

# Efeito de um composto ativador da SERCA na resistência à fadiga do músculo esquelético

**Palavras-Chave: Músculo esquelético; Fadiga; ATPase de cálcio.**

**Autores/as:**

**Guilherme Henrique Braga Rocha [FCM]**

**Gustavo Manzanares [IB]**

**Guilherme Brito da Silva [IB]**

**Prof. Dr. Paulo Guimarães Gandra (orientador) [IB]**

---

## INTRODUÇÃO

Estratégias visando melhorar a geração de força e resistência à fadiga do músculo esquelético são importantes para indivíduos que apresentam disfunção do músculo (como no envelhecimento, doenças metabólicas e distrofias), assim como para atletas que buscam a melhora do desempenho.

Com isso, a SERCA, que é uma proteína integral de membrana que catalisa o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol para o lúmen do retículo sarcoplasmático às custas de ATP, torna-se objeto de pesquisa. A SERCA é essencial para manutenção de baixos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citosol no repouso e para o relaxamento do músculo esquelético. Durante o desenvolvimento da fadiga, a atividade da SERCA pode estar inibida devido ao acúmulo de metabólitos como a diminuição do pH intracelular<sup>1</sup>. A inibição da atividade da SERCA durante o desenvolvimento da fadiga resulta em uma diminuição da taxa de relaxamento do músculo e acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol<sup>1,2</sup>. Isso pode contribuir para a diminuição da capacidade do músculo gerar força durante um período de estimulações repetitivas que induz a fadiga e, também, reduz a capacidade do músculo gerar força durante a recuperação após a fadiga<sup>2–4</sup>. Recentemente uma nova molécula que ativa de maneira específica a ATPase de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA) foi identificada<sup>5</sup>. Esta molécula vem apresentando alto potencial de uso farmacológico para o tratamento de doenças crônicas como distrofias e doenças metabólicas<sup>6–9</sup>. Notavelmente, diferentes estudos vem mostrando que: 1) o acúmulo de metabólitos durante a atividade contrátil do músculo esquelético pode inibir a SERCA durante o desenvolvimento da fadiga<sup>1</sup>; 2) animais transgênicos em que a atividade da SERCA está aumentada no músculo apresentam maior capacidade de exercício<sup>10</sup>; 3) o ativador específico da SERCA, CDN1163, protegeu o músculo esquelético da perda de função induzida por contração excêntrica e estresse oxidativo<sup>7,11</sup>; 4) o tratamento com CDN1163 aumentou o consumo de  $\text{O}_2$  em células musculares<sup>12</sup> 5) o tratamento crônico com CDN1163 pode aumentar a geração de força e capacidade de exercício em camundongos distróficos e aumentar a geração de força em animais controle<sup>8</sup>. Porém, ainda não se sabe se a ativação farmacológica da SERCA pode melhorar a função do músculo saudável durante o desenvolvimento da fadiga.

## OBJETIVOS

Definir se a ativação farmacológica da SERCA com o composto CDN1163, pode aumentar a resistência à fadiga do músculo esquelético e melhorar a recuperação da geração de força após a fadiga.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS.** Os objetivos específicos deste projeto são de definir se o tratamento in vitro de feixes de células musculares esqueléticas intactas com um ativador da SERCA: 1) altera a geração de força em estimulação submáxima e máxima assim como a taxa de geração de força e de relaxamento; 2) aumenta a resistência à fadiga e a taxa de relaxamento das células musculares ao longo de um protocolo de estimulação que induz a fadiga e 30 min após a fadiga.

## METODOLOGIA

Feixes de fibras musculares contendo ~10-20 células intactas foram isoladas mecanicamente do músculo *Flexor Digitorum Brevis* (FDB) de camundongos C57BL6J machos adultos (10-12 semanas de vida)<sup>13-15</sup>. Os feixes de fibras foram presos a clips de alumínio que por sua vez foram conectados a um transdutor de força (Aurora Scientific 403A; Aurora Canadá) e um gancho móvel em um sistema para análise de fibras isoladas (Aurora Scientific 801C; Aurora Canadá). As células foram mantidas sob perfusão com solução de Tyrode a 28 °C borbulhada com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>.

Os feixes de fibras foram estimulados em diferentes frequências com 1 min de intervalo entre cada contração (e.g. 10, 20, 30, 40, 50 70, 100, 120 Hz; utilizando trens de 350 ms; curva força-frequência). Esse protocolo permite a análise da função contrátil em estimulações submáximas e máximas. Após 10 min de repouso alguns feixes de fibras musculares intactas foram incubados com o ativador da SERCA (CDN1163; 100 µM; Sigma, St. Louis MO, USA) por 15 min<sup>11</sup> (fibras tratadas com CDN1163), enquanto outro grupo de fibras foram incubadas com veículo (DMSO; feixe de fibras controle). Os feixes de fibras foram submetidos novamente ao mesmo protocolo de estimulação descrito acima (curva força-frequência-2) para determinar possíveis efeitos do ativador da SERCA na função contrátil do músculo. Em seguida os feixes de fibras foram submetidos a um protocolo de estimulação que induz a fadiga. O protocolo de fadiga consistiu em estimulações repetidas (70 Hz) até que fosse observada uma diminuição do pico de força gerada para 50% da força da primeira contração. Após 30 min de repouso, os feixes foram estimulados a 30, 50 e 100 Hz para se determinar o grau de diminuição da capacidade de gerar força durante estimulações submáximas e máximas após a fadiga.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com o ativador da SERCA não resultou em alterações da geração de força durante contrações submáximas e máximas em feixes de fibras intactas (Fig 1). Além disso, não foram observadas alterações significativas na taxa máxima de relaxamento das fibras após o tratamento com CDN1163 (não mostrado).

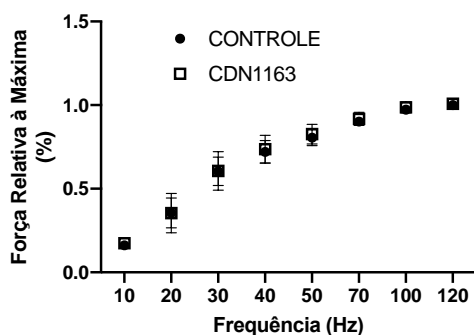


Fig 1. Curvas força-frequência obtidas de feixes de fibras antes e após o tratamento com ativador de SERCA CDN1163. Não foram observadas diferenças na geração de força após o tratamento com CDN1163; análises repetidas; média e desvio padrão; n = 3.

Não foram observadas diferenças no tempo de fadiga quando um grupo de feixes de fibras controle foram comparados com outro grupo de feixes de fibras previamente tratados com CDN1163 (239,2 ± 65,1 s vs 215,7 ± 69,8 s; n = 5 e n = 3 respectivamente). Fibras isoladas apresentam uma variabilidade relativamente grande na resistência à fadiga. Dessa forma, seria necessário um efeito muito grande do tratamento para se observar efeitos significativos na resistência à fadiga de feixes contendo um pequeno número de células.

Durante a recuperação após a fadiga a liberação de Ca<sup>2+</sup> e a sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup> estão diminuídas no músculo esquelético. Como a relação força-Ca<sup>2+</sup> é sigmoideal, a geração de força submáxima (e.g. 30 Hz) é mais afetada nessa situação do que a geração de força durante estimulações máximas (e.g. 100 Hz)<sup>16</sup>. A força gerada durante estimulação submáxima de 30 Hz,

30 min após a fadiga foi de  $73,6 \pm 10,0\%$  da força gerada antes da fadiga nos feixes tratados com CDN1163 e  $61,8 \pm 8,4\%$  nos feixes controle (fig 2). Esses valores não apresentaram diferença estatística, porém é possível que com o aumento do número de amostras analisadas sejam observadas alterações nesses parâmetros.

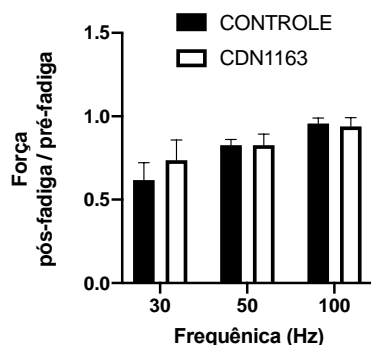


Fig 2. Força relativa 30 min pós-fadiga em feixes controle e tratados com o ativador de SERCA CDN1163. Força gerada durante estimulações de 30, 50 e 100 Hz 30 min após a fadiga dividido pela força gerada nas mesmas frequências de estimulação antes da fadiga; média e desvio padrão; n=3.

## CONCLUSÕES

O tratamento com o ativador da SERCA CDN1163 não resultou em alterações nos parâmetros contráteis nos feixes de fibras intactas em condição não fadigada. Ainda estamos investigando os efeitos desse ativador da SERCA na função contrátil do músculo durante e após o desenvolvimento de fadiga (e.g. tempo de relaxamento das fibras durante o desenvolvimento da fadiga e geração de força após a fadiga).

**OUTROS APOIOS** Este projeto recebe bolsa PIBIC/SAE e está vinculado ao projeto FAPESP# 2019/16891-8.

## REFERÊNCIAS

1. Nogueira, L., Shiah, A. a, Gandra, P. G. & Hogan, M. C. Ca<sup>2+</sup>-pumping impairment during repetitive fatiguing contractions in single myofibers: role of cross-bridge cycling. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **305**, R118–R125 (2013).
2. Tupling, A. R. The Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Fatigue and Disease: Role of the Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Can. J. Appl. Physiol.* **29**, 308–329 (2004).
3. Allen, D. G., Lamb, G. D. & Westerblad, H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiol. Rev.* **88**, 287–332 (2008).
4. Tupling, A. R., Green, H. J., Roy, B. D., Grant, S. & Ouyang, J. Paradoxical effects of prior activity on human sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase response to exercise. *J. Appl. Physiol.* **95**, 138–144 (2003).
5. Cornea, R. L. *et al.* High-throughput FRET assay yields allosteric SERCA activators. *J. Biomol. Screen.* **18**, 97–107 (2013).
6. Kang, S. *et al.* Small Molecular Allosteric Activator of the Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) Attenuates Diabetes and Metabolic Disorders. *J. Biol. Chem.* **291**, 5185–5198 (2016).
7. Qaisar, R. *et al.* Restoration of SERCA ATPase prevents oxidative stress-related muscle atrophy and weakness. *Redox Biol.* **20**, 68–74 (2019).
8. Nogami, K. *et al.* Pharmacological activation of SERCA ameliorates dystrophic phenotypes in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **30**, 1006–1019 (2021).
9. Krajnak, K. & Dahl, R. A new target for Alzheimer's disease: A small molecule SERCA activator is neuroprotective in vitro and improves memory and cognition in APP/PS1 mice. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **28**, 1591–1594 (2018).
10. Anderson, D. M. *et al.* A Micropeptide Encoded by a Putative Long Noncoding RNA Regulates Muscle Performance. *Cell* **160**, 595–606 (2015).
11. Lindsay, A. *et al.* Mechanical factors tune the sensitivity of mdx muscle to eccentric strength loss and its protection by antioxidant and calcium modulators. *Skelet. Muscle* **10**, 3 (2020).
12. Mengeste, A. M. *et al.* The small molecule SERCA activator CDN1163 increases energy metabolism in human skeletal muscle cells. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* **2**, 100060 (2021).

13. Cheng, A. J. & Westerblad, H. Mechanical isolation, and measurement of force and myoplasmic free [Ca<sup>2+</sup>] in fully intact single skeletal muscle fibers. *Nat. Protoc.* **12**, 1763–1776 (2017).
14. Gandra, P. G., Shiah, A. A., Nogueira, L. & Hogan, M. C. A mitochondrial-targeted antioxidant improves myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity during prolonged low frequency force depression at low PO<sub>2</sub>. *J. Physiol.* **596**, 1079–1089 (2018).
15. Clafin, D. R., Jackson, M. J. & Brooks, S. V. Age affects the contraction-induced mitochondrial redox response in skeletal muscle. in *Frontiers in Physiology* vol. 6 1–7 (2015).
16. Cheng, A. J., Bruton, J. D., Lanner, J. T. & Westerblad, H. Antioxidant treatments do not improve force recovery after fatiguing stimulation of mouse skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **593**, 457–472 (2015).