



## REGULAÇÃO DO $\text{Ca}^{2+}$ NO MÚSCULO ESQUELÉTICO POR UM SEGUNDO MENSAGEIRO DERIVADO DE NAD DURANTE E APÓS UM PROTOCOLO DE FADIGA.

Gustavo Manzaneres\*<sup>1</sup>, Paulo Guimarães Gandra<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>- Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, IB; UNICAMP

### RESUMO

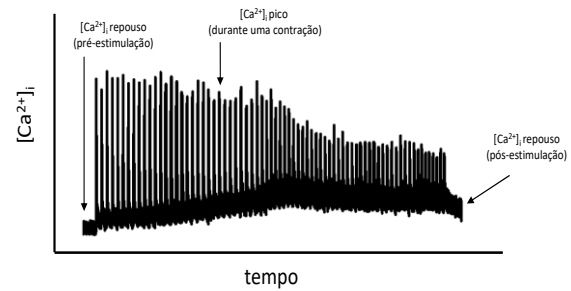
A estimulação das células musculares esqueléticas resulta no aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), que é liberado do retículo sarcoplasmático. O aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , acaba por desencadear o processo de contração e geração de força. Ao término do estímulo, a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  retorna para valores de repouso devido a ação da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. Alterações na regulação do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  podem estar associadas ao desenvolvimento da fadiga e da perda da função do músculo em condições patofisiológicas. Recentemente foi observado que a contração do músculo induz o aumento da formação de ADP-ribose cíclico (cADPR) um composto que pode regular o  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (o cADPR é um segundo mensageiro de  $\text{Ca}^{2+}$  derivado do  $\text{NAD}^+$ ). Existem evidências de que o cADPR pode aumentar o  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e a atividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. Porém, o papel do cADPR na regulação do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante um período de estimulações sucessivas do músculo ainda não é conhecido. A hipótese central deste projeto é que o cADPR é importante para regulação do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em células musculares esqueléticas durante e após um período de atividade contrátil. Para testar esta hipótese nós já conseguimos obter células musculares intactas isoladas do músculo de camundongos. Estas células vêm se mostrando viáveis e responsivas a estimulação elétrica. Nós estamos carregando estas células com um marcador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  para realização da medida da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em tempo real, durante e após a estimulação das células isoladas (*single cell*), por microscopia de fluorescência. O próximo passo deste projeto será tratar as células com um antagonista de cADPR e analisar a dinâmica de variação de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante e após um protocolo de estimulação elétrica que induz a fadiga. Nós esperamos que os resultados obtidos poderão trazer informações importantes para o entendimento de como o cADPR regula a função do músculo. O entendimento do papel do cADPR no músculo poderá ser especialmente relevante para condições em que os níveis de  $\text{NAD}^+$  ou de cADPR podem estar alterados, como no envelhecimento e em tratamentos farmacológicos com potencial de alterar a formação de cADPR.

**Palavras-chaves:** Músculo esquelético, Cálcio, NAD

### 1. INTRODUÇÃO

A prescrição do exercício físico para a prevenção e combate de doenças crônicas, para a melhora da qualidade de vida e promoção da saúde no envelhecimento é cada dia mais recorrente<sup>1,2</sup>. O entendimento dos mecanismos que regulam o processo de contração do músculo esquelético é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias que melhorem a função do músculo e a capacidade ou tolerância ao exercício. Os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  possuem papel central no processo de contração do músculo esquelético. O aumento concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  livre ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) é necessário para que ocorra a exposição do sítio de ligação da actina, o que permite que ocorra a ligação entre actina e miosina (as proteínas contráteis) e conseqüentemente a contração. Em condições de repouso a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é baixa. Quando o músculo é estimulado a contrair o  $\text{Ca}^{2+}$  é liberado do retículo sarcoplasmático, aumentando o  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Em um protocolo de estimulações repetidas a

liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo durante a estimulação é progressivamente diminuída, isto resulta em uma diminuição na amplitude do transiente de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante a contração muscular, levando a uma menor geração de força e portanto no desenvolvimento de fadiga (figura 1). Durante o desenvolvimento da fadiga, também ocorre um acúmulo do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de repouso (a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no momento em que a célula não está contraindo) que irá resultar em uma diminuição da taxa de relaxamento do músculo (figura 1). O  $\text{Ca}^{2+}$  também pode regular a resposta adaptativa ao exercício. Nesse sentido, vem sendo proposto que um pequeno aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de repouso após o exercício pode funcionar como um sinal que resulta em aumento da capacidade oxidativa e resistência a fadiga do músculo<sup>3</sup>. Já grandes aumentos na concentração do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de repouso podem estar associados ao “overtraining” e desenvolvimento de miopatias<sup>4,5</sup>.



**Figura 1-** Exemplo de medida do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em uma fibra muscular esquelética isolada durante um protocolo de estimulação elétrica que induz a fadiga. Repare o aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de repouso e a diminuição progressiva da amplitude do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante o protocolo de fadiga. Dados obtidos no lab. do Dr Hogan (University of California-San Diego).

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) funciona como uma coenzima em reações redox centrais para o metabolismo energético celular<sup>6,7</sup>. O NAD também pode regular a expressão de genes importantes para o metabolismo oxidativo e a função de células satélites no músculo<sup>8</sup>. Segundos mensageiros de  $\text{Ca}^{2+}$  derivados de NAD vem sendo mostrado regular o  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em diferentes tipos celulares<sup>9,10</sup>. Porém, o papel desses segundo mensageiros de  $\text{Ca}^{2+}$  derivados do NAD na função do músculo esquelético ainda não é claro. Como os níveis de  $\text{NAD}^+$  estão diminuídos no músculo no envelhecimento e distrofias<sup>11,12</sup>, enquanto que terapias visando o aumento dos níveis de  $\text{NAD}^+$  vem sendo cada vez mais estudadas, o entendimento do papel de segundo mensageiros de  $\text{Ca}^{2+}$  derivados de NAD pode ser importante para o entendimento de como a variação dos níveis de NAD podem afetar a função do músculo<sup>13</sup>.

O cADPR (adenosina difosfato-ribose cíclico) é um dos segundos mensageiros de NAD mais conhecidos<sup>9,10,14</sup>. O cADPR ativar diretamente ao canal de rianodina (RYR1), ou se ligar a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA) aumento assim sua atividade<sup>15</sup>. Independente da sua atuação é notável que a formação de cADPR foi mostrada estar aumentada no músculo durante a estimulação elétrica (*in vitro*) e após o exercício (*in vivo*) sugerindo que o cADPR pode ser importante para regulação da contração muscular<sup>15,16</sup>. Em um estudo com células musculares esqueléticas isoladas (fibras musculares), o tratamento com um antagonista de cADPR resultou em menor amplitude de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante uma única contração tetânica submáxima e durante um período de estimulação contínua submáximo<sup>17</sup>.

Durante um protocolo de estimulação que induz a fadiga, o  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de repouso (o valor de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  enquanto a fibra não está contraindo) aumenta progressivamente<sup>18,19</sup> (ver Figura 1). O aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de repouso pode resultar de uma diminuição da captação da atividade da SERCA, o que causa uma diminuição da taxa de relaxamento da fibra de até ~2.5 vezes, que é característico do processo de desenvolvimento de fadiga<sup>18,19</sup>. A diminuição da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SERCA durante o desenvolvimento da fadiga pode resultar de diminuições no pH intracelular<sup>18,19</sup>. Uma das perguntas que este projeto visa responder é se o aumento da formação de cADPR durante um período de estimulação que induz a fadiga é importante para regular a atividade da SERCA e do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durante e após um período de atividade contrátil repetitiva.

A **hipótese central** deste projeto é que o cADPR, um segundo mensageiro de  $\text{Ca}^{2+}$

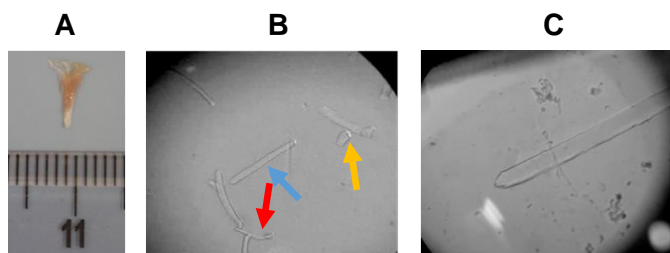
derivado do NAD, é importante para regulação do  $[Ca^{2+}]_i$  de repouso durante e após um período de estimulação do músculo esquelético. Esta hipótese é baseada nos seguintes achados: **1)** a formação de cADPR aumenta em resposta à atividade contrátil no músculo esquelético<sup>15,17</sup>; **2)** no músculo esquelético o cADPR se liga e aumenta a atividade da bomba de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático<sup>15</sup>; **3)** o tratamento com antagonistas de cADPR resultam em diminuição da captação de  $Ca^{2+}$  no retículo sarcoplasmático e da amplitude de  $[Ca^{2+}]_i$  durante a estimulação<sup>15,17</sup>; **4)** durante o desenvolvimento da fadiga, a atividade da SERCA diminui resultando em aumento do  $[Ca^{2+}]_i$  de repouso e diminuição da taxa de relaxamento do músculo<sup>18,19</sup>.

Para testar esta hipótese, **o objetivo** deste projeto é de definir como o tratamento de fibras intactas isoladas de músculo esquelético de camundongos com um antagonista de cADPR pode alterar o  $[Ca^{2+}]_i$  durante e após um período de estimulação repetitiva que induz a fadiga.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1. Fibras isoladas

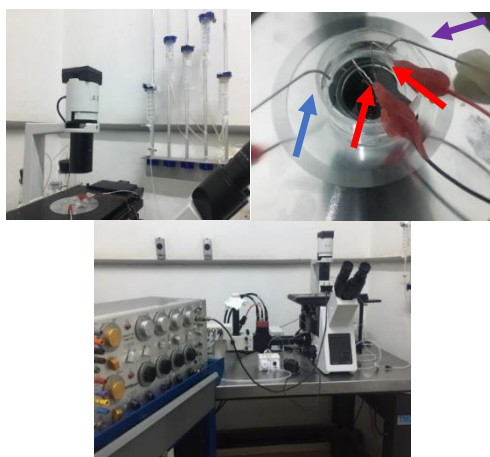
Para obtenção de fibras isoladas o músculo *flexor digitorum brevis* (FDB) é dissecado da pata traseira de camundongos C57BL/6J e digerido em meio de cultura MEM contendo colagenase e 10% FBS. A colagenase digere o tecido conectivo permitindo a obtenção de células musculares esqueléticas isoladas com suas membranas intactas (fibras isoladas intactas). Estas fibras são então aderidas em placas com fundo de vidro. Grande parte das fibras apresentaram aspectos bons, com membranas lisas e estriações bem definidas.



**Figura 2** - A) Músculo *flexor digitorum brevis* (FDB) de camundongo C57BL/6J adulto; B) Fibras isoladas do músculo FDB com colagenase, objetiva 10x, fibra inteira e ótima para contração (seta azul), célula dobrada ou com curvatura (seta vermelha), célula hipercontraída (seta amarela); C) Fibra isolada de músculo FDB, objetiva 40x (imagens feitas no LabNECC; Instituto de Biologia; Unicamp)

### 2.2. Estimulação de fibras isoladas

A placa com fundo de vidro próprio para microscopia fluorescência deve ser posicionada sobre o estágio do microscópio invertido do sistema do microfluorímetro PTI RatioMaster (Horiba Ltd; Quioto; Japão), em conjunto com sistema de perfusão por



**Figura 3**- A) Sistema de perfusão, seringas reguladas por gravidade ao fundo, em primeiro plano fonte de luz, condensador do microscópio e base de platina onde está a placa de vidro conectada as linhas do sistema de perfusão e os eletrodos; B) Câmara (placa com fundo de vidro) com par de eletrodos de estimulação (indicados pelas setas vermelhas), linha de entrada da perfusão (seta roxa) e linha de saída do sistema de perfusão (seta azul); C) Sistema de perfusão visto como um todo. Sistema de seringas por gravidade, linha de saída do sistema de seringas que ao final se liga a linha de perfusão, Base de platina do microscópio onde se encontra a placa de fundo de vidro onde ocorre a estimulação pelos eletrodos, Bomba peristáltica necessária para retirar a solução de perfusão, Estimulador elétrico.

gravidades que elaboramos para manutenção da qualidade das células (imagem 2). O fluxo de ~3ml/min de Tyrode's se mostrou ideal para a perfusão. Para estimular as fibras eletrodos de platina, conectados a um estimulador elétrico, devem ser posicionados a 5 mm de distância das fibras. A princípio estávamos observamos resposta contrátil apenas quando utilizamos ~25 V. Como uso de voltagens altas resulta em eletrólise que pode ser prejudicial para as células, nós fizemos ajustes nos protocolos de isolamento e perfusão das fibras que resultaram em melhora da sua viabilidade e contratilidade. A melhora dos procedimentos de obtenção das fibras, permitiu a estimulação das fibras com voltagens menores (~8 a 15V). Nós ainda pretendemos melhorar a estimulação utilizando um novo estimulador recentemente adquirido.

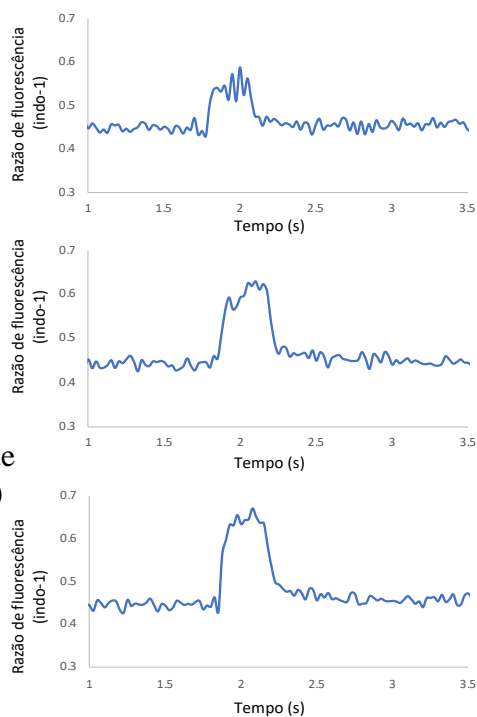
### 2.3. Medidas de $[Ca^{2+}]_i$

As medidas de  $Ca^{2+}$  estão sendo realizadas no instituto de Biologia da Unicamp em um laboratório satélite do Laboratório Nacional de Estudos do Cálcio Celular.

Para isso as fibras são incubadas com o um marcador fluorescente de  $Ca^{2+}$  (INDO-1 AM), por cerca de 30 min a 60 min. A câmara contendo a fibra já carregada com INDO-1 é posicionada sobre o estágio de um microscópio de fluorescência invertido, conectado a um sistema de fotometria que inclui um monocromador (fonte de luz), filtros e um tubo fotomultiplicador (PMT) para detecção dos sinais de fluorescência (RatioMaster, PTI Horiba). Os sinais de fluorescência são adquiridos através do software Felix GX (Photon Technology International, PTI) e analisados para determinação da variação da concentração de  $[Ca^{2+}]_i$ . Para realização das medidas de  $[Ca^{2+}]_i$  durante a estimulação, nós otimizamos as condições de carregamento das células intactas com o marcador fluorescente de INDO-1 AM. Apesar de já estarmos conseguindo carregar as células com o marcador de  $Ca^{2+}$ , nós também estamos otimizando este processo através da adição de um detergente (pluoronic F-127) na solução de carregamento.

### 2.4. Incubação com antagonista de cADPR

Este projeto ainda está em andamento e o tratamento das fibras isoladas com o antagonista de cADPR ainda será realizado. Para isso as fibras serão incubadas por 10 minutos com o composto **antagonista** de cADPR, 8-Bromo-cADPR (100  $\mu$ M; Cayman Chemical)<sup>17</sup>. As fibras tratadas com 8-Bromo-cADPR serão comparadas com fibras controle que serão mantidas incubadas somente com solução de Tyrode's nas mesmas condições e pelo mesmo período que as células tratadas com o antagonista de cADPR. A medida da  $[Ca^{2+}]_i$  por microscopia de fluorescência será realizada em tempo real durante a realização do protocolo de estimulação<sup>19-21</sup>. Os valores de  $[Ca^{2+}]_i$  de repouso serão determinados antes do protocolo de fadiga, entre cada contração realizada durante o



**Figura 4** - Exemplo de sinal de fluorescência de uma fibra muscular esquelética isolada estimulada com trens de A) 20 Hz; B) 50 Hz; C) 100 Hz. Como esperado há aumento da razão de fluorescência de indo-1 indicando maior  $[Ca^{2+}]_i$  conforme a frequência de estimulação é aumentada. Ajustes na preparação experimental ainda são necessários para diminuir o ruído e melhorar o sinal obtido. (Esta fibra demonstrou a variação esperada dos sinais de fluorescência do indo-1; diminuição da emissão a 485 nm e aumento da emissão a 410 nm durante a estimulação)

protocolo de fadiga e 5, 10, 15, 30 minutos após o término da estimulação<sup>19-21</sup>. A *taxa de decaimento*  $[Ca^{2+}]_i$  durante a fase de relaxamento de cada contração será utilizada para estimar a atividade da SERCA<sup>23</sup>. Os valores de  $[Ca^{2+}]_i$  *pico* durante as contrações tetânicas também serão obtidos ao longo do protocolo de estimulação.

### 3. CONCLUSÕES

As condições experimentais para testar a nossa hipótese, de que o cADPR formado no músculo é importante para regular o  $[Ca^{2+}]_i$  no músculo durante e após um protocolo de estimulação que induz a fadiga, já estão praticamente todas definidas. Nós estamos conseguindo obter células musculares esqueléticas isoladas intactas viáveis e responsivas à estimulação elétrica. Além disso, estamos conseguindo carregar as células com o marcador fluorescente de  $Ca^{2+}$  INDO-1 AM. No momento estamos retomando as atividades no laboratório após as suas interrupções devido a pandemia do COVID-19. Os estudos sobre os efeitos do tratamento de células musculares esqueléticas com um antagonista de cADPR sobre o  $[Ca^{2+}]_i$  durante e após um período de atividade contrátil repetitiva irão ajudar a definir se o cADPR endógeno, é um fator importante para regular a função do músculo durante a contração.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J. & Zierath, J. R. *Cell* **159**, 738–749 (2014).
2. Zierath, J. R. & Wallberg-Henriksson, H. *Cell Metab.* **22**, 25–30 (2015).
3. Ivarsson, N. *et al. J. Gen. Physiol.* **151**, 567–577 (2019).
4. Bellinger, A. M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2198–2202 (2008).
5. Place, N. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15492–15497 (2015).
6. Gomes, A. P. *et al. Cell* **155**, 1624–1638 (2013).
7. Yoshino, J., Baur, J. A. & Imai, S. *Cell Metab.* **27**, 513–528 (2018).
8. Frederick, D. W. *et al. J. Biol. Chem.* **290**, 1546–1558 (2015).
9. Galione, A. *Science (80- )*. **259**, 325–326 (1993).
10. Lee, H. C. *J. Biol. Chem.* **287**, 31633–31640 (2012).
11. Ryu, D. *et al. Sci. Transl. Med.* **8**, 361ra139–361ra139 (2016).
12. Dolopikou, C. F. *et al. Eur. J. Nutr.* **59**, 505–515 (2020).
13. Goody, M. F. & Henry, C. A. *Skelet. Muscle* **8**, 9 (2018).
14. Lee, H. C. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 317–345 (2001).
15. Park, D.-R., Nam, T.-S., Kim, Y.-W., Lee, S.-H. & Kim, U.-H. *Cell. Physiol. Biochem.* **46**, 2017–2030 (2018).
16. Gifford, J. R. *et al. J. Appl. Physiol.* **119**, 882–888 (2015).
17. Park, D.-R., Park, K., Kim, B., Yoon, C. & Kim, U.-H. *Diabetes* **64**, 1224–1234 (2015).
18. Allen, D. G., Lamb, G. D. & Westerblad, H. *Physiol. Rev.* **88**, 287–332 (2008).
19. Nogueira, L., Shiah, A. a, Gandra, P. G. & Hogan, M. C. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **305**, R118–R125 (2013).
20. Gandra, P. G., Shiah, A. A., Nogueira, L. & Hogan, M. C. *J. Physiol.* **596**, 1079–1089 (2018).
21. Cheng, A. J. & Westerblad, H. *Nat. Protoc.* **12**, 1763–1776 (2017).