

ALEXANDRE JAYME LOPES DANTAS COSTA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA E AS
PROPRIEDADES MECÂNICAS EM CARDIOMIÓCITOS DE
CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA OS RECEPTORES β_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
2018

**Ficha catalográfica elaborada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa**

T

C837e
2018

Costa, Alexandre Jayme Lopes Dantas, 1986-
Efeitos do treinamento físico sobre a função cardíaca e as
propriedades mecânicas em cardiomiócitos de camundongos
Knockout para os receptores β 2-adrenérgicos / Alexandre Jayme
Lopes Dantas Costa. – Viçosa, MG, 2018.
xiii, 55 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Thales Nicolau Primola Gomes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 32-41.

1. Exercícios físicos. 2. Camundongos como rato de
laboratório. 3. Células do coração. 4. Adrenalina – Receptores.
5. Coração – Contração. 6. Contração muscular. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Educação Física. Programa
de Pós-Graduação em Educação Física. II. Título.

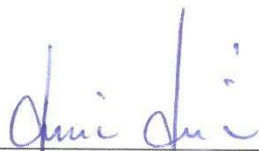
CDD 22. ed. 613.71

ALEXANDRE JAYME LOPES DANTAS COSTA

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA E AS
PROPRIEDADES MECÂNICAS EM CARDIOMIÓCITOS DE
CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* PARA OS RECEPTORES β_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*.

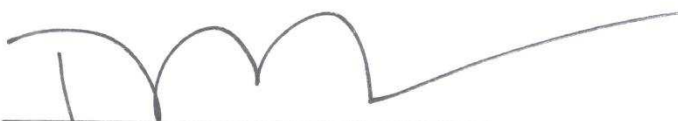
APROVADA: 27 de agosto de 2018.



Luciana Moreira Lima



Maria do Carmo Gouveia Peluzio



Thales Nicolau Primola Gomes
(Orientador)

**A Deus por todas as graças alcançadas e mais um ciclo concretizado;
Aos meus pais Simião e Denise, pelo apoio incondicional;
As minhas irmãs Esther e Silvia por todo apoio, conselhos e amor;
Aos animais experimentais.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças alcançadas, pelo aprendizado adquirido e pelas relações estabelecidas.

Aos meus pais Simião e Denise e irmãs Esther e Silvia, base para minhas conquistas, por todo amor, sinceridade, companheirismo.

Aos meus avós Sebastião da Silva Dantas e Esther de Freitas Vargas Dantas, pelo apoio e carinho durante minha trajetória. Vocês são exemplos de pessoas.

Ao professor Dr. Thales Nicolau Primo Gomes, orientador, educador e exemplo de profissional. Obrigado pela oportunidade de continuar a estudar, por todos os ensinamentos, confiança, paciência e presença constante e ativa na realização deste trabalho.

À minha amiga Aurora Correa Rodrigues pela presença, paciência, ensinamentos, contribuições e disponibilidade de estar sábados e domingos no laboratório ajudando em todo o processo da construção desse trabalho. A você, meu imenso muito obrigado.

Ao meu amigo Leôncio Lopes Soares por todos os conselhos, ajudas, pelos momentos de descontração e disponibilidade.

Aos meus coorientadores professor Dr. Antônio José Natali, professor Dr. Miguel Araújo Carneiro Júnior, Tiago Ferreira Leal e aos amigos do laboratório de Biologia do Exercício (Leonardo, Felipe, Samuel, Victor, Franciany, Anselmo, Meilene), pelos conselhos, trocas de experiências e momentos de diversão.

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.

Aos professores Dr^a. Luciana Moreira Lima e Maria do Carmo Gouveia Peluzio por aceitarem o convite de participar da minha banca.

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

Ao laboratório de Biologia do Exercício, minha segunda casa, por toda estrutura para realização deste trabalho.

Ao Departamento de Educação Física com todo seu corpo docente e servidores, em especial aos professores da pós-graduação em Educação Física UFV/UFJF por todo ensinamento nessa caminhada.

Às agências financiadoras CAPES, FAPEMIG e CNPq, que contribuíram e possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos animais experimentais, que merecem todo o respeito.

À UFV, pela oportunidade de realização de mais uma etapa de minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Animais de experimentação e tratamentos.....	12
3.2. Grupos experimentais.....	12
3.3. Teste de esforço progressivo em esteira.....	13
3.4. Protocolo de treinamento.....	13
3.5. Isolamento dos cardiomiócitos.....	14
3.6. Soluções de isolamento.....	15
3.7. Contração celular.....	16
3.8. Mensuração cálcio intracelular transiente.....	18
3.9. Exame ecocardiográfico.....	19
4.0. Análise estatística.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Peso corporal.....	21
5.2. Peso do coração, do ventrículo esquerdo e suas razões.....	21
5.3. Capacidade para exercício.....	21
5.4. Medidas ecocardiográficas.....	21
5.5. Contração celular.....	23
5.6. Cálcio intracelular transiente.....	25
6. DISCUSSÃO.....	27
6.1. Peso corporal.....	27
6.2. Peso do coração, do ventrículo esquerdo e suas razões.....	27
6.3. Capacidade para exercício.....	28

6.4. Medidas ecocardiográficas.....	28
6.5. Contração celular e Cálcio intracelular transiente.....	28
7. CONCLUSÃO.....	31
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	32
9. Anexo 1- Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	42
10. Anexo 2- Proposta de publicação de artigo.....	43

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
α 1-AR	- Receptor α 1-adrenérgico
α -AR	- Receptor α -adrenérgico
α 2a/2c-ARs	- Receptores α 2a/2c-adrenérgico
β	- Beta
β 1-AR	- Receptor β 1-adrenérgico
β 2-AR	- Receptor β 2-adrenérgico
β 3-AR	- Receptor β 3-adrenérgico
β -AR	- Receptor β -adrenérgico
Ca ²⁺	- Íon Cálcio
CaCl	- Cloreto de cálcio
EACM	- Exercício aeróbico contínuo de intensidade moderada
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DDFVE	- Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo
DSFVE	- Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo
EGTA	- Ácido etilenoglicol tetracético
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	- Erro padrão da média
FC	- Frequência cardíaca
FE	- Fração de ejeção
FLB	- Fosfolambam
FLB _{Ser16}	- Fosfolambam fosforilada no resíduo de serina 16
FoxO	- Fator de transcrição <i>forkhead Box O</i>
FVB	- Camundongos da linhagem FVB/N
GDP	- Guanosina difosfato
Gi	- Proteína G inibitória

GPCRs	- Receptores acoplados à proteína G
GRK	- Receptor de quinase acoplado à proteína G
GSK3 β	- Glicogênio sintase quinase
Gs	- Proteína G estimulatória
GTP	- Guanosina trifosfato
G α	- Subunidade G α da proteína G
G β	- Subunidade G β da proteína G
G $\beta\gamma$	- Dímero G $\beta\gamma$ da proteína G
G γ	- Subunidade G γ 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 ⁺	- Íon Potássio
KCl	- Cloreto de potássio
KO	- <i>Knockout</i>
KO β 1	- Camundongos com inativação gênica dos receptores β 1-adrenérgicos
KO β 2	- Camundongos com inativação gênica dos receptores β 2-adrenérgicos
μ	- Média aritmética de uma população de dados
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
mTOR	- <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MyBP-C	- Proteína C de ligação à miosina
n	- Número de animais
Na ⁺	- Íon Sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	- Fosfato monossódico
NaOH	- Hidróxido de sódio
NCX	- Canais trocadores de Na ⁺ e Ca ²⁺
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase

O ₂	- Oxigênio
PC	- Peso corporal
PCor	- Peso do coração
PVE	- Peso do ventrículo esquerdo
PCor/PC	- Razão peso do coração pelo peso corporal
PVE/PC	- Razão peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal
PI3K	- Fosfatidilinositol 3 quinase
PKA	- Proteína quinase A
PM	- Peso Molecular
PTX	- Toxina pertussis
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA _m	- RNA mensageiro
RS	- Retículo sarcoplasmático
RyR2	- Canais receptores de rianodina do tipo 2
s ²	- Variância em uma amostra de dados
SERCA2a	- Isoforma cardíaca da Ca ²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático
TG	- Transgênico
TnI	- Troponina I
VE	- Ventrículo esquerdo
VM	- Velocidade máxima
VO _{2max}	- Volume máximo de oxigênio
X	- Uma variável qualquer, geralmente quantitativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização β -adrenérgica nos cardiomiócitos	4
Figura 2. Via de sinalização do receptor β_2 -adrenérgico.....	6
Figura 3. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados.....	17
Figura 4. Traçado representativo de uma contração celular.....	18
Figura 5. Contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo	24
Figura 6. Cálcio intracelular transiente ($[Ca^{2+}]_i$) de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de treinamento	14
Tabela 2. Peso corporal, peso do coração, peso do ventrículo esquerdo e suas razões, capacidade para exercício e parâmetros ecocardiográficos	22

RESUMO

COSTA, Alexandre Jayme Lopes Dantas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2018. **Efeitos do treinamento físico sobre a função cardíaca e as propriedades mecânicas em cardiomiócitos de camundongos *knockout* para os receptores β_2 -adrenérgicos.** Orientador: Thales Nicolau Prímola Gomes. Coorientadores: Antônio José Natali, Miguel Araújo Carneiro Júnior e Tiago Ferreira Leal.

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do exercício aeróbico contínuo de intensidade moderada (EACM) sobre as propriedades mecânicas e funcionais de cardiomiócitos de camundongos *knockout* (KO) para receptores β_2 -adrenérgicos. Camundongos FVB/N e KO para os receptores β_2 -adrenérgicos com 4 meses de idade foram inicialmente separados aleatoriamente em 4 grupos: selvagem controle (FVBc; n = 11), selvagem treinado (FVBt; n = 11), KO β_2 controle (KO β_2 c; n = 12) e KO β_2 treinado (KO β_2 t; n = 12). Os animais dos grupos treinados (FVBt e KO β_2 t) 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. Após a eutanásia, os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foram isolados por dispersão enzimática. A função cardíaca, os parâmetros contráteis e o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo foram mensurados. $P \leq 0,05$ foi considerado significativo em todas as comparações. Os resultados mostram que o EACM aumentou a capacidade de corrida em camundongos KO β_2 e FVB, embora a fração de encurtamento e a fração de ejeção não tenha sido alterada em camundongos KO β_2 . Camundongos KO β_2 t também apresentaram menor amplitude de contração, menor tempo para o pico de contração e menor tempo para 50% de relaxamento do que os camundongos FVBt. Além disso, camundongos KO β_2 t apresentaram menor amplitude Ca^{2+} e menor tempo para 50% de decaimento comparado com camundongos FVBt. Em conclusão, o EACM reduziu a amplitude de contração, o tempo para pico de contração e a amplitude do Ca^{2+} nos cardiomiócitos de camundongos KO β_2 .

ABSTRACT

COSTA, Alexandre Jayme Lopes Dantas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2018. **Effects of exercise training on cardiac function and mechanical properties in cardiomyocytes from β_2 adrenergic receptors knockout mice.** Adviser: Thales Nicolau Prímola Gomes. Co-advisers: Antônio José Natali, Miguel Araújo Carneiro Júnior and Tiago Ferreira Leal.

The aim of this study was to investigate the effects of Moderate Continuous Aerobic Exercise (MCAE) on the mechanical and functional properties in cardiomyocytes from β_2 adrenergic receptor knockout mice (KO). Four-month-old FVB/N and KO mice were initially randomly divided into 4 groups: control wild (FVBc; n= 11), trained wild (FVBt; n= 11), control KO β_2 (KO β_2 c; n= 12) e trained KO β_2 (KO β_2 t; n= 12). The animals of the trained groups (FVBt, KO β_2 t) were submitted to a protocol of aerobic training 8 weeks, 5 days/week, 1 hour/day, intensity of 60% of maximal speed. At sacrifice, the heart was removed and left ventricular myocytes were enzymatically dispersed. Cardiac function, contractile parameters, and $[Ca^{2+}]_i$ transient of left ventricular cardiomyocytes were measured. $P \leq 0.05$ was considered significant in all comparisons. The results showed that the MCAE increased the running capacity in KO β_2 e FVB mice, although the shortening fraction and the ejection fraction were not altered in β_2 KO mice. KO β_2 t mice also showed lower contraction amplitude and shorter times to peak and to 50% relaxation than FVBt mice. In addition, KO β_2 t mice showed lower Ca^{2+} transient amplitude and shorter time to 50% decay of the Ca^{2+} transient than WT mice. In conclusion, MCAE reduced the contraction amplitude, time to peak and Ca^{2+} transient amplitude in cardiomyocytes from KO β_2 mice.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, através da técnica de clonagem molecular foram identificados 9 tipos de receptores adrenérgicos que são divididos em dois grandes grupos, os beta adrenérgicos (β -ARs), classificados em β_1 , β_2 , β_3 (Collins e Surwit, 2001) e os alfa adrenérgicos (α -ARs), subdivididos em α_1A , α_1B , α_1D , α_2A , α_2B , α_2C (Fitzgerald, 2007). Esses receptores estão presentes em diferentes proporções nos diversos tecidos do organismo, sendo que os cardiomiócitos expressam seis subtipos de receptores adrenérgicos, os β_1 -, β_2 -, β_3 -, α_1A -, α_1B -, α_1D -ARs (Hein e Kobilka, 1997). Dados recentes mostram que no coração, os dois principais receptores adrenérgicos são os β -ARs e os α -ARs, tendo papel fundamental na regulação da função cardíaca e representando respectivamente 90% e 10% dos receptores adrenérgicos presentes no coração (Baker, 2014).

Nas últimas décadas, o crescente avanço na biologia molecular e na manipulação genética possibilitou a produção de animais geneticamente modificados, transgênicos (TG) ou *knockout* (KO), os quais têm auxiliado na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na via de sinalização adrenérgica e nas fisiopatologias cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca (IC) (Brum *et al.*, 2006). Os animais geneticamente modificados são ferramentas mais eficientes e fidedignas do que os modelos farmacológicos, em função da possibilidade de a deleção genética de um subtipo de receptor, como por exemplo, permite gerar respostas precisas sobre sua função específica em um nível que geralmente não pode ser alcançado usando agonista ou antagonista farmacológicos, devido à falta de seletividade suficiente para o subtipo específico. Esta técnica de manipulação genética é uma ferramenta poderosa que permite atribuir funções específicas e individuais de cada subtipo de receptor adrenérgico. Como a utilização de camundongos geneticamente modificados foi possível observar que o β_1 -AR é o principal mediador dos efeitos cronotrópicos e inotrópicos em resposta às catecolaminas, já que estas respostas estavam completamente ausentes em camundongos *knockout* para β_1 -AR (Rohrer *et al.*, 1996). Em contraste, foi possível notar que animais *knockout* para β_2 -AR tem pouca influência nas respostas cardíacas às catecolaminas (Chruscinski *et al.*, 1999).

Os β -ARs são membros de uma grande família de proteínas de membrana conhecidas como receptores acoplados à proteína G (*guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor*, família de GPCR) (Vassilatis *et al.*, 2003), receptores que apresentam sete regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana celular. Eles exercem a interface entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema cardiovascular (Brum *et al.*, 2006), estando assim envolvidos na regulação de uma vasta gama de processos fisiológicos (Bernstein *et al.*, 2005). A sinalização mediada por GPCR é iniciada pela ligação de um agonista ao receptor que induz uma alteração

conformacional no GPCR causando o recrutamento e estimulando a proteína G, que é heterotrímica e apresenta em sua estrutura três subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$. (Rockman *et al.*, 2002; Kobilka, 2007; Xiang, 2011)

Embora pesquisas demonstrem que os subtipos β_1 - e β_2 -AR são funcionalmente e estruturalmente semelhantes entre si, eles apresentam diferenças significativas no que cerne às vias de sinalização para cada subtipo, resultando em diferentes respostas tanto na função quanto na estrutura cardíaca (Bristow *et al.*, 1986; Madamanchi, 2007). Assim, esses mecanismos de sinalização distintos em miócitos cardíacos podem ter uma importante relevância clínica, já que animais transgênicos com ativação crônica de β_1 -AR desenvolvem hipertrofia cardíaca grave, fibrose e insuficiência cardíaca. Entretanto, animais com superexpressão β_2 -AR, até certos níveis, não apresentam nenhuma disfunção cardíaca (Engelhardt *et al.*, 1999; Liggett *et al.*, 2000).

Sabe-se que a razão entre β_1 e β_2 -ARs varia entre as espécies. Evidências tem demonstrado que o papel fisiológico da sinalização do β_2 -AR é específica do estado de desenvolvimento, da idade, da espécie e da fisiopatologia do coração (Xiang e Kobilka, 2003; Pavoine e Defer, 2005; Moura *et al.*, 2017). Nos ventrículos humano, o subtipo β_1 -AR apresenta uma razão aproximada de 80% do total de todos os β -ARs cardíacos enquanto que o subtipo β_2 -AR compreende 20% dos β -ARs cardíacos (Wallukat, 2002). De maneira semelhante, os camundongos apresentam uma razão de 75%:25% de β_1 - e β_2 -ARs, respectivamente (Brodde e Michel, 1999). Já na IC, as proporções dos subtipos β_1 :- β_2 -ARs cardíaco se aproximam, tendo uma razão aproximada de 50% para cada subtipo (Wachter e Gilbert, 2012).

O β_1 -AR é o subtipo predominante no coração no que diz respeito a densidade e modulação das respostas contráteis cardíacas (Bristow *et al.*, 1986; Zhu *et al.*, 2001). A ativação desse receptor nos miócitos ventriculares produzem efeitos cronotrópicos e inotrópicos robustos. As principais resposta induzidas pela ativação do β_1 -AR nos miócitos cardíacos de roedores são caracterizadas por um aumento na contração (inotropismo positivo), aumento na frequência cardíaca (cronotropismo positivo), maior velocidade de relaxamento (lusitropismo positivo) e aumento na velocidade de condução do impulso elétrico (dromotropismo positivo) (Rohrer *et al.*, 1996; Chruscinski *et al.*, 1999), enquanto β_2 -AR produz um menor efeito cronotrópico e inotrópico (Devic *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Xiang e Kobilka, 2003).

Os β_2 -AR são expressos principalmente em células endoteliais(Chruscinski *et al.*, 2001), atuando diretamente no relaxamento vascular periférico (Chruscinski *et al.*, 1999) e contribuindo para a distribuição do fluxo sanguíneo para diferentes tecidos. Entretanto, os β_2 -AR também podem mediar respostas funcionais em miócitos cardíacos (Post *et al.*, 1999),

aumentar a glicogenólise e gliconeogênese no fígado, bem como aumentar a secreção de insulina e glucagon nas ilhotas pancreáticas (Fitzgerald, 2007).

O subtipo β_3 -AR é a isoforma β -ARs de menor expressão no miocárdio de humanos e murinos (Cannavo e Koch, 2017). Seu papel cardíaco não é estudado na mesma intensidade que os β_1 e β_2 -ARs (Cannavo e Koch, 2017), porém, torna-se válido ressaltar que esse receptor foi descrito como mediador dos efeitos inotrópicos negativos em miócitos cardíacos de humanos através de um mecanismo dependente da proteína G inibitória (Gi) (Zhu *et al.*, 2001; Calvert e Lefer, 2013).

Quando a proteína G está na sua forma inativa, ou seja, na ausência de um agonista, uma molécula de guanosina difosfato (GDP) encontra-se ligada à subunidade $G\alpha$, formando um complexo associado às subunidades β e γ ($G\alpha\beta\gamma$). A ligação do agonista ao receptor resulta na troca da GDP ligada à $G\alpha$ pela guanosina trifosfato (GTP) (Wess, 1997; Madamanchi, 2007), promovendo a dissociação da proteína G em subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$ ativas (Bargmann, 1998; Hamm, 1998; Rockman *et al.*, 2002; Katz, 2003; Madamanchi, 2007). Assim, $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$ vão mediar diferentes cascatas de sinalização (Clapham e Neer, 1997; Ford *et al.*, 1998; Madamanchi, 2007). Ambas as subunidades amplificam a força dos sinais intracelulares através da ativação ou inibição de moléculas efetoras tais como adenilato ciclase (AC) ou fosfolipase C-b (PLC-b) (Madamanchi, 2007; Ferrara *et al.*, 2014). Essas moléculas efetoras são capazes de regular a concentração intracelular de um “segundo mensageiro”, que irão induzir respostas celulares aos agonistas ligados aos receptores (Pitcher *et al.*, 1998).

No coração, os efeitos das catecolaminas ocorrem através da ativação dos receptores beta-adrenérgicos (β -ARs), principalmente os subtipos β_1 e β_2 -ARs, ambos acoplados à proteína G estimulatória (Gs) que irá ativar a via de sinalização da adenilato ciclase (AC) (Woo *et al.*, 2015). O AC quando ativo, desencadeia a catálise da adenosina trifosfato (ATP), formando 3'-5' monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc tem o papel de segundo mensageiro e o seu principal mecanismo de ação é a ativação da proteína quinase A (PKA) dependente de AMPc. A PKA é capaz de fosforilar diversas proteínas envolvidas no complexo de acoplamento excitação-contração dos cardiomiócitos (AEC) (Xiang, 2011; Fajardo *et al.*, 2013), como representado na figura 1.

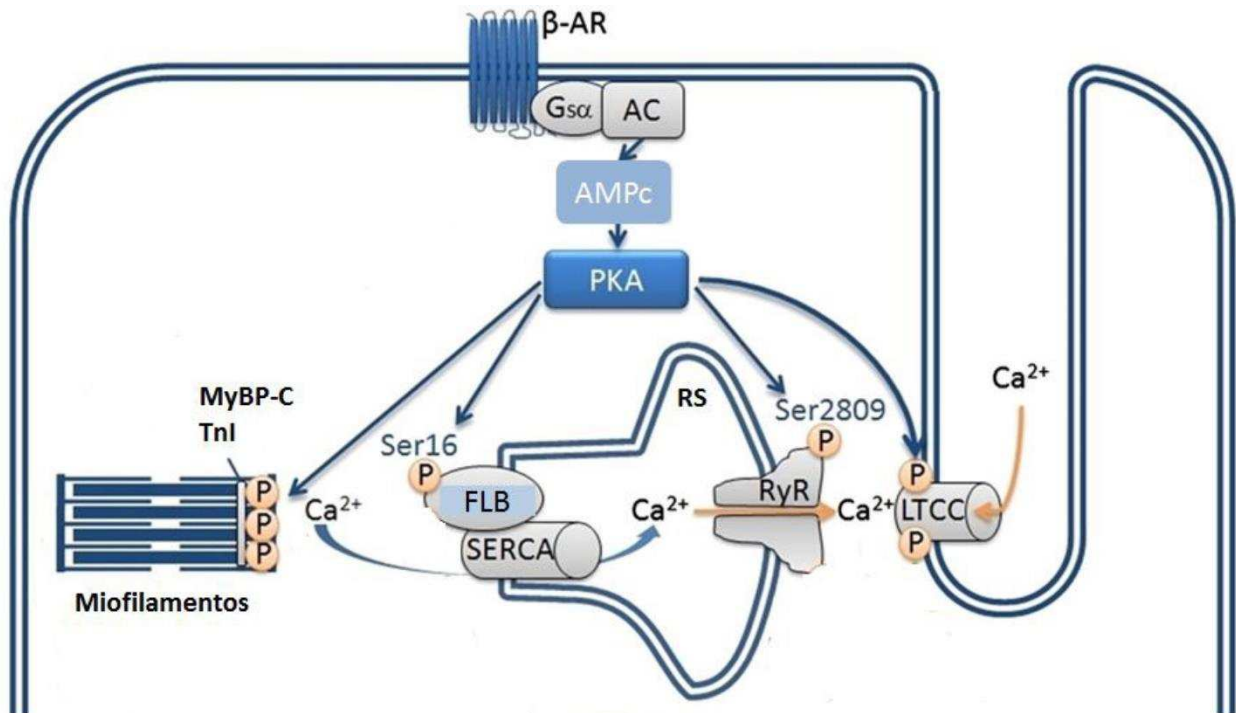


Figura 1: Via de sinalização β -adrenérgica nos cardiomiócitos. Receptor β -adrenérgico (β -AR); proteína estimulatória ($G_{s\alpha}$); adenilato ciclase (AC); monofosfato de adenosina cíclico (AMPc); proteína quinase A (PKA); canais de Ca^{2+} do tipo L (LTCC); retículo sarcoplasmático (RS); receptor 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 Ca^{2+} do RS (SERCA). Fonte: Rodrigues, Aurora (2014)

A ativação β -adrenérgica e a subsequente fosforilação das proteínas do complexo de AEC mediada por PKA acarreta em um aumento do Ca^{2+} intracelular através da fosforilação dos canais para Ca^{2+} do tipo L (Madamanchi, 2007; Fajardo *et al.*, 2013) e dos receptores de rianodina tipo 2 (RyR2) (Katz, 2003; Xiang e Kobilka, 2003); aceleração na recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RSP) (Cory *et al.*, 1994), através da fosfolambam (FLB) (Brittsan e Kranias, 2000) e da Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA2a) (Xiang e Kobilka, 2003); diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , por meio da troponina I (TnI) e da proteína C de ligação à miosina (MyBP-C) (Bers, 2002; Xiang e Kobilka, 2003).

A ativação do β_2 -AR resulta em um acoplamento bifásico, sendo os primeiros minutos da estimulação predominante o acoplamento à proteína G_s , seguido de acoplamento à proteína G_i (Devic *et al.*, 2001; Xiang e Kobilka, 2003), subunidade da proteína G que impossibilita a ativação da AC nos cardiomiócitos (Zhu *et al.*, 2001; Xiang e Kobilka, 2003). Assim, o acoplamento a proteína G_i libera a subunidade $G_{i\alpha}$ que inibe adenilato ciclase, promovendo a

diminuição de AMPc e PKA (Xiang e Kobilka, 2003; Madamanchi, 2007). Por outro lado, o tratamento com toxina pertussis (PTX) resulta em um desacoplamento do receptor com a proteína Gi aumentando a estimulação da AC (Wettschureck e Offermanns, 2005) e a fosforilação de FLB no resíduo serina 16 (FLBSer16), levando a um lusitropismo positivo e um aumento do efeito inotrópico em cardiomiócitos de ratos (Xiao *et al.*, 1995).

Evidências tem sugerido que a sinalização β_2 -AR é cardioprotetora. Essa ação cardioprotetora pode estar relacionada ao acoplamento à proteína Gi e sua capacidade de de inibir G_{as} / AC / PKA, atenuando os efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos da estimulação β_1 -AR, bem como ativa uma via de sinalização adicional para a cardioproteção, a via Gi-G $\beta\gamma$ -PI3K-Akt, responsável por promover a sobrevivência dos cardiomiócitos. (Communal *et al.*, 1999; Chesley *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2011). A ativação da PI3K fosforila e ativa a proteína quinase B (AKT), que irá fosforilar a proteína quinase alvo da rapamicina dos mamíferos (mTOR), induzindo um aumento na síntese proteica por meio da ativação da P70S6K, que é um regulador-chave envolvido na tradução e síntese proteica, bem como inibe o fator de transcrição *forkhead box O* (FoxO) e o glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), estimulando processos relacionados à hipertrofia e inibindo aqueles relacionado a apoptose e atrofia (Zhu *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2011; Woo e Xiao, 2012), como ilustrado na Fig. 2 .

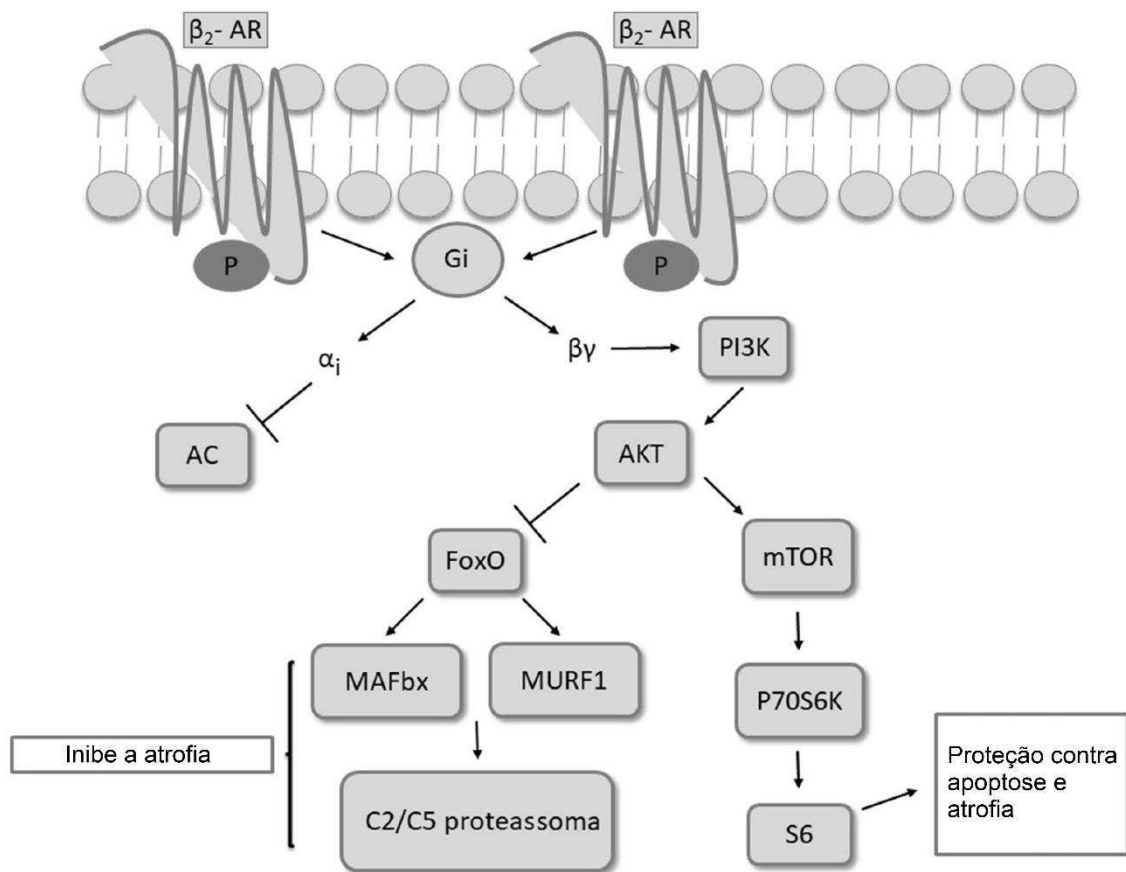


Figura 2: Representação da via de sinalização do receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -ARs)-Gi. Proteína G inibitória (Gi); Subunidade *alfa* da Gi (α_i); Subunidade *beta-gama* da Gi ($\beta\gamma$), Adenilato ciclase (AC); Proteína quinase B (AKT); Fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K); Alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR); Proteína quinase S6 ribossomal (P70S6K); Proteína ribossomal S6 (S6); Fator de transcrição *forkhead box O* (FoxO); Atrofia muscular *F-box* (MAFbx); *Muscle RING finger 1 protein* (MURF1). Fonte: Spadari, 2018.

Em cardiomiócitos isolados, a sinalização PI3K é uma via implicada na hipertrofia cardíaca e proteção de miócitos à apoptose mediado por inúmeros agonistas exógenos e estresse (Kodama *et al.*, 2000). Assim, o acoplamento do β_2 -AR à proteína Gi parece desempenhar um mecanismo cardioprotetor, se opondo à apoptose mediada pela via de sinalização do β_1 -AR, principalmente em pacientes com IC (Santos *et al.*, 2005). Um estudo demonstrou os efeitos da norepinefrina (NE) no aumento da apoptose em miócitos ventriculares de ratos adultos, sendo este efeito principalmente atribuído à sinalização através dos β_1 -AR (Communal *et al.*, 1998).

Outros estudos com camundongos KO β_2 revelaram que a estimulação do β_1 -AR através de um agonista não seletivo isoproterenol (ISO) gerou disfunção cardíaca bem como o aumento na apoptose dos cardiomiócitos (Zhu *et al.*, 2003; Patterson *et al.*, 2004). Portanto, apesar de ambos os receptores estarem presentes nos miócitos cardíacos e mediarem efeitos inotrópicos e cronotrópicos, o efeito tóxico da estimulação β -adrenérgica parece ser amplamente mediado pelo β_1 -AR.

Estudos apontam que a expressão até 100x maior de β_2 -AR nos níveis endógenos gerou um efeito inotrópico positivo sem induzir hipertrofia cardíaca ou levar à IC (Liggett *et al.*, 2000), pelo menos até 1 ano de idade. Por outro lado, níveis de expressão elevado, acima de 350x induz fenótipos patológicos, desencadeando IC e morte prematura (Liggett *et al.*, 2000). De maneira oposta, a superexpressão modesta de β_1 -AR a níveis 5 a 15 vezes nos níveis endógenos acarretou em hipertrofia cardíaca, apoptose e fibrose poucas semanas após o nascimento e o desenvolvimento da IC após alguns meses (Engelhardt *et al.*, 1999). Em conjunto, esses resultados sugerem o papel diferencial dos subtipos de receptores β -Ar na patogênese de cardiomiopatias.

Evidências clínicas tem sugerido que a redução da ativação do β_1 -AR com o uso de um antagonista seletivo para β_1 -AR e o aumento da regulação da via de sinalização β_2 -AR por um agonista seletivo na hipertrofia cardíaca compensatória ou no estágio inicial da IC poderia resultar em uma modulação mais favorável do sistema β -AR e representar assim, um mecanismo cardioprotetor (Xiang e Kobilka, 2003). Porém, vale frisar que o excesso de sinalização β_2 -AR/GI pode reduzir o suporte contrátil mediado por Gs, contribuindo para o fenótipo da IC descompensada (Xiang e Kobilka, 2003).

Sabe-se que no estágio de compensação da IC, o sistema de sinalização β -AR sofre dessensibilização e degradação dos β -AR remanescentes, reduzindo o número de receptores na superfície da membrana celular (Koch, 2004). Esse processo de dessensibilização é um importante mecanismo dos sistemas GPCR, sendo caracterizado por uma diminuição na interação do receptor com a proteína G gerando uma rápida perda da responsividade do receptor, mesmo com a presença contínua do agonista (Hein e Kobilka, 1997), limitando a produção de AMPc e assim, atua como uma resposta adaptativa aos elevados níveis de catecolaminas na IC (Madamanchi, 2007).

Esse mecanismo de inativação dos receptores β -ARs ocorre por meio de uma proteína quinase ligada à proteína G (G protein-coupled receptor kinase, GRK), pertencentes à família da quinase dos GPCRs (Lefkowitz, 1998; Briston *et al.*, 2011). Esse processo de dessensibilização pode ser iniciado pela fosforilação de um β -ARs ativado por uma GRK. A fosforilação aumenta

a afinidade do receptor para uma segunda classe de proteína, as β -arrestinas. A ligação da β -arrestinas ao receptor fosforilado inibe a interação do β -ARs com a proteína G, gerando, portanto, um estado desacoplado do complexo da proteína G através da internalização dos receptores induzida por β -arrestina (Ribas *et al.*, 2007; Cannavo *et al.*, 2013) ou a dessensibilização do receptor através do bloqueio da superfície citoplasmática dos receptores (Krupnick *et al.*, 1997). Esse mecanismo previne uma maior ativações das proteínas Gs e a conseqüentemente estimulação de AC, acarretando em uma responsividade reduzida dos β -ARs às catecolaminas (Lefkowitz, 1998).

Evidências tem demonstrado que a dessensibilização acentuada de β -AR no coração na IC é acompanhada por um aumento nos níveis de proteína e mRNA de GRK2, um tipo de GRK expresso no coração (Ungerer *et al.*, 1994). De fato, a superexpressão de GRK2 no coração resultou na redução da contratilidade quando estimulada pelo isoproterenol bem como a diminuição da produção de AMPc (Koch *et al.*, 1995), prejudicando a função cardíaca (Chen *et al.*, 1998) e promove a apoptose (Brinks *et al.*, 2010) após lesão por isquemia e reperfusão.

Sabe-se que na IC o β_1 -AR sofre regulação negativa (*downregulation*) nos níveis de mRNA e proteína, tendo a sua densidade na membrana plasmática reduzida (Bristow *et al.*, 1986; Bristow *et al.*, 1993), já o β_2 -AR apresenta aumento na densidade, porém com sua atividade funcional reduzida (Wachter e Gilbert, 2012). Esse maior impacto sobre os β_1 -AR pode ser justificado devido a norepinefrina, a principal catecolamina endógena ser aproximadamente 10 a 30 vezes mais seletiva para o β_1 -AR e também, este receptor está localizado na fenda sináptica, sendo exposto a concentrações mais elevadas de norepinefrina. Assim, o β_1 -ARs estaria mais susceptível à dessensibilização e a redução na densidade relacionada a maior estimulação simpática observada na IC (Wachter e Gilbert, 2012). Vale ressaltar que os receptores β_3 -AR são particularmente resistentes à dessensibilização induzida pelas catecolaminas, pois não apresentam o sítio sensível à fosforilação que está envolvido no processo de dessensibilização dos receptores acoplados à proteína G (Nantel *et al.*, 1994). Devido à relativa preservação da expressão de β_2 -AR na IC, este tem sido o foco de interesse terapêutico tanto do desenvolvimento de agentes farmacológicos seletivos para β_2 -AR, tanto agonista e antagonista, e de uma abordagem de terapia genética de contratilidade cardíaca aumentada (Wachter e Gilbert, 2012).

O uso clínico de β -bloqueadores é uma estratégia farmacológica e parte do tratamento padrão de algumas fisiopatologias cardíacas, protegendo os cardiomiócitos dos efeitos deletérios oriundos da atividade adrenérgica excessiva, tendo como objetivo prevenir e/ou até mesmo reverter o fenótipo de remodelamento causado pela hiperatividade simpática

característica de várias fisiopatologias cardíacas, como por exemplo na IC (Barrese e Tagliabue, 2013). É importante ressaltar que em função dos efeitos cardioprotetores do subtipo β_1 -AR, o uso de bloqueadores β -AR é um dos pilares da atual terapia na IC. No entanto, os efeitos cardioprotetores do subtipo β_2 -AR, que atua neutralizando a sinalização hiperativa β_1 -AR, é inibida pela terapia com β -AR bloqueador não seletivo.

Por outro lado, é amplamente aceito que o exercício físico (EF) é uma intervenção não farmacológica de extrema importância, uma vez que estudos mostram que confere proteção contra infarto do miocárdio em modelos animais (Akita *et al.*, 2007; Chicco *et al.*, 2007), melhora a sobrevivência após isquemia miocárdica em humanos (Hull *et al.*, 1994), bem como para a promoção da saúde, melhoria da qualidade de vida, prevenção e controle de diversas patologias cardiovasculares (Cornelissen *et al.*, 2009; Prasad e Das, 2009). A capacidade do EF na cardioproteção é amplamente estudada contra diversos fatores de riscos e diferentes injúrias cardíacas como infarto do miocárdio (Zhang *et al.*, 2000; Freimann *et al.*, 2009), hipertensão arterial sistêmica (Cornelissen *et al.*, 2009; Garciaarena *et al.*, 2009), diferentes agentes cardioprotetores (Desai e Channick, 2008; Galie *et al.*, 2009) e insuficiência cardíaca (IC) (Owen *et al.*, 2009; McMurray *et al.*, 2012) em humanos e em modelos animais.

Além disso, o EF promove benefícios no sistema cardiovascular podendo diminuir a incidência de numerosas doenças cardiovasculares, bem como promover melhorias na função mecânica ventricular e na aptidão aeróbica ($VO_2\max$) e acarretar um inotropismo e lusitropismo positivo (Roof *et al.*, 2013). Os potenciais mecanismos para explicar os efeitos crônicos cardioprotetores do EF vêm sendo estudados com maior atenção na tentativa de compreender o complexo fenótipo cardioprotetor. A ação anti-inflamatória (Torre-Amione *et al.*, 1996), anti-fibrótica (Xu *et al.*, 2008) e anti-oxidante (Powers *et al.*, 1993) parecem ser as principais contribuições crônicas do EF, bem como a modulação neuro-humoral (Braith *et al.*, 1999) e a melhoria da contratilidade miocárdica (Zingman *et al.*, 2007). Assim, esta melhora da contratilidade pode estar relacionada a ação cardioprotetora promovida pelo β_2 -AR, por sua capacidade de inibir $G_{\alpha s} / AC / PKA$, atenuando os efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos da estimulação pelas catecolaminas dos β_1 -AR, e também ativando a via de sinalização G_i - $G\beta\gamma$ -PI3K-Akt, responsável por promovendo a sobrevivência dos cardiomiócitos.

Também tem sido demonstrado um importante papel cardioprotetor por meio da estimulação dos β_3 -AR. Foi observado durante o exercício físico voluntário em camundongos a ativação deste receptor via elevação sustentada e significativas nos níveis de catecolaminas circulantes (Calvert e Lefer, 2013). Esse efeito cardioprotetor através da estimulação β_3 -ARs vem sendo atribuído à ativação do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e ao aumento da

biodisponibilidade do óxido nítrico (NO)(Moens *et al.*, 2010; Calvert e Lefer, 2013). Recentemente, um estudo demonstrou o papel crítico na regulação da fosforilação da eNOS e na geração de NO em resposta a 4 semanas de exercício voluntário exercido mediada pela ativação β_3 -AR (Calvert *et al.*, 2011). Mais importante, foi demonstrado que a ausência do β_3 -AR levou a um aumento da lesão miocárdica após as 4 semanas de treinamento físico. Também há evidências dos efeitos cardioprotetores dos agonistas específicos para β_3 -AR, sendo esses efeitos associados a alterações na fosforilação da eNOS e ao aumento de NO em camundongos com IC (Niu *et al.*, 2012).

O treinamento físico também pode ter impacto sobre a melhora na função cardíaca que pode ser explicada, pelo menos em parte, pela mudança na expressão das proteínas envolvidas na homeostase do cálcio presente nos cardiomiócitos (Brum *et al.*, 2011). Estas proteínas, como o receptor de rianodina do tipo 2 (RyR2), a isoforma cardíaca da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA_{2a}) e fosfolambam fosforilada no resíduo de serina 16 (FLB_{ser16}), estão envolvidas no acoplamento excitação-contração dos cardiomiócitos, como citado anteriormente.

Embora o treinamento físico acarrete em melhorias na função cardíaca, reduzindo a inflamação sistêmica e a ativação desregulada das vias adrenérgicas e o papel cardioprotetor do β_2 -AR, não há estudos até o presente momento que forneça evidências de uma ligação direta entre os efeitos benéficos do treinamento físico sobre a função cardíaca de camundongos KO β_2 -AR.

Sabe-se que no exercício agudo máximo os camundongos KO β_2 -AR podem se exercitar normalmente, indicando que o estímulo cronotrópico e inotrópico por meio dos β -ARs não são fundamentais em exercício máximo (Rohrer *et al.*, 1999). Também se sabe que camundongos KO β_2 -AR se tornam hipertensos durante o exercício em comparação com camundongos do tipo selvagem (Chruscinski *et al.*, 1999).

Sendo assim, visto que o treinamento físico pode melhorar a função cardíaca em condições patológicas, compreender seu efeito sobre as propriedades mecânicas e funcionais de camundongos KO β_2 -AR pode ajudar a elucidar o papel do β_2 -AR nos mecanismos intrínsecos da função cardíaca.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento físico sobre as propriedades mecânicas e funcionais em cardiomiócitos de camundongos *knockout* para os receptores β_2 -adrenérgicos.

2.2 Objetivos Específicos:

Verificar se o exercício de intensidade moderada na esteira, alteraria:

- A massa corporal;
- A capacidade para o exercício;
- A função ventricular esquerda.
- A amplitude de contração, o tempo para 50% do pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo;
- A amplitude e a duração das fases sistólica e diastólica do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais de experimentação e tratamentos

Foram utilizados camundongos machos com 4 meses de idade, sendo da linhagem FVB/N: 22 selvagens e 24 KO β_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 Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), 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 55/2016.

3.2. Grupos experimentais

O número de animais foi calculado a partir da fórmula: $n = s^2 / (x - \mu)^2 \times (t_{\alpha; gl})^2$ (Callegari-Jacques, 2003), onde: n – número de animais; s^2 – variância em uma amostra de dados; x – uma variável qualquer; μ – 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 4 grupos, a saber:

- 1) Grupo Controle FVB (FVBc; n= 11): camundongos que não foram submetidos ao treinamento;
- 2) Grupo Exercitado FVB (FVBt; n= 11): camundongos que foram submetidos ao treinamento;
- 3) Grupo Controle KO β_2 (KO β_2 c; n= 12): camundongos que não foram submetidos ao treinamento;

4) Grupo Exercitado KO β_2 (KO β_2 t; n= 12): camundongos que foram submetidos ao treinamento.

3.3. Teste de esforço progressivo em esteira

A capacidade dos animais para o exercício 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 do protocolo de treinamento físico foi realizado novamente nos animais treinados (FVBt e KO β_2 t) o teste de esforço progressivo em esteira para ajustar a nova intensidade de treinamento. 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 FVBt e KO β_2 t 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)				6ªfeira
60% da VM				AJUSTE DE
60 min				INTENSIDADE
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

Fonte: Rodrigues, Aurora (2014)

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 coração 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_2 , durante 10 minutos, para destruir as fibras colágenas extracelulares. Todas as soluções foram oxigenadas (O_2 100% – 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 (VE) 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_2 . Esse procedimento foi repetido com a Solução Lavado 2 (Solução 4) contendo 5 μM de CaCl_2 . Por último as células foram armazenadas em Solução Estoque (Solução 5) contendo 10 μM de CaCl_2 , 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_2PO_4 (0,4) – 0,240 g; MgCl_2 (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 (0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$) - 25 μL ; pH = 7,4 com NaOH; armazenada em temperatura -5°C.

- ✓ **SOLUÇÃO EGTA (SOLUÇÃO 1):** Para se fazer a solução *EGTA*, foram adicionados 57,5 μL 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_2 (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_2 (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_2 (1 M) em 10 ml da solução *Tyrode* básica.
- ✓ **SOLUÇÃO ESTOQUE (SOLUÇÃO 5):** Para a solução estoque, foram adicionados 10 μL de CaCl_2 (1 M) em 10 ml da solução *Tyrode* básica.

3.7. 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 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 3).

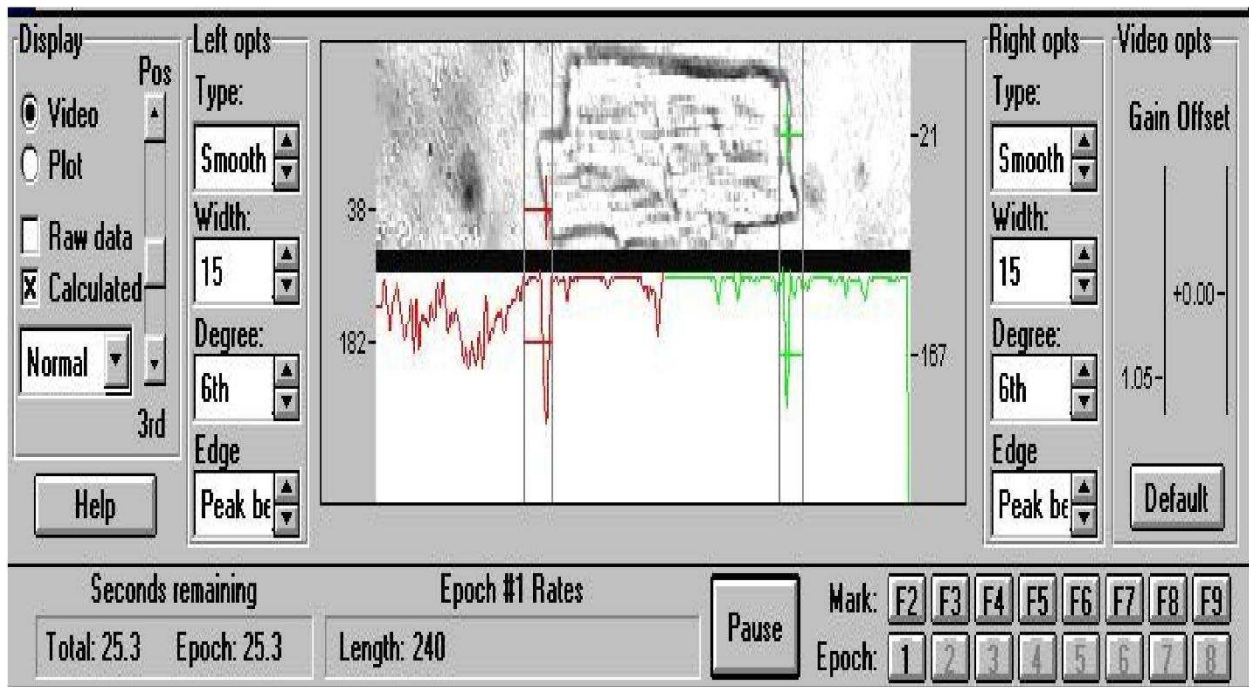


Figura 3. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através dos picos verde e vermelho, respectivamente. Fonte: Carneiro-Junior (2009).

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). Estas rotinas foram feitas usando IonWizard 6.3 (Ionoptix, EUA).

Os principais parâmetros avaliados são demonstrados na Figura 4. Durante cada dia de experimento, foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

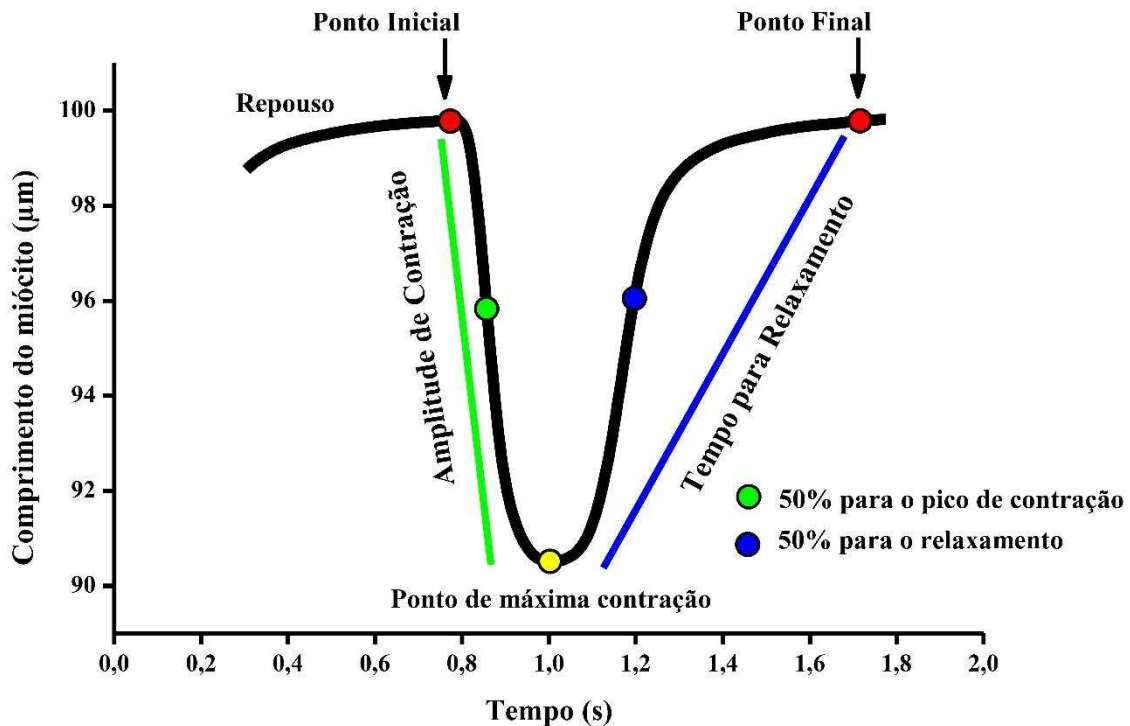


Figura 4. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados. Fonte: Carneiro-Junior (2009).

3.8 - Mensuração do cálcio intracelular transiente ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

As medidas do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram realizadas por meio de sistema de fluorescência (Ionoptix, EUA) através de um microscópio invertido (Nikon Eclipse, TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA). Os cardiomiócitos foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} , permeável à membrana plasmática, Fura-2 (Fura-2 AM, Thermo Fisher, Waltham, EUA).

O Fura-2 AM (0,5 μM) foi preparado em uma solução de estoque a base de dimetilsulfóxido – DMSO (50 μl de DMSO em 50 μg de Fura-2 AM). Adicionou-se 2,5 μl dessa solução de Fura-2 AM/DMSO em 5 mL de meio celular, em tubo falcon envolvido em

papel-alumínio. O tubo foi levemente agitado em superfície plana durante 10 min à temperatura ambiente. Após esse procedimento, a solução foi centrifugada (3.000 rpm) por 10 segundos, o sobrenadante removido e os cardiomiócitos resuspendidos em 5 mL de solução contendo cálcio (solução 4). Em seguida, o tubo falcon contendo os cardiomiócitos permanecia em repouso à temperatura ambiente durante 10 min. Todo procedimento foi realizado em ambiente escuro.

O transiente de $[Ca^{2+}]_i$ foi mensurado utilizando-se um sistema de excitação dupla que detecta a fluorescência excitada por luz UV com 340 e 380nm (Ionoptix- EUA). Os cardiomiócitos incubados com Fura-2 foram acomodados em uma câmara experimental, montada em um microscópio invertido e banhados pela solução de perfusão tampão (Solução Estoque) contendo 1 mM de $CaCl_2$ à temperatura controlada ($\sim 37^\circ C$). Em seguida, um cardiomiócito foi posicionado dentro de uma janela ajustável, com bordas aparentes, e foram estimulados eletricamente (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA) por um par de eletrodos de platina acoplado nos dois lados internos da câmara, com um pulso supra-limiar de 0,2 ms e 20 V (*voltage square pulse*), na frequência de 1 Hz para produzir condições estacionárias. Foram utilizados somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos.

Tais variações foram expressas em relação à razão: F/F_0 . Nas medidas do $[Ca^{2+}]_i$, F representa a média da fluorescência máxima após os estímulos, na fase sistólica do transiente, e F_0 representa a média da fluorescência mínima medida entre as contrações celulares, na fase diastólica do transiente.

Os parâmetros obtidos foram processados através de um software IonWizard (IonWizard, 6.3, IonOptix, Milton, EUA). As variáveis analisadas foram: amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ (F/F_0); tempo para o pico do $[Ca^{2+}]_i$ (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a fluorescência máxima, ms) e tempo para 50% do decaimento (tempo compreendido desde a fluorescência máxima até a metade do retorno à fluorescência basal, ms).

Durante cada dia de experimento do $[Ca^{2+}]_i$, foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

3.9 – Exame ecocardiográfico:

A avaliação ecocardiográfica foi realizada quarenta e oito horas após a última sessão de treino nos grupos FVB e KO β_2 . As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações da

sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn *et al.*, 1978). É importante salientar que a acurácia e a reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar as estruturas anatômicas cardíacas e as medidas dos diâmetros das cavidades em roedores tem sido confirmadas em uma série de estudos (Chaves *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2001).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado por um único observador, cego para o genótipo. Os animais foram anestesiados através do Isoflurano com fluxo contínuo de O₂ misturado ao anestésico. Este animal anestesiado foi posicionado lateralmente, a fim de expor o hemitórax esquerdo que foi cuidadosamente depilado. Sobre o precórdio do animal foi aplicado um gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, EUA). O Exame ecocardiográfico foi realizado utilizando o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON corporation, Mountain View, EUA), equipado com transdutor de 15 MHz. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o curso do modo M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com o curso do modo M posicionado ao nível da valva aórtica.

Após a realização das medidas foi calculada a fração de encurtamento (FE) do ventrículo esquerdo ($\%FE = [(DDFVE-DSFVE)/DDFVE] \times 100$), utilizado como índice de função sistólica, onde DDFVE é o diâmetro diastólico final do VE e DSFVE é o diâmetro sistólico final (DSFVE) do VE.

4.0. Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada usando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. A escolha dos testes estatísticos foi feita conforme normalidade de distribuição dos dados de cada variável medida. Ao final dos tratamentos, as comparações entre as médias dos grupos para as variáveis peso corporal, ecocardiograma e distância total percorrida foram realizadas através de ANOVA de duas vias com post-hoc de Tukey. A comparação entre os parâmetros de contratilidade e do $[Ca^{2+}]_i$ entre os grupos experimentais não apresentou distribuição normal. A comparação dessas variáveis foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn. Os dados são apresentados como média \pm EPM. $P < 0,05$ foi considerado para diferenças estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando o software SigmaPlot®, versão 12.5 (Systat Software, San Jose, CA). O Número de animais e de células analisadas está especificado nas tabelas e figuras.

5.0. RESULTADOS

Os resultados referentes ao efeito da deleção dos receptores β -adrenérgicos e do protocolo de treinamento aeróbico sobre o peso corporal, peso do coração, peso do ventrículo esquerdo e suas razões, capacidade para o exercício e parâmetros da função cardíaca estão representados na tabela 2.

5.1. Peso corporal

O peso corporal (PC) inicial e final não foram diferentes entre os grupos.

5.2. Peso do coração, ventrículo esquerdo e suas razões

Em relação ao peso do coração e suas razões, o grupo $KO\beta_2$ ($KO\beta_{2c}$ + $KO\beta_{2t}$) exibiu uma redução no peso do coração (PCor), peso do ventrículo esquerdo (PVE), razão peso do coração pelo peso corporal (PCor/PC), razão do ventrículo esquerdo pelo peso corporal (PVE/PC) em comparação com o grupo FVB ($p < 0,05$).

5.3. Capacidade para exercício

Os resultados relacionados à capacidade de exercício demonstram que os grupos treinados (FVBt e $KO\beta_{2t}$) apresentaram maior capacidade de exercício do que os grupos não treinados (FVBc e $KO\beta_{2c}$) ($p < 0,05$), no entanto, $KO\beta_{2t}$ mostrou um aumento na distância percorrida em relação ao grupo FVBt ($p < 0,05$).

5.4. Parâmetros da função cardíaca

Sobre a análise ecocardiográfica, nenhum grupo apresentou alterações na fração de encurtamento e na fração de ejeção do ventrículo esquerdo ($p > 0,05$).

Tabela 2. Peso corporal, peso do coração, do ventrículo esquerdo e suas razões, capacidade para o exercício e parâmetros ecocardiográficos

	FVBc	FVBt	KO β _{2c}	KO β _{2t}
PC inicial, g (n= 6-7)	29,57 \pm 0,71	29,33 \pm 0,71	28,83 \pm 0,70	29,83 \pm 0,65
PC final, g (n= 6-7)	31,42 \pm 0,78	31,00 \pm 1,15	30,66 \pm 0,33	28,66 \pm 0,88
PCor, mg (n= 6-7)	230,14 \pm 7,97	238,83 \pm 8,6	206,00 \pm 10,82*	209,16 \pm 6,68*
PVE, mg (n= 6-7)	141,43 \pm 4,36	151,66 \pm 4,28	122,33 \pm 7,22*	118,50 \pm 6,47*
PCor/PC, mg/g (n= 6-7)	7,33 \pm 0,24	7,71 \pm 0,13	6,72 \pm 0,38*	7,26 \pm 0,12*
PVE/PC, mg/g (n= 6-7)	4,50 \pm 0,13	4,90 \pm 0,13	3,99 \pm 0,26*	4,09 \pm 0,11*
FEnc, % (n= 4-7)	28,75 \pm 1,87	29,00 \pm 1,87	30,40 \pm 1,68	28,75 \pm 1,53
FEVE, % (n= 4-7)	62,87 \pm 2,69	62,62 \pm 2,69	64,20 \pm 2,40	62,33 \pm 2,19
Distancia total (m) (n= 7)	368,74 \pm 18,65	649,51 \pm 47,78 ^{&}	417,34 \pm 28,24	853,97 \pm 42,18 [#]

Dados são médias \pm EPM (ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey), PC, peso corporal, PCor, peso do coração, PVE, peso ventrículo esquerdo, FEnc, fração de encurtamento, FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo, FVBc, grupo FVB controle, FVBt, grupo FVB treinado, KO β _{2c}, grupo KO β ₂ controle, KO β _{2t}, grupo KO β ₂ treinado, n, número de animais, * p < 0,05 vs. grupo FVB, & p < 0,001 vs. FVBc, # p < 0,001 vs. FVBt, \$ p < 0,001 vs. KO β _{2c}.

5.5. Contração celular

O efeito da deleção dos receptores β_2 -adrenérgicos, do protocolo de treinamento aeróbico sobre a amplitude de contração, o tempo para o 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 5.

O grupo $KO\beta_2t$ apresentou diminuição na amplitude de contração ($p < 0,05$) em relação ao grupo FVBt (Fig. 5A). O protocolo de treinamento aumentou a amplitude de contração nos cardiomiócitos dos animais FVBt comparados aos FVBc ($p < 0,05$). Em relação ao tempo de contração, o grupo $KO\beta_2t$ exibiram redução no tempo até o pico (Fig. 5B) e no tempo para 50% de relaxamento comparado ao grupo FVBt (Fig. 5C)

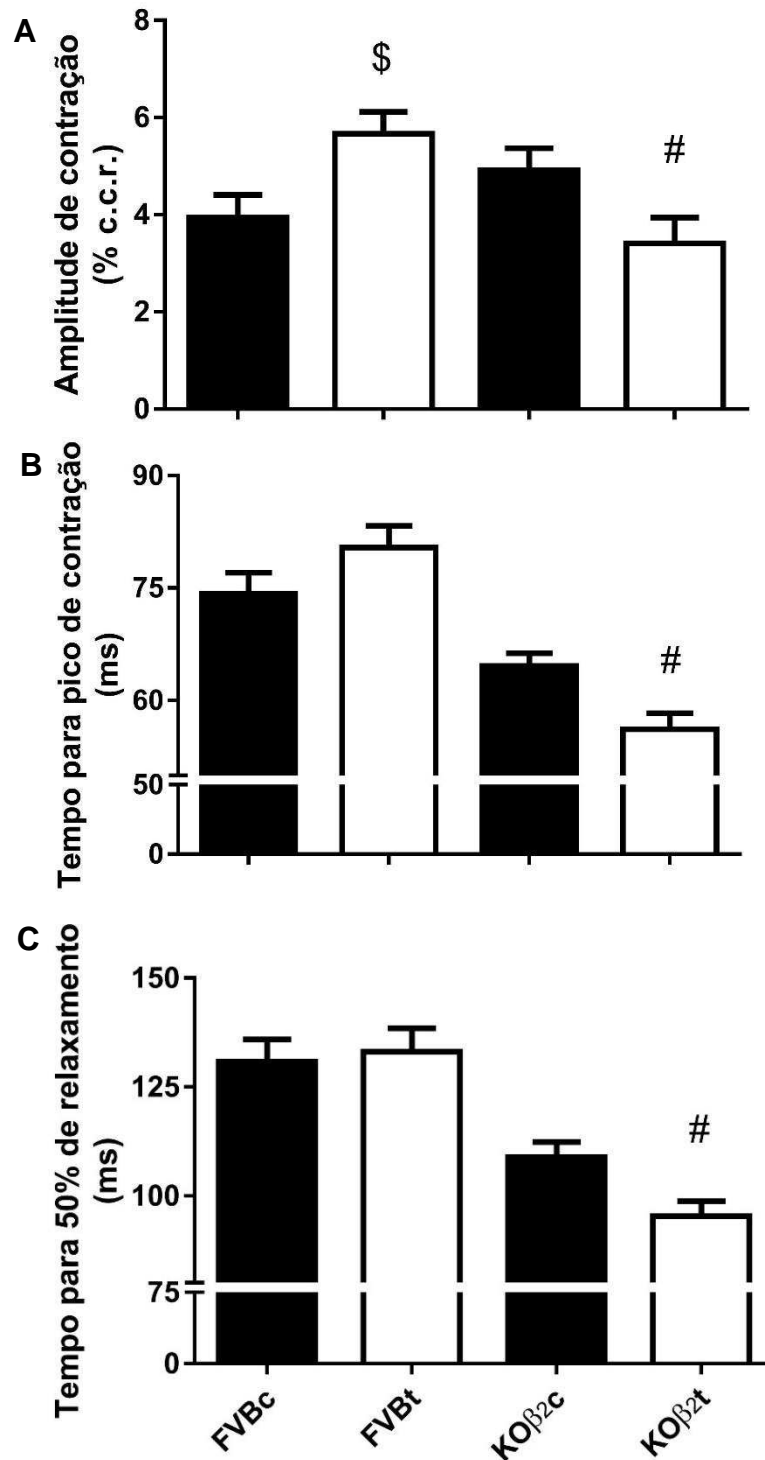


Figura 5. Contratilidade de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo a 1 Hz. (A) Amplitude de contração; (B) Tempo para o pico de contração; (C) Tempo para 50% de relaxamento. FVBc, grupo FVB controle (n= 8; N= 6-9 células de cada animal); FVBt, grupo FVB treinado (n= 8; N= 6-9 células de cada animal); KO β_2 c, grupo KO β_2 controle (n= 7; N= 6-8 células de cada animal); KO β_2 t, grupo KO β_2 treinado (n=7; N= 6-8 células de cada animal). Valores são médias \pm EPM (Kruskal-Wallis, seguida do teste de Dunn). [#]p < 0,05 vs. FVBt; ^{\$}p < 0,05 vs. FVBc.

5.6. Cálcio intracelular transiente ($[Ca^{2+}]_i$)

O efeito da deleção dos receptores β_2 -adrenérgicos, do protocolo de treinamento aeróbico sobre a amplitude do $[Ca^{2+}]_i$, tempo para o pico do $[Ca^{2+}]_i$ e o tempo para 50% de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de camundongos da linhagem FVB/N estão apresentados na Figura 6.

Os cardiomiócitos do grupo $KO\beta_2c$ exibiram maior amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ comparado ao grupo FVBc (Fig. 6A). Os cardiomiócitos dos animais $KO\beta_2t$ apresentam menor amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ comparados aos animais $KO\beta_2c$ e FVBt. O tempo para o pico do $[Ca^{2+}]_i$ foi menor nos miócitos $KO\beta_2c$ em comparação com o grupo FVBc (Fig. 6B). O tempo para 50% de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ foi menor no grupo $KO\beta_2c$ do que no grupo FVBc e nos animais $KO\beta_2t$ comparado com os animais FVBt (Fig. 6C).

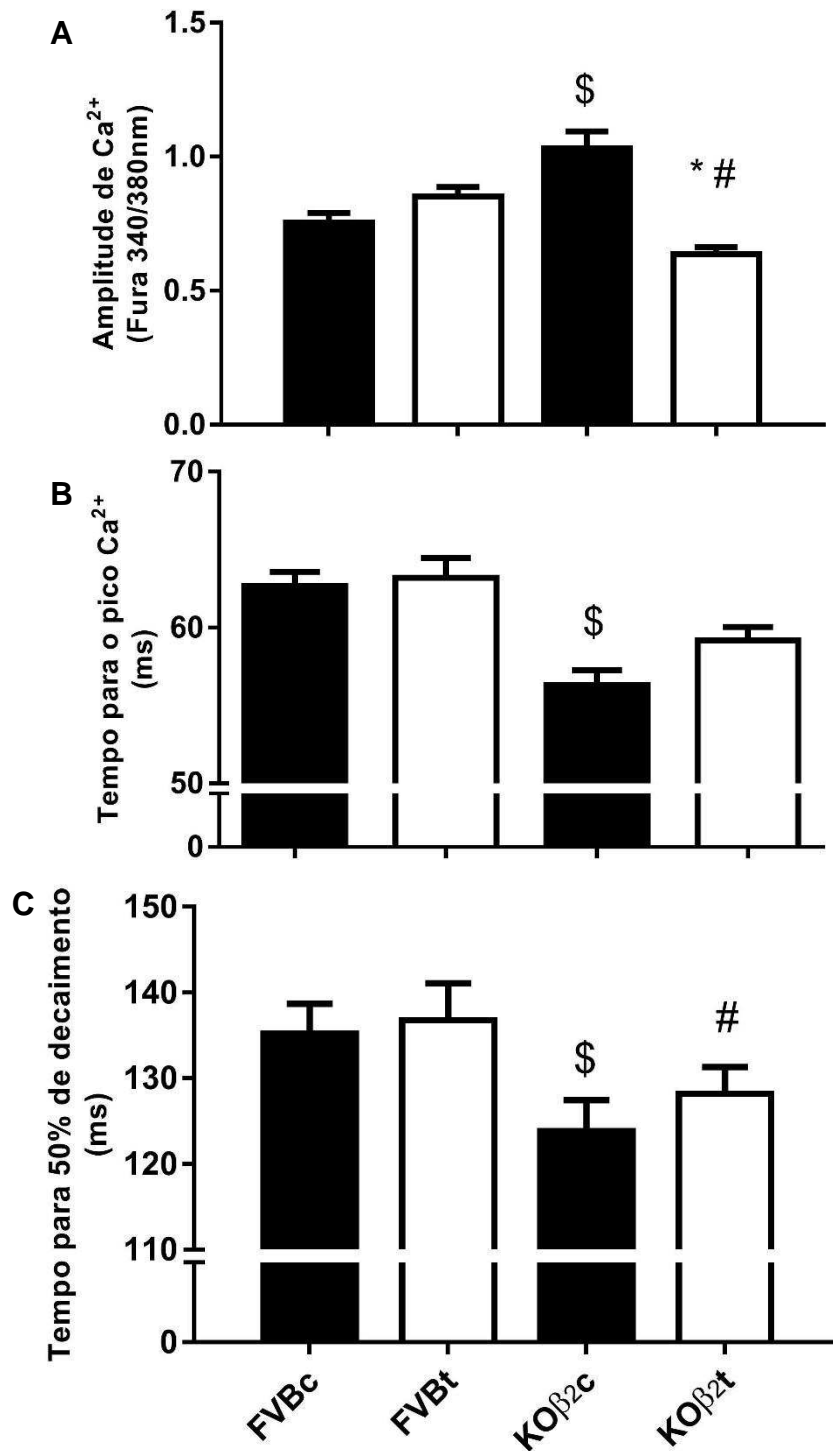


Figura 6. Cálcio intracelular transiente $[Ca^{2+}]_i$ de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo a 1Hz. (A) Amplitude do $[Ca^{2+}]_i$; (B) Tempo para o pico do $[Ca^{2+}]_i$; (C) tempo para 50% de decaimento do $[Ca^{2+}]_i$. FVBC, grupo FVB controle (n= 8; N= 6-9 células de cada animal); FVBt, grupo FVB treinado (n= 8; N= 6-9 células de cada animal); KOβ₂c, grupo KOβ₂ controle (n= 7; N= 6-8 células de cada animal); KOβ₂t, grupo KOβ₂ treinado (n=7; N= 6-8 células de cada animal). Valores são médias ± EPM (Kruskall-Wallis, seguida do teste de Dunn). *p < 0,05 vs. KOβ₂c; #p < 0,05 vs. FVBt; \$p < 0,05 vs. FVBC.

6.0 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do treinamento físico sobre as propriedades morfológicas e mecânicas em cardiomiócitos de camundongos knockout para o receptor β_2 -adrenérgico. Foi observado que os camundongos KO β_2 apresentaram menor peso do coração, peso do ventrículo esquerdo bem como as suas razões. Os camundongos KO β_2 não apresentaram redução na função cardíaca. O principal achado é que o protocolo de treinamento reduziu a amplitude de contração e a amplitude do $[Ca^{2+}]_i$ em camundongos KO β_2 .

6.1. Peso corporal

Todos os grupos KO β_2 e FVB apresentaram ganhos de peso corporal esperado ao longo do período experimental, devido ao crescimento. Sabe-se que o tecido adiposo, assim como o cardíaco, apresenta alta densidade de receptores β -adrenérgicos, que quando ativados pelas catecolaminas leva à produção de AMPc, que por sua vez ativa a PKA, resultando em um aumento da atividade lipolítica no tecido adiposo (Bowers *et al.*, 2005). Embora β_3 ARs seja o subtipo mais expresso no tecido adiposo (Mcneel e Mersmann, 1999; Lynch e Ryall, 2008), foi observado que camundongos com uma superexpressão de β_1 -ARs demonstraram um aumento na atividade lipolítica (Soloveva *et al.*, 1997). (Soloveva *et al.*, 1997) A lipólise é maior em função da ativação dos β_1 - e β_3 -ARs, com pequena participação dos β_2 -ARs (Atgie *et al.*, 1997), o que justifica a semelhança entre os grupos KO β_2 e FVB, independentemente do treinamento físico.

6.2. Peso do coração, ventrículo esquerdo e suas razões

Nossos resultados mostraram que os animais KO β_2 apresentaram redução nos parâmetros de PCor, PVE, PCor/PC e PVE/PC quando comparado aos selvagens. Estudos têm demonstrado a participação da sinalização β_2 AR no controle do crescimento e desenvolvimento estrutural do miocárdio (Bernstein, 2002). Sabe-se que o acoplamento dos β_2 -ARs à subunidade $G\alpha_i$, ativa a via de sinalização de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Akt (Mcmullen *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2005). O envolvimento dessa via de sinalização no controle da hipertrofia cardíaca está bem estabelecido (Mcmullen *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2005; Debosch *et al.*, 2006). Assim,

a falta dos receptores β_2 -adrenérgicos poderia estar prejudicando este processo, o que justificaria os nossos achados.

6.3. Capacidade para o exercício

Os camundongos selvagem treinados (FVBt) apresentaram maior distância total de corrida que o respectivo controle (FVBc), sendo que este aumento pode estar associado a adaptações cardiovasculares, que são efeitos já conhecidos do treinamento aeróbico (Moore e Korzick, 1995; Kemi *et al.*, 2008). Outros estudos que utilizaram o mesmo protocolo de treinamento aeróbico também observaram maior capacidade de exercício nos animais treinados (Chruscinski *et al.*, 1999; Vanzelli *et al.*, 2013). Além disso, é interessante ressaltar que o grupo KO β_2 t possui um desempenho físico em esteira maior que o grupo FVBt, corroborando os dados de (Chruscinski *et al.*, 1999). Foi demonstrado nesse estudo que camundongos KO β_2 , apesar de não apresentarem aumento significativo do consumo de oxigênio de pico, tinham um quociente respiratório (QR) menor que os controles. O QR indicador de utilização de substrato e do estado metabólico, ou seja, quanto maior os valores de QR, maior mobilização de glicogênio e quanto menor é o valor de QR, maior é a mobilização de gordura (Mcardle, 2001). Portanto, nos animais com inativação gênica dos receptores β_2 -adrenérgicos o consumo de oxigênio é destinado, em quase sua totalidade, à metabolização de lipídios durante o protocolo de exercício e assim, conservando o glicogênio muscular por mais tempo e colaborado com o aumento da duração do exercício observado nesses animais. Além disso, sabe-se que a estimulação dos receptores β -adrenérgicos durante o exercício aeróbio promove a glicogenólise (Chruscinski *et al.*, 1999; Rohrer *et al.*, 1999). Provavelmente, a deleção do receptor β_2 AR pode gerar alterações tais como a diminuição da glicogenólise e aumento da lipólise (Chruscinski *et al.*, 1999) preservando por mais tempo o glicogênio muscular. Pode ocorrer também mudança fenotípica no musculo esquelético, aumentando a porcentagem de fibras oxidativas (tipo I) bem como a sua capilarização em relação às fibras glicolíticas (Tipo IIA e IIB). Conjuntamente é observado um aumento na atividade da citrato sintase (Voltarelli *et al.*, 2014), um indicador de uma melhora do metabolismo oxidativo (Wegener *et al.*, 1996). Em conjunto, esses dados podem ajudar a justificar o nosso achado.

6.4. Medida ecocardiográfica

Quanto à função cardíaca foi observado que o grupo KO β_2 não apresentou alteração quando comparado aos FVB, segundo a avaliação ecocardiográfica. Sabe-se que no coração os receptores adrenérgicos β_1 -ARs são expressos em níveis maiores que os receptores adrenérgicos β_2 -ARs e tem papel principal na regulação da função cardíaca. Estudos confirmaram que a ativação dos β_1 -ARs leva ao aumento da frequência cardíaca, da força de contração e da taxa de relaxamento cardíaco (Brodde, 1991; Bernstein, 2002; Brum *et al.*, 2006). Entretanto, tem sido demonstrado que a ativação de β_2 -ARs, expressos em menor proporção no coração, colabora para a modulação da frequência cardíaca e da força de contração em diversas espécies (Brodde, 1991). De fato, quando os cardiomiócitos isolados de camundongos knockout β_1 -ARs quando estimulados com isoproterenol, não são observadas repostas inotrópicas e cronotrópicas em relação aos animais selvagens (Rohrer *et al.*, 1996). Por outro lado, na deleção gênica dos receptores β_2 -ARs, foram observadas respostas normais e equivalentes aos animais selvagens mediante o mesmo estímulo (Rohrer *et al.*, 1999; Bernstein, 2002). Esses dados podem justificar a ausência de alteração da função cardíaca observada nos animais KO β_2 , já que os receptores adrenérgicos β_1 -ARs tem uma maior participação na modulação da função cardíaca.

6.5. Contração celular e Cálcio intracelular transiente

Foi observado que os camundongos KO β_2 treinados tiveram menor amplitude de contração e menor amplitude do $[Ca^{2+}]_i$, e que o treinamento aumentou a amplitude de contração nos animais selvagens.

Os cardiomiócitos do VE de camundongos KO β_2 t apresentaram menor tempo para pico de contração, tempo para 50% de relaxamento e tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ comparado aos camundongos FVBt. Além de possuir β_1 -AR, conhecido como o principal responsável pelo aumento da contração dos cardiomiócitos (Xiang e Kobilka, 2003), estudos anteriores mostraram que o treinamento físico aumentou a resposta dos β -Ars (Libonati e Macdonnell, 2011) e a expressão da proteína Gs (Hammond *et al.*, 1988), o que ajudaria a justificar a melhora nos tempos dos animais KO β_2 t.

A deleção gênica alterou as propriedades mecânicas nos cardiomiócitos do VE de camundongos KO β_2 c, acarretando em maior amplitude do $[Ca^{2+}]_i$, menor tempo para o pico Ca^{2+} e menor tempo de 50% de decaimento comparado aos camundongos FVBc. Era esperado que presença de β_1 -AR nos cardiomiócitos desses camundongos associada à deleção de β_2 -AR poderia afetar as propriedades mecânicas. Sabe-se que o β_1 -AR no tecido cardíaco de roedores é o principal responsável pelo aumento do inotropismo cardíaco (Xiang e Kobilka, 2003).

Também sabe-se que o β_2 -AR possui acoplamento bifásico sob estímulo agonista, inicialmente prevalente no acoplamento à proteína Gs e subsequentemente acoplando à proteína Gi (Devic *et al.*, 2001), inibindo a ativação da AC e assim reduzindo a produção de AMPc e a subsequente fosforilação das proteínas envolvidas no complexo de excitação-contração dos cardiomiócitos (Xiang e Kobilka, 2003). Assim, Quando não há ativação do β_2 -AR, essa importante via de sinalização da proteína Gi e o seu efeito inibitório sobre a AC é eliminado, aumentando a produção de AMPc e a fosforilação das proteínas envolvidas na excitação-contração do cardiomiócito (Bers, 2002). O aumento dos níveis de Ca^{2+} na sístole nos animais β_2 ARc pode ser devido a uma maior liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático pela via β - adrenérgica, corroborando com outros achados (Freeman *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2003).

O principal achado do presente estudo é que a associação do protocolo de treinamento com a deleção gênica diminuiu a amplitude de contração e a amplitude de Ca^{2+} dos miócitos isolados do VE dos animais $KO\beta_2AR$. Sabe-se que a homeostase de Ca^{2+} prejudicada é implicado como um mecanismo fundamental para disfunção miocárdica (Freeman *et al.*, 2001). O β_2 -AR é conhecida como o receptor cardioprotetor e sua deleção associada à estimulação de β_1 -AR através das catecolaminas, como por exemplo durante o exercício aeróbico pode causar disfunção cardíaca bem como o aumento na apoptose de cardiomiócitos em camundongos $KO\beta_2AR$ (Zhu *et al.*, 2003; Patterson *et al.*, 2004). Estudos também tem demonstrado que o treinamento físico aumenta a responsividade dos β -Ars (Libonati e Macdonnell, 2011) e a expressão da proteína Gs (Hammond *et al.*, 1988), talvez a associação entre o protocolo de treinamento aeróbico utilizado neste estudo e a ausência de β_2 -AR pode ser prejudicial para este modelo animal. Assim, é necessário saber se outros protocolos de treinamento com intensidade e duração diferentes podem ser melhores para este modelo animal, ou se a presença de β_2 -AR é imprescindível para a realização de treinamento físico.

Por outro lado, o treinamento aeróbico aumentou a amplitude de contração nos animais selvagens FVBt quando comparados ao FVBc. Este aumento da contratilidade miocárdica induzido pelo treinamento é conhecido (Moore e Korzick, 1995). Uma possível justificativa para o mecanismo subjacente ao aumento da força contrátil no miocárdio é que o treinamento físico pode resultar em um aumento na sensibilidade dos miofilamentos à ativação pelo Ca^{2+} . A melhora da sensibilidade do miofilamento ao Ca^{2+} é uma importante adaptação do coração de ratos e camundongos ao treinamento físico regular (Devic *et al.*, 2001; Wisloff *et al.*, 2001; Kemi *et al.*, 2007). Este aumento resultaria em um maior nível de geração de tensão isométrica na mesma concentração de $[Ca^{2+}]$ intracelular, um efeito que é inteiramente consistente com os efeitos relatados do treinamento na tensão isométrica no tecido miocárdico (Diffie *et al.*, 2001).

7. Conclusão

- ✓ Não houve alteração no peso corporal e nos parâmetros ecocardiográficos para todos os grupos de tratamento;
- ✓ A deleção do receptor β_2 -ARs, independente do treinamento físico reduziu o peso do coração, o peso do ventrículo esquerdo e as razões, aumentou a amplitude do $[Ca^{2+}]_i$, reduziu o tempo para pico de Ca^{2+} e reduziu o tempo para 50% de decaimento;
- ✓ A ausência do receptor β_2 -ARs associado ao treinamento físico aumentou o desempenho para o exercício, diminuiu o tempo para pico de contração e o tempo para 50% relaxamento, porém, teve impacto negativo na amplitude de contração e na amplitude $[Ca^{2+}]_i$;
- ✓ O protocolo de treinamento aumentou a amplitude de contração nos animais do grupo FVB.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AKITA, Y. et al. Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 5, p. H2051-9, May 2007. ISSN 0363-6135

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, Oct 1997. ISSN 0002-9513

BAKER, A. J. Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. **Pflugers Arch**, v. 466, n. 6, p. 1139-50, Jun 2014. ISSN 1432-2013

BARGMANN, C. I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2028-33, Dec 11 1998. ISSN 0036-8075

BARRESE, V.; TAGLIALATELA, M. New advances in beta-blocker therapy in heart failure. **Front Physiol**, v. 4, p. 323, 2013. ISSN 1664-042X

BERNSTEIN, D. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking beta1- and beta2-adrenergic receptors. **Trends Cardiovasc Med**, v. 12, n. 7, p. 287-94, Oct 2002. ISSN 1050-1738

BERNSTEIN, D. et al. Differential cardioprotective/cardiotoxic effects mediated by beta-adrenergic receptor subtypes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 6, p. H2441-9, Dec 2005. ISSN 0363-6135

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198-205, Jan 10 2002. ISSN 0028-0836

BOWERS, R. R. et al. Short photoperiod exposure increases adipocyte sensitivity to noradrenergic stimulation in Siberian hamsters. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 5, p. R1354-60, May 2005. ISSN 0363-6119

BRAITH, R. W. et al. Neuroendocrine activation in heart failure is modified by endurance exercise training. **J Am Coll Cardiol**, v. 34, n. 4, p. 1170-5, Oct 1999. ISSN 0735-1097

BRINKS, H. et al. Level of G protein-coupled receptor kinase-2 determines myocardial ischemia/reperfusion injury via pro- and anti-apoptotic mechanisms. **Circ Res**, v. 107, n. 9, p. 1140-9, Oct 29 2010. ISSN 1524-4571

BRISTON, S. J. et al. Impaired beta-adrenergic responsiveness accentuates dysfunctional excitation-contraction coupling in an ovine model of tachypacing-induced heart failure. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 6, p. 1367-82, Mar 15 2011. ISSN 1469-7793

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. **Circ Res**, v. 59, n. 3, p. 297-309, Sep 1986. ISSN 0009-7330

BRISTOW, M. R. et al. Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. **J Clin Invest**, v. 92, n. 6, p. 2737-45, Dec 1993. ISSN 0021-9738

BRITTSAN, A. G.; KRANIAS, E. G. Phospholamban and cardiac contractile function. **J Mol Cell Cardiol**, v. 32, n. 12, p. 2131-9, Dec 2000. ISSN 0022-2828

BRODDE, O. E. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 203-42, Jun 1991. ISSN 0031-6997

BRODDE, O. E.; MICHEL, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 4, p. 651-90, Dec 1999. ISSN 0031-6997

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, Sep 2011. ISSN 1414-431X

BRUM, P. C. et al. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. **An Acad Bras Cienc**, v. 78, n. 3, p. 485-503, Sep 2006. ISSN 0001-3765

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Princípios e Aplicações. **Porto Alegre: Artmed**, 2003.

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. **Circ Res**, v. 108, n. 12, p. 1448-58, Jun 10 2011. ISSN 1524-4571

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, Jul 2013. ISSN 1548-9221

CANNAVO, A.; KOCH, W. J. Targeting beta3-Adrenergic Receptors in the Heart: Selective Agonism and beta-Blockade. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 69, n. 2, p. 71-78, Feb 2017. ISSN 1533-4023

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, Oct 8 2013. ISSN 1524-4539

CHAVES, A. A.; WEINSTEIN, D. M.; BAUER, J. A. Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen. **Life Sci**, v. 69, n. 2, p. 213-22, Jun 1 2001. ISSN 0024-3205

CHEN, E. P. et al. Myocardial recovery after ischemia and reperfusion injury is significantly impaired in hearts with transgenic overexpression of beta-adrenergic receptor kinase. **Circulation**, v. 98, n. 19 Suppl, p. II249-53; discussion II253-4, Nov 10 1998. ISSN 0009-7322

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, Apr 1 2012. ISSN 1522-1539

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, Dec 8 2000. ISSN 1524-4571

CHICCO, A. J. et al. Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 5, p. H2432-7, May 2007. ISSN 0363-6135

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. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 5, p. 955-62, Nov 2001. ISSN 0026-895X

CHRUSCINSKI, A. J. et al. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. **J Biol Chem**, v. 274, n. 24, p. 16694-700, Jun 11 1999. ISSN 0021-9258

CLAPHAM, D. E.; NEER, E. J. G protein beta gamma subunits. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 167-203, 1997. ISSN 0362-1642

COLLINS, S.; SURWIT, R. S. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. **Recent Prog Horm Res**, v. 56, p. 309-28, 2001. ISSN 0079-9963

COMMUNAL, C. et al. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. **Circulation**, v. 98, n. 13, p. 1329-34, Sep 29 1998. ISSN 0009-7322

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, Nov 30 1999. ISSN 1524-4539

CORNELISSEN, V. A. et al. Influence of exercise at lower and higher intensity on blood pressure and cardiovascular risk factors at older age. **J Hypertens**, v. 27, n. 4, p. 753-62, Apr 2009. ISSN 1473-5598

CORY, C. R.; GRANGE, R. W.; HOUSTON, M. E. Role of sarcoplasmic reticulum in loss of load-sensitive relaxation in pressure overload cardiac hypertrophy. **Am J Physiol**, v. 266, n. 1 Pt 2, p. H68-78, Jan 1994. ISSN 0002-9513

DEBOSCH, B. et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. **Circulation**, v. 113, n. 17, p. 2097-104, May 2 2006. ISSN 1524-4539

DESAI, S. A.; CHANNICK, R. N. Exercise in patients with pulmonary arterial hypertension. **J Cardiopulm Rehabil Prev**, v. 28, n. 1, p. 12-6, Jan-Feb 2008. ISSN 1932-7501

DEVIC, E. et al. Beta-adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from beta(1) and beta(2) adrenoceptor knockout mice. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 577-83, Sep 2001. ISSN 0026-895X

DIFFEE, G. M.; SEVERSEN, E. A.; TITUS, M. M. Exercise training increases the Ca(2+) sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. **J Appl Physiol (1985)**, v. 91, n. 1, p. 309-15, Jul 2001. ISSN 8750-7587

ENGELHARDT, S. et al. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 12, p. 7059-64, Jun 8 1999. ISSN 0027-8424

FAJARDO, G. et al. Deletion of the beta2-adrenergic receptor prevents the development of cardiomyopathy in mice. **J Mol Cell Cardiol**, v. 63, p. 155-64, Oct 2013. ISSN 1095-8584

FERRARA, N. et al. beta-adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. **Front Physiol**, v. 4, p. 396, Jan 9 2014. ISSN 1664-042X

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, Aug 2007. ISSN 0305-1870

FITZGERALD, P. A. Adrenal medulla & paraganglia. in: **Gardner, D. G.; Shoback, D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology**, p. 429-432, 2007.

FORD, C. E. et al. Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. **Science**, v. 280, n. 5367, p. 1271-4, May 22 1998. ISSN 0036-8075

FREEMAN, K. et al. Alterations in cardiac adrenergic signaling and calcium cycling differentially affect the progression of cardiomyopathy. **J Clin Invest**, v. 107, n. 8, p. 967-74, Apr 2001. ISSN 0021-9738

FREIMANN, S. et al. Exercise training alters the molecular response to myocardial infarction. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 4, p. 757-65, Apr 2009. ISSN 1530-0315

GALIE, N. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). **Eur Heart J**, v. 30, n. 20, p. 2493-537, Oct 2009. ISSN 1522-9645

GARCIARENA, C. D. et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v. 53, n. 4, p. 708-14, Apr 2009. ISSN 1524-4563

HAMM, H. E. The many faces of G protein signaling. **J Biol Chem**, v. 273, n. 2, p. 669-72, Jan 9 1998. ISSN 0021-9258

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, Dec 1988. ISSN 0021-9738

HEIN, L.; KOBILKA, B. K. Adrenergic Receptors From Molecular Structure to in vivo function. **Trends Cardiovasc Med**, v. 7, n. 5, p. 137-45, Jul 1997. ISSN 1050-1738

HULL, S. S., JR. et al. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. **Circulation**, v. 89, n. 2, p. 548-52, Feb 1994. ISSN 0009-7322

JANSSEN, T. W.; DALLMEIJER, A. J.; VAN DER WOUDE, L. H. Physical capacity and race performance of handcycle users. **J Rehabil Res Dev**, v. 38, n. 1, p. 33-40, Jan-Feb 2001. ISSN 0748-7711

KATZ, A. M. Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptive proliferative responses. **J Cell Mol Med**, v. 7, n. 1, p. 1-10, Jan-Mar 2003. ISSN 1582-1838

KEMI, O. J. et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. **J Mol Cell Cardiol**, v. 43, n. 3, p. 354-61, Sep 2007. ISSN 0022-2828

KEMI, O. J. et al. Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. **Front Biosci**, v. 13, p. 356-68, Jan 1 2008. ISSN 1093-9946

KOBILKA, B. K. G protein coupled receptor structure and activation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, n. 4, p. 794-807, Apr 2007. ISSN 0006-3002

KOCH, W. J. Genetic and phenotypic targeting of beta-adrenergic signaling in heart failure. **Mol Cell Biochem**, v. 263, n. 1-2, p. 5-9, Aug 2004. ISSN 0300-8177

KOCH, W. J. et al. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. **Science**, v. 268, n. 5215, p. 1350-3, Jun 2 1995. ISSN 0036-8075

KODAMA, H. et al. Significance of ERK cascade compared with JAK/STAT and PI3-K pathway in gp130-mediated cardiac hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 279, n. 4, p. H1635-44, Oct 2000. ISSN 0363-6135

KRUPNICK, J. G.; GUREVICH, V. V.; BENOVIC, J. L. Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. **J Biol Chem**, v. 272, n. 29, p. 18125-31, Jul 18 1997. ISSN 0021-9258

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, Jul 24 1998. ISSN 0021-9258

LIBONATI, J. R.; MACDONNELL, S. M. Cardiac beta-adrenergic responsiveness with exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 111, n. 11, p. 2735-41, Nov 2011. ISSN 1439-6327

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, Apr 11 2000. ISSN 1524-4539

LUO, J. et al. Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 21, p. 9491-502, Nov 2005. ISSN 0270-7306

LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. **Physiol Rev**, v. 88, n. 2, p. 729-67, Apr 2008. ISSN 0031-9333

MADAMANCHI, A. Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. **Mcgill J Med**, v. 10, n. 2, p. 99-104, Jul 2007. ISSN 1201-026X

MCARDLE, W. D., KATCH, F. I. E KATCH, V. L. Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho. **Rio de Janeiro - RJ, Editora Guanabara Koogan.** , 2001.

MCMULLEN, J. R. et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 21, p. 12355-60, Oct 14 2003. ISSN 0027-8424

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 Heart J**, v. 33, n. 14, p. 1787-847, Jul 2012. ISSN 1522-9645

MCNEEL, R. L.; MERSMANN, H. J. Distribution and quantification of beta1-, beta2-, and beta3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissues. **J Anim Sci**, v. 77, n. 3, p. 611-21, Mar 1999. ISSN 0021-8812

MOENS, A. L. et al. Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 6, p. 1088-95, Jun 2010. ISSN 1095-8584

MOORE, R. L.; KORZICK, D. H. Cellular adaptations of the myocardium to chronic exercise. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 37, n. 6, p. 371-96, May-Jun 1995. ISSN 0033-0620

MOURA, A. L. et al. Functional beta2-adrenoceptors in rat left atria: effect of foot-shock stress. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 95, n. 9, p. 999-1008, Sep 2017. ISSN 1205-7541

NANTEL, F. et al. Cell-specific down-regulation of the beta 3-adrenergic receptor. **J Biol Chem**, v. 269, n. 18, p. 13148-55, May 6 1994. ISSN 0021-9258

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, Mar 2001. ISSN 0022-0949

NIU, X. et al. Cardioprotective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism: role of neuronal nitric oxide synthase. **J Am Coll Cardiol**, v. 59, n. 22, p. 1979-87, May 29 2012. ISSN 1558-3597

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, Aug 1 2009. ISSN 1469-7793

OWEN, K. L.; PRETORIUS, L.; MCMULLEN, J. R. The protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) in the failing heart. **Clin Sci (Lond)**, v. 116, n. 5, p. 365-75, Mar 2009. ISSN 1470-8736

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, Apr 2004. ISSN 0090-3493

PAVOINE, C.; DEFER, N. The cardiac beta2-adrenergic signalling a new role for the cPLA2. **Cell Signal**, v. 17, n. 2, p. 141-52, Feb 2005. ISSN 0898-6568

PITCHER, J. A. et al. The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. **J Biol Chem**, v. 273, n. 20, p. 12316-24, May 15 1998. ISSN 0021-9258

POST, S. R.; HAMMOND, H. K.; INSEL, P. A. Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, p. 343-60, 1999. ISSN 0362-1642

POWERS, S. K. et al. Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. **Am J Physiol**, v. 265, n. 6 Pt 2, p. H2094-8, Dec 1993. ISSN 0002-9513

PRASAD, D. S.; DAS, B. C. Physical inactivity: a cardiovascular risk factor. **Indian J Med Sci**, v. 63, n. 1, p. 33-42, Jan 2009. ISSN 0019-5359

RIBAS, C. et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, n. 4, p. 913-22, Apr 2007. ISSN 0006-3002

ROCKMAN, H. A.; KOCH, W. J.; LEFKOWITZ, R. J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 206-12, Jan 10 2002. ISSN 0028-0836

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, Jun 11 1999. ISSN 0021-9258

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, Jul 9 1996. ISSN 0027-8424

ROOF, S. R. et al. Neuronal nitric oxide synthase is indispensable for the cardiac adaptive effects of exercise. **Basic Res Cardiol**, v. 108, n. 2, p. 332, Mar 2013. ISSN 1435-1803

SAHN, D. J. et al. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, n. 6, p. 1072-83, Dec 1978. ISSN 0009-7322

SANTOS, I. N. et al. Evidence for two atypical conformations of beta-adrenoceptors and their interaction with Gi proteins. **Eur J Pharmacol**, v. 513, n. 1-2, p. 109-18, Apr 18 2005. ISSN 0014-2999

SCHWARZ, B. et al. Altered calcium transient and development of hypertrophy in beta2-adrenoceptor overexpressing mice with and without pressure overload. **Eur J Heart Fail**, v. 5, n. 2, p. 131-6, Mar 2003. ISSN 1388-9842

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, Jan 1997. ISSN 0888-8809

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, Aug 2010. ISSN 1522-1539

TORRE-AMIONE, G. et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). **J Am Coll Cardiol**, v. 27, n. 5, p. 1201-6, Apr 1996. ISSN 0735-1097

UNGERER, M. et al. Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. **Circ Res**, v. 74, n. 2, p. 206-13, Feb 1994. ISSN 0009-7330

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. ISSN 1932-6203

VASSILATIS, D. K. et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 8, p. 4903-8, Apr 15 2003. ISSN 0027-8424

.

VOLTARELLI, V. A. et al. Lack of beta2 -adrenoceptors aggravates heart failure-induced skeletal muscle myopathy in mice. **J Cell Mol Med**, v. 18, n. 6, p. 1087-97, Jun 2014. ISSN 1582-4934

WACHTER, S. B.; GILBERT, E. M. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. **Cardiology**, v. 122, n. 2, p. 104-12, 2012. ISSN 1421-9751

WALLUKAT, G. The beta-adrenergic receptors. **Herz**, v. 27, n. 7, p. 683-90, Nov 2002. ISSN 0340-9937

WEGENER, G.; KRAUSE, U.; NEWSHOLME, E. A. Metabolic regulation--physiological and medical aspects. **Experientia**, v. 52, n. 5, p. 391-5, May 15 1996. ISSN 0014-4754

WESS, J. G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. **FASEB J**, v. 11, n. 5, p. 346-54, Apr 1997. ISSN 0892-6638

WETTSCHURECK, N.; OFFERMANN, S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. **Physiol Rev**, v. 85, n. 4, p. 1159-204, Oct 2005. ISSN 0031-9333

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, Jun 2001. ISSN 0008-6363

WOO, A. Y. et al. Biased beta2-adrenoceptor signalling in heart failure: pathophysiology and drug discovery. **Br J Pharmacol**, v. 172, n. 23, p. 5444-56, Dec 2015. ISSN 1476-5381

WOO, A. Y.; XIAO, R. P. beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. **Acta Pharmacol Sin**, v. 33, n. 3, p. 335-41, Mar 2012. ISSN 1745-7254

XIANG, Y.; KOBILKA, B. K. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1530-2, Jun 6 2003. ISSN 1095-9203

XIANG, Y. K. Compartmentalization of beta-adrenergic signals in cardiomyocytes. **Circ Res**, v. 109, n. 2, p. 231-44, Jul 8 2011. ISSN 1524-4571

XIAO, R. P.; JI, X.; LAKATTA, E. G. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. **Mol Pharmacol**, v. 47, n. 2, p. 322-9, Feb 1995. ISSN 0026-895X

XU, X. et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodeling in rats. **Cardiovasc Res**, v. 78, n. 3, p. 523-32, Jun 1 2008. ISSN 0008-6363

ZHANG, L. Q. et al. Sprint training restores normal contractility in postinfarction rat myocytes. **J Appl Physiol (1985)**, v. 89, n. 3, p. 1099-105, Sep 2000. ISSN 8750-7587

ZHANG, W. et al. beta-Adrenergic receptor-PI3K signaling crosstalk in mouse heart: elucidation of immediate downstream signaling cascades. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26581, 2011. ISSN 1932-6203

ZHU, W. Z. et al. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 617-25, Mar 2003. ISSN 0021-9738

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, Feb 13 2001. ISSN 0027-8424

ZINGMAN, L. V. et al. ATP-sensitive potassium channels: metabolic sensing and cardioprotection. **J Appl Physiol** (1985), v. 103, n. 5, p. 1888-93, Nov 2007. ISSN 8750-7587

9. ANEXO 1

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 55/2016, intitulado “Efeitos do tratamento físico sobre as propriedades moleculares dos cardiomiócitos de camundongos *Knockout* para receptores β -2 adrenérgicos”, coordenado pelo professor Thales Nicolau Prímola Gomes do Departamento de Educação Física, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 07/10/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 55/2016, named “Effects of physical treatment on the molecular properties of cardiomyocytes Knockout mice to β -2 adrenergic receptor”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on October 07, 2016 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

10. ANEXO 2

Proposta de publicação: Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.

The cardioprotective effect of moderate-intensity aerobic exercise is not evident in β_2 -adrenergic receptor knockout mice

Alexandre Jayme Lopes Dantas Costa,¹ Antônio José Natali,¹ Aurora Corrêa Rodrigues,¹ Franciany de Jesus Silva,¹ Leôncio Lopes Soares,¹ Emanuel Mattos Della Lucia,¹ Tiago Ferreira Leal,¹ Daise Nunes Queiroz Cunha,¹ Patrícia Chakur Brum,² Miguel Araujo Carneiro Júnior,¹ Thales Nicolau Primola-Gomes^{1#}

Universidade Federal de Viçosa (UFV),¹ Viçosa, Mg -Brazil; Universidade de São Paulo (USP),² São Paulo, SP- Brazil;

Abstract

Background: Both β 2-adrenoreceptor (β 2AR) modulation and moderate-intensity aerobic exercise (MIAE) promotes cardioprotection, however, the cardioprotective effects of MIAE in a condition of β 2AR absence remain to be elucidated.

Methods: To test the effects of an eight-week MIAE program on the heart of β 2AR knockout (β 2ARKO) mice and wild-type (WT) underwent treadmill running (60 min/day, 5 days/wk, 60% maximal running speed), while their respective controls did not exercise. The cardiac contractile function was measured by echocardiography; and the cellular contractility and intracellular Ca^{2+} transient were measured in single left ventricular myocytes.

Results: MIAE increased running capacity in β 2ARKO and WT mice, although the fractional shortening and ejection fraction were not changed in trained β 2ARKO mice. Trained β 2ARKO mice also showed lower amplitude of cell shortening and shorter times to peak shortening and to 50% relaxation than WT mice. Moreover, trained β 2ARKO mice showed lower intracellular Ca^{2+} transient amplitude and shorter time to 50% decay of the Ca^{2+} transient in than WT mice.

Conclusions: In the absence of β 2AR it is likely that MIAE does not promote cardioprotection inasmuch as it impairs cardiomyocytes' contractile function.

Keywords: Physical Exercise; Cardiomyocyte contraction; Cardioprotection; Adrenergic regulation.

1. Introduction

The β 1-adrenoreceptor (β 1AR) activation is primarily responsible for the increase in cardiac chronotropism, inotropism and lusitropism in humans and mice (Xiang and Kobilka 2003). However, β 2AR also participates in such modulation and its regulatory role is cardioprotective as it counteracts the cardiac damages induced by β 1AR overstimulation (Bernstein 2002; Patterson et al. 2004) .

The use of β -blockers protects cardiomyocytes against excessive adrenergic stimulation (Mann 1998). Likewise, as a non-pharmacological therapeutic strategy, moderate-intensity aerobic exercise (MIAE) is known to promote cardioprotection due to its beneficial effects on cardiovascular and autonomic nervous systems by increasing vagal tone and reducing sympathetic activity at rest (Leosco et al. 2013). However, the cardioprotective effects of chronic MIAE in a condition of β 2AR absence remain to be elucidated.

Expanding the comprehension of the β 2AR roles is of clinical relevance to promote advances in the pharmacological and non-pharmacological therapies. Therefore, in this short report we tested the effects of a MIAE program on the contractile function of cardiomyocytes in β 2AR knockout (β 2ARKO) mice.

2. Methods

2.1. Experimental animals. Four-to five-month-old male wild type (WT) and congenic β 2ARKO mice in the FVB/N genetic background were studied. WT and β 2ARKO mice were randomly assigned to WT control (WTc), WT trained (WTtc), β 2ARKO control (β 2ARKOc) and β 2ARKO trained (β 2ARKOt) groups. All mouse experiments were approved by the institutional Animal Ethics Committee (protocol #55/2016).

2.2. Graded treadmill exercise test and MIAE training protocol

The maximal running speed (MRS) was determined using the graded treadmill exercise test until fatigue, as described previously (Ferreira et al. 2007). The MIAE training was performed 5 days/week (Monday to Friday), 60 min/day, for 8 weeks. Over the first week, the duration and running speed of exercise were progressively increased until 60 minutes and 60% of the MRS. This intensity was maintained until the 8th week of training. By the end of week four, the graded treadmill test was repeated to readjust the MRS. The exercise capacity was estimated using the total distance run obtained in the graded treadmill test performed at the end of week eight.

2.3. Echocardiogram.

Forty-eight hours after the last bout of exercise, isoflurane-anesthetized WT and β_2 ARKO mice had their cardiac function assessed by two-dimensional guided M-mode echocardiography (Acuson Sequoia model 512). Briefly, mice were positioned with their upper limbs wide open, and an ultrasound transmission gel was applied to the precordium. Transthoracic echocardiography was performed using a 14-MHz linear transducer. Left ventricle systolic function was estimated by fractional shortening as follows: Fractional shortening (%) = $[(LVEDD - LVESD)/LVEDD] \times 100$, where LVEDD means left ventricular end-diastolic dimension, and LVESD means left ventricular end-systolic dimension.

2.4. Cardiomyocyte isolation.

Twenty-four hours after echocardiography, mice were weighed and then killed by decapitation. Left ventricle (LV) cardiomyocytes were enzymatically isolated as described previously (Rodrigues et al. 2018). Only calcium-tolerant, quiescent, rod-shaped cardiomyocytes showing clear cross-striations were studied. The isolated cardiomyocytes were used within 2–3 h of isolation.

2.5. Cardiomyocyte contractile function.

Cell contractility was evaluated as described previously (Rodrigues et al. 2018). Briefly, the isolated cells were placed in a chamber and perfused with HEPES-Tyrode solution plus 10 μM CaCl_2 at 37°C (1). Steady-state 1-Hz contractions were elicited via platinum bath electrodes with 5-ms voltage pulses and intensity of 40 V. The cell shortening (our index of contractility) in response to electrical stimulation was captured using a video motion edge detector (Ionoptix Milton, USA). The times to peak of shortening and to half relaxation were calculated.

2.6. Intracellular calcium transient:

The intracellular calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) transient was monitored in single myocytes using the ratiometric Ca^{2+} dye fura-2-AM (Thermo Fisher, Waltham, USA), as previously described (Natali et al. 2002). In brief, fura-2 signal was acquired using IonWizard software (IonOptix, Milton, USA) when myocytes were field stimulated via external platinum electrodes at 1Hz, at 37°C, using the same experimental chamber described above. The ratio of fluorescent emission at 510 nm in response to alternate excitation at 340 and 380 nm (340/380 ratio) was our index of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient.

2.7. Statistical analysis:

Data are presented as means \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Tukey test or Kruskal -Wallis followed by Dunn's test was used for comparisons. A p value of < 0.05 was considered statistically significant. Numbers of rats, hearts, and myocytes used in each experiment are given in relevant table and figure legends.

3. Results

Both initial and final BW were not different between groups (Table 1). The β 2ARKO groups exhibited lower HW, LVW and their ratios to BW than the respective WT groups, and no effect of MIAE was observed on such parameters. Regarding the cardiac function, neither β 2AR deletion nor MIAE affected fractional shortening and ejection fraction. As for the

exercise capacity, trained groups showed higher distance run than untrained. In addition, $\beta 2\text{ARKKOt}$ showed a higher distance run than WTt .

While myocytes from $\beta 2\text{ARKOc}$ had a trend to exhibit reduced shortening ($p=0.06$) compared to WTc animals, cells from $\beta 2\text{ARKOt}$ showed lower ($p<0.05$) shortening than WTt cells (Fig. 1A). MIAE increased cell shortening in WT animals. Regarding the contraction timecourse, $\beta 2\text{ARKOt}$ cells exhibited shorter times to peak (Fig. 1B) and to 50% relaxation, compared to WTt myocytes (Fig. 1C).

Cardiomyocytes from $\beta 2\text{ARKOc}$ group exhibited higher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient amplitude than WTc cells (Fig. 2A). Cells from $\beta 2\text{ARKOt}$ exhibited lower $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient amplitude compared to $\beta 2\text{ARKOc}$ myocytes. The time to peak of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient was shorter in $\beta 2\text{ARKOc}$ myocytes compared to WTc cells (Fig. 2B). The time to 1/2 decay of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient was shorter in $\beta 2\text{ARKOc}$ than in WTc ; and in $\beta 2\text{ARKOt}$ compared to WTt (Fig. 2C).

4. Discussion

The applied MIAE reduced the amplitudes and timecourses of left ventricular myocyte shortening and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient in $\beta 2\text{ARKO}$ mice. Such abnormal responses to exercise suggest that the exercise regime did not to promote cardioprotection.

Concerning the reduced amplitudes, exercise training is known to increase β -AR responsiveness (Libonati and MacDonnell 2011) and Gs protein expression (Hammond et al. 1988), thus it is likely that the combination of increased adrenergic stimuli induced by MIAE and the absence of the cardioprotective role of $\beta 2\text{AR}$ (Xiang et al. 2002) has impaired the myocyte contractile function. The cardioprotection of $\beta 2\text{AR}$ is related to the inhibition of G α_s / AC / PKA signaling pathway and activation of Gi-G $\beta\gamma$ -PI3K-Akt signaling pathway (Cannavo et al. 2013). This possibility is supported by the fact that in myocytes from WT mice MIAE increased the amplitude of cell shortening, although no effect was found in the amplitude of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient. Such benefit of MIAE in normal individuals is well known (Kemi et al. 2008).

Regarding the time courses of cell shortening and $[Ca^{2+}]_i$ transient, the present study showed that myocytes from $\beta 2ARKOt$ group had shorter times to peak and to 50% relaxation, as well as the time to 50% decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient, than WTt cells. These combined effects might be explained by an increase in the responsiveness of $\beta 1AR$ (Libonati and MacDonnell 2011) and in the expression of Gs proteins (Hammond et al. 1988) in $\beta 2ARKOt$ mice. In the absence of $\beta 2AR$ there is no Gi protein activation which results in increased adenylate cyclase (AC) and cAMP production and hence PKA activation (Xiang and Kobilka 2003). As a consequence of increased Gs expression and absence of Gi activation, the phosphorylation of cardiac proteins involved in excitation-contraction coupling (i.e. PLB, TnI) is augmented (Bers 2002).

As for the cardiac function, there was no effect of either $\beta 2AR$ deletion or MIAE on fractional shortening and ejection fraction. Those changes found in cardiomyocyte contractility did not impact on the whole ventricle. Since $\beta 1AR$ have a greater participation in the modulation of cardiac function (Bernstein 2002), the absence of $\beta 2AR$ did not affect the cardiac function in this animal model.

Despite the absence of MIAE effect on the cardiac function, the exercise capacity was superior in $\beta 2ARKOt$ animals when compared to WTt. Inasmuch as β -adrenergic stimulation promotes glycogenolysis during aerobic exercise (Chruscinski et al. 1999; Rohrer et al. 1999), the lack of $\beta 2AR$ might have decreased glycogenolysis and increased lipolysis in $\beta 2ARKO$ mice (Chruscinski et al. 1999), which preserves muscular glycogen and allows exercise for longer periods.

Morphologically, $\beta 2ARKO$ mice presented lower values for HW, LVW, HW/BW and LVW/BW than WT animals. The participation of $\beta 2AR$ signaling in myocardial growth (Bernstein 2002) and hypertrophy (McMullen et al. 2003) via $\beta 2AR$ coupling to subunit $G_{\alpha i}$

activity on phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT has been demonstrated (McMullen et al. 2003).

5. Conclusion

In conclusion, in the absence of β 2AR it is likely that MIAE does not promote cardioprotection inasmuch as it impairs cardiomyocytes' contractile function.

6. Acknowledgments

We would like to thank the working group, as well as all the collaborators who contributed to the registration of the data and analyzes of this research.

7. Funding

This study was funded by CNPq, FAPEMIG, CAPES and FAPESP. The sponsors had no involvement in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report and in the decision to submit the article for publication. AJ Natali is a CNPq fellow.

8. Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- Bernstein, D. 2002. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Trends in cardiovascular medicine* **12**(7): 287-294.
- Bers, D.M. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**(6868): 198-205. doi: 10.1038/415198a.
- Cannavo, A., Rengo, G., Liccardo, D., Pironti, G., Scimia, M.C., Scudiero, L., De Lucia, C., Ferrone, M., Leosco, D., Zambrano, N., Koch, W.J., Trimarco, B., and Esposito, G. 2013. Prothymosin alpha protects cardiomyocytes against ischemia-induced apoptosis via preservation of Akt activation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **18**(10): 1252-1261. doi: 10.1007/s10495-013-0876-9.
- Chruscinski, A.J., Rohrer, D.K., Schauble, E., Desai, K.H., Bernstein, D., and Kobilka, B.K. 1999. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *The Journal of biological chemistry* **274**(24): 16694-16700.
- Ferreira, J.C., Rolim, N.P., Bartholomeu, J.B., Gobatto, C.A., Kokubun, E., and Brum, P.C. 2007. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **34**(8): 760-765. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x.
- Hammond, H.K., Ransnas, L.A., and Insel, P.A. 1988. Noncoordinate regulation of cardiac Gs protein and beta-adrenergic receptors by a physiological stimulus, chronic dynamic exercise. *The Journal of clinical investigation* **82**(6): 2168-2171. doi: 10.1172/JCI113840.
- Kemi, O.J., Ellingsen, O., Smith, G.L., and Wisloff, U. 2008. Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**: 356-368.

- Leosco, D., Parisi, V., Femminella, G.D., Formisano, R., Petraglia, L., Allocca, E., and Bonaduce, D. 2013. Effects of exercise training on cardiovascular adrenergic system. *Frontiers in physiology* **4**: 348. doi: 10.3389/fphys.2013.00348.
- Libonati, J.R., and MacDonnell, S.M. 2011. Cardiac beta-adrenergic responsiveness with exercise. *European journal of applied physiology* **111**(11): 2735-2741. doi: 10.1007/s00421-011-1909-0.
- Mann, D.L. 1998. Basic mechanisms of disease progression in the failing heart: the role of excessive adrenergic drive. *Progress in cardiovascular diseases* **41**(1 Suppl 1): 1-8.
- McMullen, J.R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M.C., Kang, P.M., and Izumo, S. 2003. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(21): 12355-12360. doi: 10.1073/pnas.1934654100.
- Natali, A.J., Wilson, L.A., Peckham, M., Turner, D.L., Harrison, S.M., and White, E. 2002. Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology* **541**(Pt 3): 863-875.
- Patterson, A.J., Zhu, W., Chow, A., Agrawal, R., Kosek, J., Xiao, R.P., and Kobilka, B. 2004. Protecting the myocardium: a role for the beta2 adrenergic receptor in the heart. *Critical care medicine* **32**(4): 1041-1048.
- Rodrigues, A.C., Natali, A.J., Cunha, D., Costa, A., Moura, A.G., Araujo Carneiro-Junior, M., Felix, L.B., Brum, P.C., and Primola-Gomes, T.N. 2018. Moderate Continuous Aerobic Exercise Training Improves Cardiomyocyte Contractility in Beta1 Adrenergic Receptor Knockout Mice. *Arquivos brasileiros de cardiologia* **110**(3): 256-262. doi: 10.5935/abc.20180025.

Rohrer, D.K., Chruscinski, A., Schauble, E.H., Bernstein, D., and Kobilka, B.K. 1999.

Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *The Journal of biological chemistry* **274**(24): 16701-16708.

Xiang, Y., and Kobilka, B.K. 2003. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science* **300**(5625): 1530-1532. doi: 10.1126/science.1079206.

Xiang, Y., Rybin, V.O., Steinberg, S.F., and Kobilka, B. 2002. Caveolar localization dictates physiologic signaling of beta 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **277**(37): 34280-34286. doi: 10.1074/jbc.M201644200.

Table 1. Body, heart and left ventricular weights and their ratios, exercise capacity and echocardiographic parameters.

	WTc	WTt	β_2 ARKOc	β_2 ARKOt
Initial BW, g (n= 6-7)	29.57 \pm 0.71	29.33 \pm 0.71	28.83 \pm 0.70	29.83 \pm 0.65
Final BW, g (n= 6-7)	31.42 \pm 0.78	31.00 \pm 1.15	30.66 \pm 0.33	28.66 \pm 0.88
HW, mg (n= 6-7)	230.14 \pm 7.97	238.83 \pm 8.6	206.00 \pm 10.82*	209.16 \pm 6.68*
LVW, mg (n= 6-7)	141.43 \pm 4.36	151.66 \pm 4.28	122.33 \pm 7.22*	118.50 \pm 6.47*
HW/BW, mg/g (n= 6-7)	7.33 \pm 0.24	7.71 \pm 0.13	6.72 \pm 0.38*	7.26 \pm 0.12*
LVW/BW, mg/g (n= 6-7)	4.50 \pm 0.13	4.90 \pm 0.13	3.99 \pm 0.26*	4.09 \pm 0.11*
FS, % (n= 4-7)	28.75 \pm 1.87	29.00 \pm 1.87	30.40 \pm 1.68	28.75 \pm 1.53
LVEF, % (n= 4-7)	62.87 \pm 2.69	62.62 \pm 2.69	64.20 \pm 2.40	62.33 \pm 2.19
Total distance run (m) (n= 7)	368.74 \pm 18.65	649.51 \pm 47.78 ^{&}	417.34 \pm 28.24	853.97 \pm 42.18 ^{#§}

Values are means \pm SEM (Two-way ANOVA followed by Tukey test). BW, body weight. HW, heart weight. LVW, left ventricular weight. FS, fractional shortening. LVEF, left ventricular ejection fraction. WTc, wild-type control. WTt, wild-type trained. β_2 ARKOc, β_2 -AR knockout control. β_2 ARKOt, β_2 -AR knockout trained. BW, body weight. n, number of animals. *p < 0.05 vs. respective WT group. [&]p < 0.001 vs. WTc. [#]p < 0.001 vs. WTt. [§]p < 0.001 vs. β_2 ARKOc.

Figure 1.

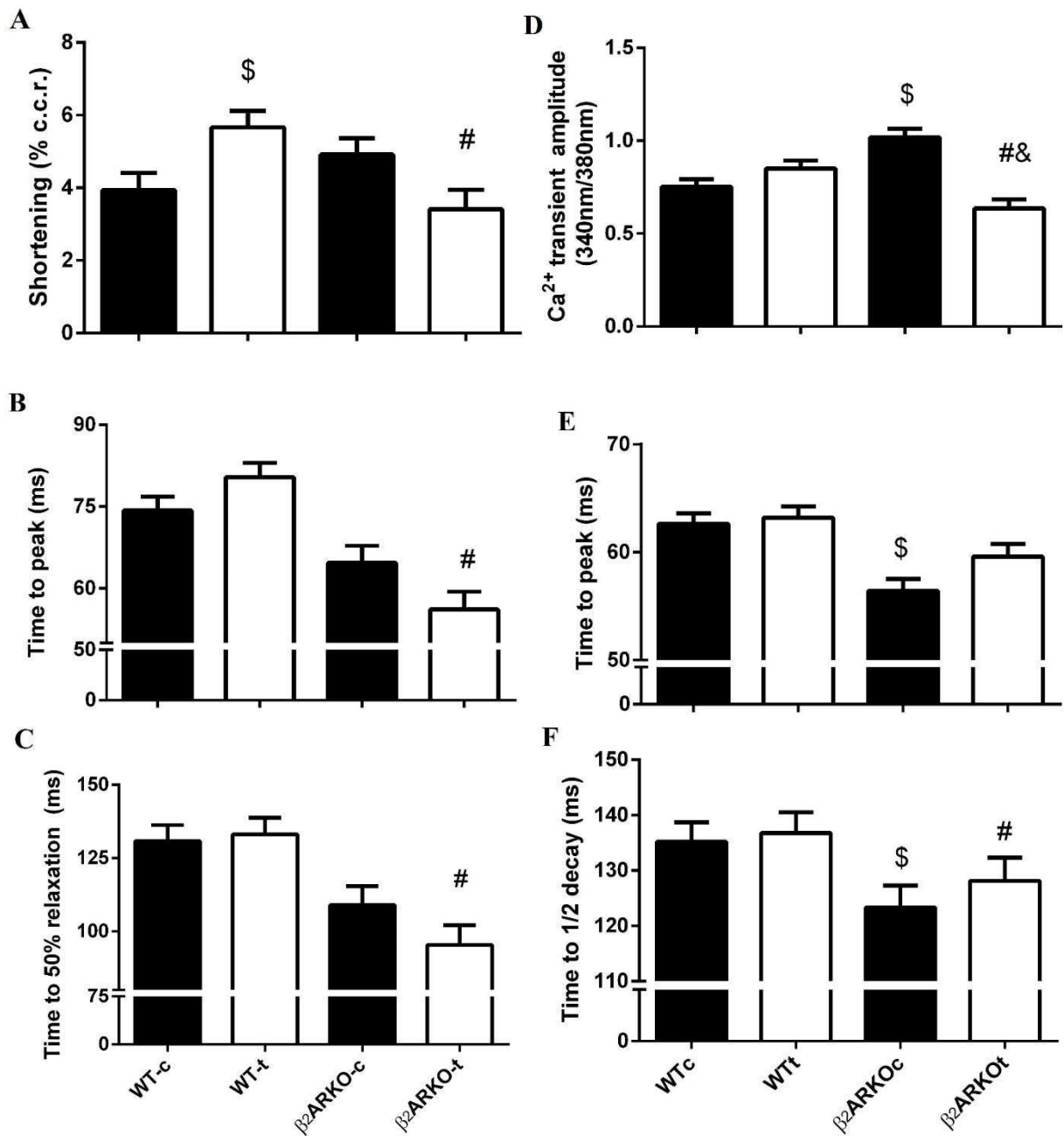


Figure 1. Myocyte contractile function. (A) Amplitude of shortening; (B) Time to peak of shortening; (C) Time to 50% relaxation, Intracellular Ca²⁺ transient. (D) Amplitude; (E) Time to peak; (F) Time to 50% decay. WT-c, wild type control. WT-t, wild type trained. β₂ARKO-c, β₂ knockout control. β₂ARKO-t, β₂ knockout trained. Data are mean ± SEM of 40 to 52 cells in each group (Kruskal -Wallis followed by Dunn's test). # p < 0.05 vs. WTt; & p < 0.05 vs. β₂ARKO-c; \$ p < 0.05 vs. WTc.