agonista ISO não alterou a amplitude de contração nos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta$ 1 (KO  $\beta$ 1c e KO  $\beta$ 1t). Esses achados confirmam que sob estímulo agonista os  $\beta$ 1-ARs são os principais responsáveis pelo efeito cronotrópico e inotrópico positivo no coração (Rohrer *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2001; Xiang e Kobilka, 2003; Yoo *et al.*, 2009). Corroborando com nossos achados, Rohrer *et al.* (1996) não observaram aumento na amplitude de contração e na taxa de relaxamento do tecido cardíaco de camundongos KO para os  $\beta$ 1-ARs, após estimulação  $\beta$ -adrenérgica com o ISO. Em cardiomiócitos de camundongos DKO para os  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs, Zhou *et al.* (2000) observaram ausência de resposta contrátil ao agonista ISO.

O menor tempo para 50% do pico de contração após administração do ISO nos cardiomiócitos dos grupos KO  $\beta$ 1+ISO (KO  $\beta$ 1c+ISO e KO  $\beta$ 1t+ISO) provavelmente deve-se a ativação dos  $\beta$ 2-ARs. Esses receptores ativam tanto a proteína Gs quanto a proteína Gi, com ativação inicial predominante à proteína Gs (Devic *et al.*, 2001; Xiang *et al.*; 2002; Soto *et al.*, 2009). Deste modo, a ativação dos  $\beta$ 2-ARs pode ter acarretado um aumento inicial na fosforilação das proteínas envolvidas no AEC e, conseqüentemente, uma redução no tempo para 50% do pico de contração nos cardiomiócitos de camundongos KO  $\beta$ 1, sob estimulação  $\beta$ -adrenérgica com o agonista ISO.

Foi observado maior tempo para 50% do relaxamento nos cardiomiócitos dos camundongos KO $\beta$ 1+ISO (KO  $\beta$ 1c+ISO e KO  $\beta$ 1t+ISO). Uma possível justificativa pode ser a resposta inibitória da via de sinalização dos  $\beta$ 2- e/ou  $\beta$ 3-ARs. Para Sucharov *et al.* (2011),

a dessensibilização e a redução na atividade dos  $\beta$ 1-ARs, bem como o aumento na regulação da proteína Gi, resultam em menor produção de AMPc e fosforilação das proteínas alvo. Sob estimulação  $\beta$ -adrenérgica, o acoplamento dos  $\beta$ 2-ARs à proteína Gi inibe a ativação da AC e, conseqüentemente, a produção de AMPc (Xiang e Kobilka, 2003), o que leva a redução na fosforilação de FLB. Estudos prévios mostraram que o rompimento do acoplamento dos  $\beta$ 2-ARs à proteína Gi aumentou a ativação da AC (Kilts *et al.*, 2000) e a fosforilação de FLB<sub>Ser16</sub> (Kuschel, *et al.*, 1999a). Além disso, utilizando cardiomiócitos de camundongos DKO para  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs, Devic *et al.* (2001) mostraram que a estimulação com ISO ou CL-316243 (agonista seletivo para  $\beta$ 3-ARs) reduziu a taxa de contração, indicando que os  $\beta$ 3-ARs exercem um efeito inotrópico negativo em cardiomiócitos de camundongos DKO para  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2-ARs.

Quanto às propriedades mecânicas dos cardiomiócitos do grupo FVBt, foi observado que em condição basal o protocolo de treinamento aeróbico reduziu a velocidade máxima de contração. Os resultados encontrados no grupo FVBt são semelhantes aos do grupo C57t, o que contribui para confirmar que a intensidade do protocolo de treinamento adotado não acarretou adaptações nas propriedades mecânicas dos cardiomiócitos dos camundongos selvagens. Como já mencionado anteriormente, Rolim *et al.* (2007) não observaram diferenças na expressão das proteínas envolvidas na contração celular entre camundongos selvagens treinados e controles. Por outro lado, o protocolo de treinamento intervalado de alta intensidade foi mais efetivo em melhorar a função contrátil de camundongos e ratos (Wisloff *et al.*, 2001; Kemi *et al.*, 2002; Kemi *et al.*, 2005).

Foi observado que em condição basal o tempo para 50% do pico de contração dos cardiomiócitos de camundongos KO  $\beta$ 2c foi menor que dos FVBc, bem como os animais KO  $\beta$ 2t apresentaram maior amplitude de contração, velocidade máxima de contração e de relaxamento comparados com os FVBt. Além da presença dos  $\beta$ 1-ARs nos cardiomiócitos dos camundongos KO  $\beta$ 2, a deleção dos  $\beta$ 2-ARs compromete a via de sinalização inibitória (Xiang e Kobilka, 2003), o que aumenta a produção de AMPc e, conseqüentemente, a fosforilação das proteínas envolvidas no AEC. Estudos prévios mostraram que o treinamento aumentou a responsividade dos  $\beta$ -ARs (Libonati *et al.*, 2010) e a expressão de proteína Gs (Hammond *et al.*, 1988), e reduziu a responsividade dos  $\beta$ 2-ARs (Stones *et al.*, 2008), o que pode ter contribuído para o aumento na amplitude de contração, na velocidade máxima de contração e de relaxamento nos animais KO  $\beta$ 2t.

O aumento na amplitude de contração, na velocidade máxima de contração e de relaxamento nos cardiomiócitos dos animais FVB e KO $\beta$ 2 sob estimulação  $\beta$ -adrenérgica com ISO já era esperado. Como mencionado anteriormente, o ISO tem a função de aumentar o efeito cronotrópico e inotrópico na célula cardíaca através da ativação dos  $\beta$ -ARs (Rona, 1985) e os  $\beta$ 1-ARs são os principais responsáveis por este aumento (Rohrer *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 2009). Além disso, está claro na literatura que embora o  $\beta$ 2-AR ative a proteína Gs, seu efeito cronotrópico e inotrópico nos cardiomiócitos é menor (Zhu *et al.*, 2001; Xiang, 2011).

Os resultados referentes às propriedades mecânicas nos cardiomiócitos dos camundongos FVBt+ISO e KO $\beta$ 2t+ISO foram inesperados. O protocolo reduziu a amplitude de contração e a velocidade máxima de contração e de relaxamento nos cardiomiócitos desses animais, bem como aumentou o tempo para 50% do pico de contração e para 50% do relaxamento. Diante dos resultados, podemos sugerir que o protocolo de treinamento aeróbico utilizado no presente estudo não causou adaptações nas propriedades mecânicas dos cardiomiócitos dos camundongos da linhagem FVB/N. O teste de esforço progressivo e o protocolo de treinamento proposto por Ferreira *et al.* (2007) tinham como modelo animal camundongos da linhagem C57BL/6J. Estudos prévios observaram que durante o exercício há diferenças na velocidade crítica e na concentração de lactato sanguíneo entre as duas linhagens. Os camundongos da linhagem FVB/N apresentaram maior velocidade e concentração de lactato no limiar de lactato e acima deste, quando comparados aos C57BL/6J (Billat *et al.*, 2005). Para Billat *et al.* (2005), ajustes na intensidade e na duração do exercício seria necessário de acordo com cada linhagem.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo hipotetizou que as propriedades morfológicas e mecânicas de cardiomiócitos isolados estariam reduzidas em camundongos KO para os  $\beta 1$ - e  $\beta 2$ -ARs, e que o treinamento físico promoveria alterações nestas propriedades.

Em relação às propriedades morfológicas, os camundongos KO para os  $\beta 1$ -ARs apresentaram redução no comprimento e volume celular dos cardiomiócitos, já o treinamento aeróbico não promoveu alterações nas propriedades morfológicas dos animais treinados. Os camundongos KO para os  $\beta 2$ -ARs não apresentaram redução nas propriedades morfológicas e o treinamento aumentou o comprimento celular dos cardiomiócitos dos camundongos treinados.

Em relação às propriedades mecânicas, os camundongos KO para os  $\beta 1$ -ARs não apresentaram redução nas propriedades, já o treinamento aeróbico aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos camundongos KO para os  $\beta 1$ -ARs treinados. O protocolo de treinamento aeróbico somado à administração do isoproterenol não alterou às propriedades mecânicas nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos camundongos KO para os  $\beta 1$ -ARs

Os camundongos KO para os  $\beta 2$ -ARs não apresentaram redução nas propriedades mecânicas, já o treinamento aeróbico aumentou a amplitude de contração, a velocidade máxima de contração e a velocidade máxima de relaxamento nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais treinados. O protocolo de treinamento aeróbico somado à administração do isoproterenol reduziu as propriedades mecânicas nos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos camundongos KO para os  $\beta 2$ -ARs.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHULD, R. A. et al. Response of failing canine and human heart cells to beta 2-adrenergic stimulation. **Circulation**, v. 92, n. 6, p. 1612-8, 1995.
- ARAGON, J. P. et al. Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 25, p. 2683-91, 2011.
- ATCHLEY, A. E., JR.; DOUGLAS, P. S. Left ventricular hypertrophy in athletes: morphologic features and clinical correlates. **Cardiol Clin**, v. 25, n. 3, p. 371-82, 2007.
- ATGIE, C.; D'ALLAIRE, F.; BUKOWIECKI, L. J. Role of beta1- and beta3-adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes. **Am J Physiol**, v. 273, n. 4 Pt 1, p. C1136-42, 1997.
- BARRESE, V.; TAGLIALATELA, M. New advances in beta-blocker therapy in heart failure. **Front Physiol**, v. 4, p. 323, 2013.
- BEAULIEU, M.; BRAKIER-GINGRAS, L.; BOUVIER, M. Upregulation of alpha1A- and alpha1B-adrenergic receptor mRNAs in the heart of cardiomyopathic hamsters. **J Mol Cell Cardiol**, v. 29, n. 1, p. 111-9, 1997.
- BERNSTEIN, D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. **Physiol Genomics**, v. 13, n. 3, p. 217-26, 2003.
- BERNSTEIN, D. et al. Differential cardioprotective/cardiotoxic effects mediated by beta-adrenergic receptor subtypes. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 289, n. 6, p. H2441-9, 2005.
- BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, 2002.
- BERS, D. M. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. **Annu Rev Physiol**, v. 70, p. 23-49, 2008.
- BILLAT, V. L. et al. Inter- and intrastain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 4, p. 1258-63, 2005.
- BILLMAN, G. E. A comprehensive review and analysis of 25 years of data from an in vivo canine model of sudden cardiac death: implications for future anti-arrhythmic drug development. **Pharmacol Ther**, v. 111, n. 3, p. 808-35, 2006.
- BILLMAN, G. E. Cardiac autonomic neural remodeling and susceptibility to sudden cardiac death: effect of endurance exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 4, p. H1171-93, 2009.
- BRISTON, S. J. et al. Impaired beta-adrenergic responsiveness accentuates dysfunctional excitation-contraction coupling in an ovine model of tachypacing-induced heart failure. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 6, p. 1367-82, 2011.
- BRISTOW, M. R. et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle



contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. **Circulation research**, v. 59, n. 3, p. 297-309, 1986.

BRUM, P. C. et al. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 827-35, 2011.

BRUM, P. C. et al. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. **An. Acad. Bras. Ciênc**, v. 78, n. 3, 2006.

BUENO, C. R., JR. et al. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca<sup>2+</sup> handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **J Appl Physiol (1985)**, v. 109, n. 3, p. 702-9, 2010.

BYLUND, D. B. et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 2, p. 121-36, 1994.

CALVERT, J. W. et al. Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. **Circulation research**, v. 108, n. 12, p. 1448-58, 2011.

CALVERT, J. W.; LEFER, D. J. Role of beta-adrenergic receptors and nitric oxide signaling in exercise-mediated cardioprotection. **Physiology (Bethesda)**, v. 28, n. 4, p. 216-24, 2013.

CANNAVO, A. et al. beta1-adrenergic receptor and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) reciprocal downregulation influences cardiac hypertrophic response and progression to heart failure: protective role of S1PR1 cardiac gene therapy. **Circulation**, v. 128, n. 15, p. 1612-22, 2013.

CARNEIRO-JUNIOR, M. A. Treinamento físico de baixa intensidade e destreinamento: avaliação das propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos cardíacos de ratos espontaneamente hipertensos. 2009. Dissertação (Mestrado em Educação Física) - Departamento de Educação Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CARTER, J. B.; BANISTER, E. W.; BLABER, A. P. Effect of endurance exercise on autonomic control of heart rate. **Sports Med**, v. 33, n. 1, p. 33-46, 2003.

CHENG, J. et al. CaMKII inhibition in heart failure, beneficial, harmful, or both. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 7, p. H1454-65, 2012.

CHESLEY, A. et al. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. **Circ Res**, v. 87, n. 12, p. 1172-9, 2000.

CHOI, D. J. et al. Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 27, p. 17223-9, 1997.

CHRUSCINSKI, A. et al. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. **Molecular pharmacology**, v. 60, n. 5, p. 955-62, 2001.

CHRUSCINSKI, A. J. et al. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. **J Biol Chem**, v. 274, n. 24, p. 16694-700, 1999.

CHU, C. et al. Intraventricular and interventricular cellular heterogeneity of inotropic responses to alpha(1)-adrenergic stimulation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 304, n. 7, p. H946-53, 2013.

CLAPHAM, D. E.; NEER, E. J. G protein beta gamma subunits. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 167-203, 1997.

COMMUNAL, C. et al. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. **Circulation**, v. 100, n. 22, p. 2210-2, 1999.

DE WAARD, M. C. et al. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. **Circ Res**, v. 100, n. 7, p. 1079-88, 2007.

DEVIC, E. et al. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. **Molecular pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 577-83, 2001.

DIMOPOULOS, S. et al. Effects of exercise rehabilitation program on heart rate recovery in patients with chronic heart failure. **European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology**, v. 13, n. 1, p. 67-73, 2006.

ELLISON, G. M. et al. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. **Heart**, v. 98, n. 1, p. 5-10, 2012.

ENGELHARDT, S. Beta-adrenergic receptors in heart failure. **Heart Fail Clin**, v. 1, n. 2, p. 183-91, 2005.

ENGELHARDT, S. et al. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 12, p. 7059-64, 1999.

FERRARA, N. et al. beta-adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. **Front Physiol**, v. 4, p. 396, 2014.

FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760-5, 2007.

FOERSTER, K. et al. Cardioprotection specific for the G protein Gi2 in chronic adrenergic signaling through beta 2-adrenoceptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14475-80, 2003.

FUJIO, Y. et al. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. **Circulation**, v. 101, n. 6, p. 660-7, 2000.

FUJITA, T.; ISHIKAWA, Y. Apoptosis in heart failure. -The role of the beta-adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated signaling pathway in the apoptosis of cardiomyocytes. **Circ J**, v. 75, n. 8, p. 1811-8, 2011.

GOLDSMITH, R. L.; BLOOMFIELD, D. M.; ROSENWINKEL, E. T. Exercise and autonomic function. **Coron Artery Dis**, v. 11, n. 2, p. 129-35, 2000.

- HAMMOND, H. K.; RANSNAS, L. A.; INSEL, P. A. Noncoordinate regulation of cardiac Gs protein and beta-adrenergic receptors by a physiological stimulus, chronic dynamic exercise. **J Clin Invest**, v. 82, n. 6, p. 2168-71, 1988.
- HEIN, L.; KOBILKA, B. K. Adrenergic Receptors From Molecular Structure to in vivo function. **Trends Cardiovasc Med**, v. 7, n. 5, p. 137-45, 1997.
- IZUMO, S.; SHIOI, T. Cardiac transgenic and gene-targeted mice as models of cardiac hypertrophy and failure: a problem of (new) riches. **J Card Fail**, v. 4, n. 4, p. 263-70, 1998.
- JOHNSEN, A. B. et al. Aerobic interval training partly reverse contractile dysfunction and impaired Ca<sup>2+</sup> handling in atrial myocytes from rats with post infarction heart failure. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66288, 2013.
- KADAMBI, V. J.; KRANIAS, E. G. Genetically engineered mice: model systems for left ventricular failure. **J Card Fail**, v. 4, n. 4, p. 349-61, 1998.
- KATZ, A. M. Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptive proliferative responses. **J Cell Mol Med**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2003.
- KEMI, O. J. et al. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. **Cardiovasc Res**, v. 67, n. 1, p. 161-72, 2005.
- KEMI, O. J. et al. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. **J Appl Physiol (1985)**, v. 93, n. 4, p. 1301-9, 2002.
- KILTS, J. D. et al. Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). **Circulation research**, v. 87, n. 8, p. 705-9, 2000.
- KOBILKA, B. K. G protein coupled receptor structure and activation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, n. 4, p. 794-807, 2007.
- KORZICK, D. H. et al. Chronic exercise improves myocardial inotropic reserve capacity through alpha1-adrenergic and protein kinase C-dependent effects in Senescent rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 59, n. 11, p. 1089-98, 2004.
- KORZICK, D. H.; MOORE, R. L. Chronic exercise enhances cardiac alpha 1-adrenergic inotropic responsiveness in rats with mild hypertension. **Am J Physiol**, v. 271, n. 6 Pt 2, p. H2599-608, 1996.
- KRALJEVIC, J. et al. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. **Cardiovasc Res**, v. 99, n. 1, p. 55-64, 2013.
- KUSCHEL, M. et al. G(i) protein-mediated functional compartmentalization of cardiac beta(2)-adrenergic signaling. **J Biol Chem**, v. 274, n. 31, p. 22048-52, 1999a.
- KUSCHEL, M. et al. beta2-adrenergic cAMP signaling is uncoupled from phosphorylation of cytoplasmic proteins in canine heart. **Circulation**, v. 99, n. 18, p. 2458-65, 1999b.
- LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **J Lipid Res**, v. 34, n. 7, p. 1057-91, 1993.

LEE, S. et al. Total beta-adrenoceptor deficiency results in cardiac hypotrophy and negative inotropy. **Physiol Res**, v. 59, n. 5, p. 679-89, 2010.

LEFKOWITZ, R. J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. **J Biol Chem**, v. 273, n. 30, p. 18677-80, 1998.

LEOSCO, D. et al. Effects of exercise training on cardiovascular adrenergic system. **Front Physiol**, v. 4, p. 348, 2013.

LEOSCO, D. et al. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. **Cardiovasc Res**, v. 78, n. 2, p. 385-94, 2008.

LIBONATI, J. R.; MACDONNELL, S. M. Cardiac beta-adrenergic responsiveness with exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 11, p. 2735-41, 2011.

LIGGETT, S. B. et al. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. **Circulation**, v. 101, n. 14, p. 1707-14, 2000.

LLEWELLYN, T. L. et al. Effects of exercise training on SFO-mediated sympathoexcitation during chronic heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 1, p. H121-31, 2014.

LOCATELLI, J.; DE ASSIS, L. V.; ISOLDI, M. C. Calcium handling proteins: structure, function, and modulation by exercise. **Heart Fail Rev**, 2013.

MACDONNELL, S. M. et al. Improved myocardial beta-adrenergic responsiveness and signaling with exercise training in hypertension. **Circulation**, v. 111, n. 25, p. 3420-8, 2005.

MACLELLAN, W. R.; SCHNEIDER, M. D. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. **Annu Rev Physiol**, v. 62, p. 289-319, 2000.

MANN, D. L. Basic mechanisms of disease progression in the failing heart: the role of excessive adrenergic drive. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 41, n. 1 Suppl 1, p. 1-8, 1998.

MCMURRAY, J. J. et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. **Eur J Heart Fail**, v. 14, n. 8, p. 803-69, 2012.

MEDEIROS, A. et al. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. **J Appl Physiol (1985)**, v. 104, n. 1, p. 103-9, 2008.

MILLIGAN, G.; SVOBODA, P.; BROWN, C. M. Why are there so many adrenoceptor subtypes? **Biochem Pharmacol**, v. 48, n. 6, p. 1059-71, 15 1994.

MOHL, M. C. et al. Regulation of murine cardiac contractility by activation of alpha(1A)-adrenergic receptor-operated Ca(2+) entry. **Cardiovasc Res**, v. 91, n. 2, p. 310-9, 2011.

- MOORE, R. L.; KORZICK, D. H. Cellular adaptations of the myocardium to chronic exercise. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 37, n. 6, p. 371-96, 1995.
- MOORE, R. L. et al. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. **Am J Physiol**, v. 264, n. 5 Pt 1, p. C1180-9, 1993.
- MUNDINA-WEILENMANN, C. et al. Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. **J Biol Chem**, v. 271, n. 52, p. 33561-7, 1996.
- NAGA PRASAD, S. V.; NIENABER, J.; ROCKMAN, H. A. Beta-adrenergic axis and heart disease. **Trends Genet**, v. 17, n. 10, p. S44-9, 2001.
- NATALI, A. J. et al. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. **J Exp Biol**, v. 204, n. Pt 6, p. 1191-9, 2001.
- NEUBER, C. et al. Paradoxical effects on force generation after efficient beta1-adrenoceptor knockdown in reconstituted heart tissue. **J Pharmacol Exp Ther**, 2014.
- O'CONNELL, T. D. et al. Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 1, p. 308-33, Jan 2014.
- OLIVEIRA, R. S. et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 15, p. 3899-910, 2009.
- PATTERSON, A. J. et al. Protecting the myocardium: a role for the beta2 adrenergic receptor in the heart. **Crit Care Med**, v. 32, n. 4, p. 1041-8, 2004.
- PIEPOLI, M. F. et al. Exercise intolerance in chronic heart failure: mechanisms and therapies. Part II. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v. 17, n. 6, p. 643-8, 2010.
- PITCHER, J. A.; FREEDMAN, N. J.; LEFKOWITZ, R. J. G protein-coupled receptor kinases. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 653-92, 1998.
- POWERS, S. K. et al. Exercise and cardioprotection. **Curr Opin Cardiol**, v. 17, n. 5, p. 495-502, 2002.
- ROCKMAN, H. A.; KOCH, W. J.; LEFKOWITZ, R. J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 206-12, 2002.
- ROHRER, D. K. et al. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. **J Biol Chem**, v. 274, n. 24, p. 16701-8, 1999.
- ROHRER, D. K. et al. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 14, p. 7375-80, 1996.
- ROLIM, N. P. et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure. **Physiol Genomics**, v. 29, n. 3, p. 246-52, 2007.
- RONA, G. Catecholamine cardiotoxicity. **J Mol Cell Cardiol**, v. 17, n. 4, p. 291-306, 1985.

- SATOH, H., L. M. et al. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. **Biophys J**, v.70, n.3, p.1494-504, 1996.
- SNOEK, J. A. et al. Effect of aerobic training on heart rate recovery in patients with established heart disease; a systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83907, 2013.
- SOLOVEVA, V. et al. Transgenic mice overexpressing the beta 1-adrenergic receptor in adipose tissue are resistant to obesity. **Mol Endocrinol**, v. 11, n. 1, p. 27-38, 1997.
- STONES, R. et al. Voluntary exercise-induced changes in beta2-adrenoceptor signalling in rat ventricular myocytes. **Exp Physiol**, v. 93, n. 9, p. 1065-75, 2008.
- TANG, M. et al. Enhanced basal contractility but reduced excitation-contraction coupling efficiency and beta-adrenergic reserve of hearts with increased Cav1.2 activity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 299, n. 2, p. H519-28, 2010.
- UETA, C. B. et al. beta(1) Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. **J Endocrinol**, v. 214, n. 3, p. 359-65, 2012.
- VANZELLI, A. S. et al. Integrative effect of carvedilol and aerobic exercise training therapies on improving cardiac contractility and remodeling in heart failure mice. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62452, 2013.
- WALLUKAT, G. The beta-adrenergic receptors. **Herz**, v. 27, n. 7, p. 683-90, 2002.
- WANG, G. Y. et al. Heart failure switches the RV alpha1-adrenergic inotropic response from negative to positive. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 298, n. 3, p. H913-20, 2010.
- WISLOFF, U. et al. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, v. 54, n. 1, p. 162-74, 2002.
- WISLOFF, U. et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovasc Res**, v. 50, n. 3, p. 495-508, 2001.
- XIANG, Y.; KOBILKA, B. K. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1530-2, 2003.
- XIANG, Y. et al. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 37, p. 34280-6, 2002.
- XIANG, Y. K. Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes. **Circ Res**, v. 109, n. 2, p. 231-44, 2011.
- XIAO, R. P. et al. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. **Circ Res**, v. 85, n. 11, p. 1092-100, 1999.
- YOO, B. et al. Beta1-adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 4, p. H1377-86, 2009.
- ZHENG, H. et al. Exercise training normalizes enhanced sympathetic activation from the paraventricular nucleus in chronic heart failure: role of angiotensin II. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 303, n. 4, p. R387-94, 2012.

ZHU, W. Z. et al. Heterodimerization of beta1- and beta2-adrenergic receptor subtypes optimizes beta-adrenergic modulation of cardiac contractility. **Circ Res**, v. 97, n. 3, p. 244-51, 2005.

ZHU, W. Z. et al. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 617-25, 2003.

ZHU, W. Z. et al. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 4, p. 1607-12, 2001.