



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUSTAVO MANZANARES

PAPEL DO SEGUNDO MENSAGEIRO DE CÁLCIO
DERIVADO DE NAD^+ , cADPR, NA REGULAÇÃO DO CÁLCIO,
GERAÇÃO DE FORÇA E RESISTÊNCIA À FADIGA DE
FIBRAS ISOLADAS DO MUSCULO ESQUELÉTICO

CAMPINAS

2025

GUSTAVO MANZANARES

**PAPEL DO SEGUNDO MENSAGEIRO DE CÁLCIO DERIVADO DE
NAD⁺, cADPR, NA REGULAÇÃO DO CÁLCIO, GERAÇÃO DE FORÇA
E RESISTÊNCIA À FADIGA DE FIBRAS ISOLADAS DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
mestre em Biologia Molecular e
Morfofuncional na área de bioquímica.*

Orientador: PAULO GUIMARÃES GANDRA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELO ALUNO GUSTAVO MANZANARES E
ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO
GUIMARÃES GANDRA.

CAMPINAS

2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M319p Manzanares, Gustavo, 1996-
Papel do segundo mensageiro de cálcio derivado de NAD^+ , cADPR, na regulação do cálcio, geração de força e resistência à fadiga de fibras isoladas do músculo esquelético / Gustavo Manzanares. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Paulo Guimarães Gandra.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. ADP-ribose cíclica. 2. Fadiga. 3. Força muscular. 4. Músculo esquelético. 5. Fibras musculares esqueléticas. I. Gandra, Paulo Guimarães, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Role of cADPR, NAD^+ derived calcium second messenger, in the regulation of calcium, force generation and fatigue resistance in the skeletal muscle

Palavras-chave em inglês:

Cyclic ADP-ribose

Fatigue

Muscle strength

Skeletal muscle

Muscle fibers, Skeletal

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Paulo Guimarães Gandra [Orientador]

Ligia de Moraes Antunes Correa

Elaine Minatel

Data de defesa: 21-02-2025

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Não se aplica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8850-7396>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1514803206754785>

Prof. Dr. Paulo Guimarães Gandra

Profa. Dra. Elaine Minatel

Profa. Dra. Lúgia de Moraes Antunes Corrêa

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de **Dissertação/Tese** e na Secretaria do Programa da Unidade.

PARA MEUS AVÔS, JUAN DELACRUZ
MANZANARES E LÁZARO APARECIDO
DOS SANTOS, POR ME APRESENTAREM
O MUNDO E PELO DOM DA
CURIOSIDADE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a instituição UNICAMP, no momento de escrita dessa dissertação estou indo para meu 12º ano como aluno dessa universidade. Ter oportunidade de ter estudado em uma universidade gratuita e com ensino de qualidade é uma grande honra em minha vida.

Agradeço a minha família, principalmente meus pais, Luciana, Luciano, Juan, Viviana e Selma. Por todo apoio independente do dia e momento. As minhas irmãs, por me tirarem da rotina em cada encontro, por me fazerem lembrar do início da minha jornada de estudos. Meus avós, Juan e Rose, por demonstrarem proatividade em cada segundo de minha vida.

Agradeço a minha companheira nesses anos de mestrado, Larissa Kaori. Por toda parceria, perrengues, risadas, broncas, conselhos e por todo amor demonstrado durante esses anos de namoro. Sem você esse trabalho seria bem pior.

Agradeço a meus amigos de longa data Fernando, Sérgio, Felipe e João, pelas conversas, discussões, risadas e por sempre estarem dispostos a nossa amizade continuar.

A equipe do LabMusc. Paulo, Guilherme e Erika. Mas a todos os outros ICs, PADs que por ali passaram. O conhecimento compartilhado é o que sempre irá fazer a diferença.

Aos Professores do programa de Biologia Molecular e Morfofuncional. Pelo desafio de se aprofundar nessa área tão apaixonante.

Aos funcionários do departamento de bioquímica e biologia tecidual e do instituto de biologia. Técnicos, faxineiros, secretaria, apoio ao estudante, sem vocês tudo se tornaria mais complicado e desorganizado, obrigado por moverem essa engrenagem.

Por fim agradecer ao LabNECC – Laboratório Nacional para Estudos do Cálcio Celular, pela disponibilidade do espaço e equipamentos que fizeram este trabalho ser possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Bolsa nº 88887.675237/2022-00.

RESUMO

O cálcio é essencial para acoplamento dos processos de excitação e contração da fibra muscular esquelética. O entendimento dos mecanismos que regulam a concentração de cálcio livre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) durante a contração é fundamental para compreender como a função do músculo esquelético pode estar alterada em diferentes condições fisiológicas e patológicas. Segundos mensageiros de Ca^{2+} derivados de NAD^+ , como a adenosina difosfato ribose cíclico (cADPR) podem regular a concentração de $[Ca^{2+}]_i$ em diferentes tipos células. Existem evidências que a produção de cADPR está aumentada durante a estimulação do músculo e que este segundo mensageiro pode aumentar a liberação de Ca^{2+} através do canal de rianodina e aumentar a atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático. Todavia o papel do cADPR endógeno na regulação da $[Ca^{2+}]_i$ e da função contrátil do músculo esquelético durante o desenvolvimento e a recuperação da fadiga ainda não é claro. Para testar o papel do cADPR na resistência a fadiga e na recuperação da geração de força após a fadiga, o $[Ca^{2+}]_i$ e a geração de força foram analisadas em fibras únicas isoladas intactas tratadas com um antagonista de cADPR, 8-Br-cADPR. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com o antagonista de cADPR não alterou a força pico durante estimulações em frequências submáximas e máximas (1, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 e 120 Hz) assim como a $[Ca^{2+}]_i$ representada pela fluorescência de INDO-1 (marcador de íons Ca^{2+}). Também não foram observadas alterações na resistência à fadiga e na recuperação da geração de força após a fadiga (30 minutos). Esses resultados sugerem que o cADPR, endógeno não apresenta um papel significativo na função contrátil do músculo esquelético. Conseqüentemente, alterações nos níveis endógenos de cADPR, que podem ocorrer em condições como o envelhecimento ou em algumas doenças crônicas, assim como em tratamentos que visam manter os níveis de NAD^+ , precursor de cADPR, não teriam maiores efeitos sobre a função muscular.

ABSTRACT

Calcium plays a central role in the excitation-contraction coupling process in skeletal muscle fibers. Understanding the mechanisms that regulate intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) during contraction is essential for elucidating how skeletal muscle function may be altered in different physiological and pathological conditions. Calcium mobilizing second messengers derived from NAD^+ , such as cyclic adenosine diphosphate ribose (cADPR), can regulate $[Ca^{2+}]_i$ in various cells types. There is evidence that cADPR production increases during muscle stimulation, and that cADPR can enhance Ca^{2+} release through the ryanodine receptor channel and increase the activity of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. However, the role of endogenous cADPR in regulating $[Ca^{2+}]_i$ and skeletal muscle contractile function during development and recovery from fatigue remains unclear. To investigate the role of cADPR in fatigue resistance and recovery of force generation following fatigue, $[Ca^{2+}]_i$ and force generation were analyzed in intact isolated single fibers treated with the cADPR antagonist, 8-Br-cADPR. The results indicate that treatment with the cADPR antagonist did not alter force generation or $[Ca^{2+}]_i$ during either submaximal or maximal stimulation. No changes were observed in fatigue resistance or in the recovery of force generation after fatigue. These findings suggest that endogenous cADPR does not play a significant role in skeletal muscle contractile function. Consequently, alterations in endogenous cADPR levels, whether due to pathophysiological conditions or pharmacological treatments, are unlikely to significantly impact skeletal muscle function.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHPR - Receptores de Dihidropiridina

RyR - Receptores de Rianodina

RS - Retículo Sarcoplasmático

RyR1 - Receptor de Rianodina isoforma 1

Ca²⁺ - Íons cálcio

[Ca²⁺]_i - Concentração de cálcio livre intracelular

SERCA - ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático

ATPase - Enzima adenosinatrifosfatase

ATP - Adenosinatrifosfato

ADP - Adenosinadifosfato

AMP - Adenosinamonofosfato

Pi - Fosfato inorgânico

PLFFD - Depressão prolongada da força em baixa frequência (*Prolonged low-frequency force depression*)

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

cADPR - Adenosina difosfato ribose cíclica

ADPR - Adenosina difosfato ribose

CD38 - ADP-ribose ciclase/ ADP-ribose cíclico hidrolase

SIRT 6 - Sirtuína 6

FK506 - Tracolimo

FKBPs – Proteínas de ligação FK506

FKBP12 – Proteínas de ligação FK506 com 12 kDa

FKBP12.6 - Proteínas de ligação FK506 isoforma

C57BL/6J - Camundongo C57 black 6

NaCl - Cloreto de cálcio

KCl - Cloreto de potássio

CaCl₂.H₂O - Cloreto de cálcio dihidratado

MgCl₂.6H₂O - Cloreto de magnésio hexahidratado

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NaH₂PO₄ - Fosfato monosódico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

O₂ - Gás oxigênio

CO₂ - Gás dióxido de carbono

AM - Acetoxi-metil

FF - Força e frequência

Hz - Hertz

FAT – Fadiga

L₀ – Comprimento ideal da fibra muscular ou comprimento onde ocorre maior geração de força durante a contração.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	O processo de contração do músculo estriado esquelético.....	12
1.2.	O papel do cálcio durante o desenvolvimento de fadiga	13
1.3.	Segundos mensageiros de Ca^{2+} derivados de NAD^+	15
1.4.	Regulação da $[Ca^{2+}]_i$ pelo cADPR em fibras do músculo esquelético.....	16
2.	HIPÓTESE	19
3.	OBJETIVOS	20
4.	MÉTODOS	21
4.1.	Considerações éticas	21
4.2.	Animais.....	21
4.3.	Fibras Únicas Isoladas	21
4.4.	Análise da Força e da $[Ca^{2+}]_i$	23
4.5.	Protocolos experimentais	24
4.5.1.	Comprimento ideal (L_0)	24
4.5.2.	<i>Curva Força-Frequência</i>	24
4.5.3.	<i>Fadiga</i>	25
4.5.4.	<i>Recuperação pós fadiga</i>	25
4.6.	Desenho experimental.....	26
4.7.	Estatística e tratamento dos dados	26
5.	RESULTADOS	28
5.1.	O efeito do tempo sobre a F_{pico} e $[Ca^{2+}]_i$ em diferentes frequências de estimulação	28
5.2.	O efeito do tratamento com antagonista de cADPR na F_{pico} em diferentes frequências de estimulação.....	29
5.3.	Tratamento com o antagonista 8-Br-cADPR ao longo de um protocolo de fadiga 30	
5.4.	Recuperação da força e da $[Ca^{2+}]_i$ após desenvolvimento de fadiga	30
6.	DISCUSSÃO	32
7.	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
	ANEXOS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1. O processo de contração do músculo estriado esquelético

Os mecanismos celulares envolvidos na contração do músculo esquelético se iniciam com a chegada do estímulo proveniente do sistema nervoso através da junção neuromuscular. Esse estímulo gera em um potencial de ação (excitação) que percorre todo o sarcolema da célula. A excitação adentra no interior da fibra muscular através dos túbulos T, que são invaginações da membrana celular. Nessas invaginações se encontram na região das tríades os receptores de dihidropiridina (DHPR) dependentes de voltagem. Estes receptores estão diretamente conectados aos receptores de rianodina tipo 1 (RYR1) no interior da fibra muscular, que atuam como canais de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) (GONG; YAN; LEDFORD, 2021; ROSSI; DIRKSEN, 2006). Com a propagação do potencial de ação, ocorrem mudanças na conformação do DHPR o qual vai interferir no estado do RyR1, ocasionando a abertura dos canais de cálcio e na liberação de íons Ca^{2+} armazenados no RS. O extravasamento desses íons ao citosol aumenta a concentração de Ca^{2+} livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) na fibra muscular esquelética.

O aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é essencial para a contração muscular, uma vez que a maior liberação de cálcio do RS aumenta a ligação de íons Ca^{2+} à troponina C. A interação do Ca^{2+} com a troponina C promove a mudança da conformação espacial da tropomiosina e expõe o sítio de ligação da actina e permitindo a sua ligação com a miosina. Somente com a exposição dos sítios de ligação na actina é possível o estabelecimento de uma ligação forte entre os filamentos grossos e finos, permitindo a ocorrência do ciclo das pontes cruzadas, que proporcionará o encurtamento do sarcômero e a geração de força (CHENG; PLACE; WESTERBLAD, 2018). O relaxamento do músculo esquelético acontece com o término do estímulo, a diminuição do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e o recobrimento do sítio de ligação da actina pela tropomiosina impedindo a formação de novas pontes cruzadas. Na fibra muscular esquelética, a diminuição do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocorre principalmente pelo bombeamento do Ca^{2+} de volta ao RS através da ATPase de cálcio do retículo sarco/endoplasmático (SERCA). A SERCA é a proteína mais abundante na membrana do RS e no músculo esquelético podemos encontrar 3 isoformas da

SERCA. A SERCA-1 é mais abundante em fibras tipo 2 (rápidas ou glicolíticas), enquanto a SERCA-2 é mais abundante em fibras do tipo 1 (lentas ou oxidativas) (XU; VAN REMMEN, 2021).

Alterações na liberação de Ca^{2+} do RS, na atividade da SERCA, ou da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} podem afetar a geração de força, e o desenvolvimento de fadiga. Dessa forma, estudar diferentes mecanismos que regulam estes processos apresenta um grande potencial para a identificação de novas intervenções terapêuticas, além de aprofundar o conhecimento sobre a regulação da função do músculo esquelético.

1.2. O papel do cálcio durante o desenvolvimento de fadiga

O desenvolvimento de fadiga na fibra muscular esquelética pode limitar a nossa tolerância ao exercício. Tanto fatores centrais (sistema nervoso), tanto fatores periféricos (mecanismos celulares) podem ser determinantes para o desenvolvimento de fadiga (TORNERO-AGUILERA et al., 2022). Porém, é interessante a visão de que a fadiga pode funcionar como um mecanismo de proteção celular como sugerido por alguns autores (CHENG; PLACE; WESTERBLAD, 2018). O não desenvolvimento da fadiga durante períodos longos de contrações muito intensas, poderia levar a fibra muscular esquelética ao colapso energético, por exemplo, e por consequência a sua morte (ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; TSARBOU et al., 2021).

Os principais mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento da fadiga em fibras musculares esqueléticas durante períodos de contrações máximas repetidas incluem: diminuição da capacidade de geração de força pelos miofilamentos, diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} e diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante a estimulação. Essas alterações podem ser atribuídas a fatores como: o aumento da concentração dos produtos da hidrólise de ATP (ADP, AMP e principalmente Pi e H^+), a depleção das reservas de glicogênio e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (CHENG; PLACE; WESTERBLAD, 2018; ØRTENBLAD et al., 2011; SUNDBERG; FITTS, 2019).

Quando fibras musculares intactas isoladas são estimuladas de maneira máxima repetidamente, observa-se um pequeno declínio na geração de força logo nas primeiras contrações. Interessantemente, durante essas contrações iniciais a

$[Ca^{2+}]_i$ tende a aumentar. Esse declínio inicial da geração de força se deve à uma diminuição da capacidade dos miofilamentos gerarem força e à redução da sensibilidade miofibrilar aos íons Ca^{2+} (CHENG; PLACE; WESTERBLAD, 2018). Já na fase final deste tipo de protocolo de fadiga, a diminuição da geração de força se deve ao aumento excessivo de Pi no meio intracelular que pode afetar a $[Ca^{2+}]_{tetânica}$ de duas maneiras: 1) o Pi pode diminuir a ativação de RYR1; 2) o aumento da [Pi] faz com que ele adentre no RS através de canais de cloreto, se ligando ao cálcio no interior do retículo e o precipitando, diminuindo assim o cálcio disponível para liberação durante a estimulação (CHENG; PLACE; WESTERBLAD, 2018; LAVER; LENZ; DULHUNTY, 2001).

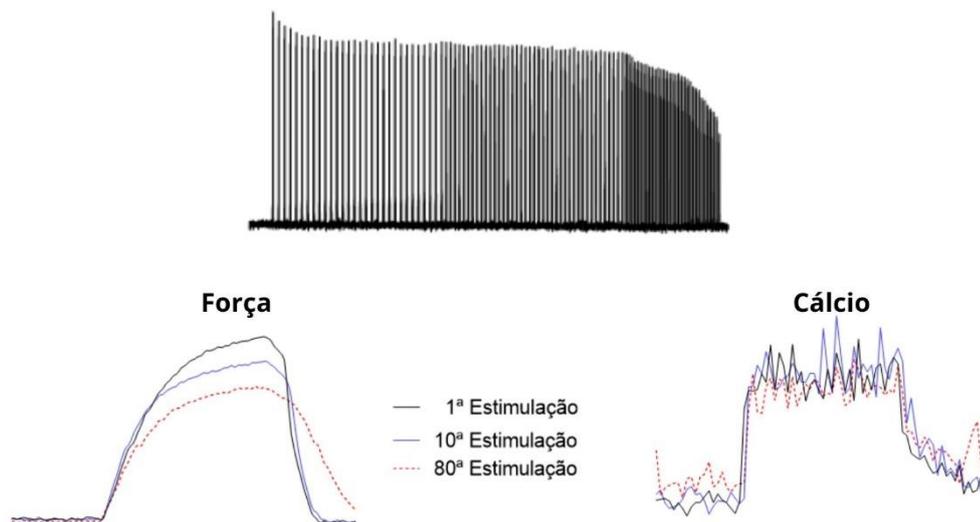


Figura 1. Variação da força e razão de INDO-1 durante um protocolo de fadiga. Exemplo do desenvolvimento fadiga em uma fibra isolada intacta de camundongo. O protocolo de estimulação utilizou de estimulações seguidas máximas. A variação da geração da força e do $[Ca^{2+}]_i$ (razão da fluorescência de indo-1) entre a primeira contração, décima e octogésima estimulação estão ilustradas.

A diminuição da geração de força após contrações máximas repetidas é observada ainda pós um período de descanso. Este fenômeno é mais significativo durante estimulações de baixa frequência sendo chamado de diminuição prolongada da força em baixa frequência (*prolonged low frequency force depression* - PLFFD) (RICHARDS et al., 2024). A PLFFD é observada tanto em modelos experimentais com fibras únicas isoladas quanto em músculos *in vivo* (CHAILLOU; CHENG, 2019). As principais causas que levam ao desenvolvimento da (PLFFD) são a diminuição da liberação de cálcio do RS e da sensibilidade dos miofilamentos aos íons Ca^{2+} (CHAILLOU; CHENG, 2019). Uma vez que, a maioria

das atividades do nosso dia-dia acontecem em frequências de estimulações submáximas (JONES, 1996), o estudo da PLFFD é bastante relevante para situações em que a função do músculo está diminuída e associada a baixa tolerância ao exercício.

1.3. Segundos mensageiros de Ca^{2+} derivados de NAD^+

Os segundos mensageiros de cálcio derivados de NAD^+ , cADPR (adenosina difosfato ribose cíclico) e ADPR (adenosina difosfato ribose) começaram a ser estudados na década de 80. Primeiramente descritos em ovos de ouriço do mar, onde o NAD^+ era lentamente convertido em um nucleotídeo liberador de cálcio (D'ERRICO et al., 2018). Anos mais tarde foi descoberto que esse composto derivado de NAD^+ capaz de regular o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ era o cADPR, segundo mensageiro de cálcio que este trabalho foca como objeto de estudo (DOUSA; CHINI; BEERS, 1996).

Existem evidências de que a formação de cADPR pode aumentar durante

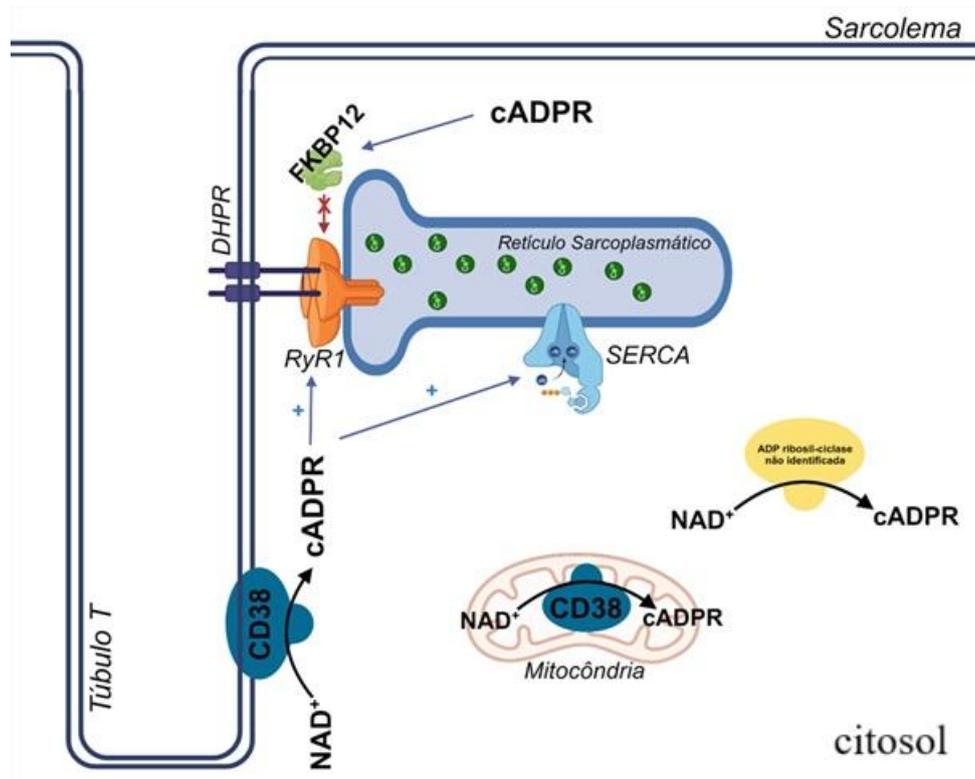


Figura 2. O Segundo mensageiro de cálcio cADPR. Possíveis mecanismos de formação do cADPR e possíveis locais de atuação e regulação deste segundo mensageiro de cálcio na fibra muscular esquelética. Fonte: Produção do autor através do software BioRender.

estimulação elétrica de fibras isoladas e no músculo durante o exercício (PARK et al., 2015, 2018). Todavia os mecanismos de formação dos segundos mensageiros

de cálcio derivados de NAD^+ no músculo esquelético ainda não são bem definidos. A enzima multifuncional CD38 é apontada como um dos principais catalisadores da síntese de cADPR a partir do NAD^+ (CHINI et al., 2018; DOUSA; CHINI; BEERS, 1996; PARK et al., 2018). Através da sua atividade ciclase a enzima produz o cADPR, e com sua atividade hidrolase a enzima é capaz de produzir também o ADPR, em ambos os casos tendo como produto também a nicotinamida (NAM) (CHINI et al., 2018). Entretanto, em um estudo com animais CD38-knockout, ainda foi observada a formação de cADPR no músculo esquelético após 15 minutos de exercício forçado em esteira, sugerindo que outra enzima ADP-ribosil ciclase também pode ser responsável por sintetizar cADPR no músculo esquelético durante o exercício (PARK et al., 2018).

Já o ADPR também pode ser formado pela sirtuína-6 (SIRT6), uma enzima deacetilase que também catalisa reações de ribosilação de ADPR. Em células pancreáticas a SIRT6 foi demonstrada regular a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de maneira dependente da formação de ADPR, porém o seu papel na formação de ADPR no músculo ainda não foi estudado (BAUER et al., 2012; SONG et al., 2016).

Apesar dos mecanismos de formação desses segundos mensageiros de Ca^{2+} derivados de NAD^+ durante a contração do músculo esquelético não estarem totalmente claros, o aumento de suas formações durante a estimulação sugere que eles podem ser importantes para regulação da função contrátil do músculo, a durante e após um período de contrações/estimulações seguidas que desenvolvem fadiga na fibra do músculo esquelético.

1.4. Regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pelo cADPR em fibras do músculo esquelético

O cADPR foi mostrado aumentar o transiente da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante a estimulação elétrica de fibras isoladas (PARK et al., 2018). Todavia o exato mecanismo de ação deste segundo mensageiro no músculo esquelético ainda não é claro. Alguns estudos indicam que o cADPR pode aumentar a liberação de cálcio se ligando diretamente ao receptor de rianodina do canal de cálcio do RS da fibra muscular esquelética - RYR1 (PARK et al., 2018; YAMAGUCHI; KASAI, 1997). A ligação direta do cADPR ocorreria através dos sítios de ligação de nucleotídeos de

adenina dos canais RYRs. Porém, em condições fisiológicas, esse efeito pode não ser significativo devido à presença de altas concentrações de competidores por esses sítios de ligação a nucleotídeos como o ADP e ATP (VENTURI et al., 2012).

É sugerido também que o cADPR interaja com proteínas ligantes do RYR como as proteínas de ligação à FK506 (FKBPs) (KOLOS et al., 2018). A FKBP12, ou calstabilina-1, é a isoforma que interage com o RYR1, regulando a sua abertura na fibra muscular esquelética, enquanto a isoforma FKBP12.6 parece regular o RYR2 no músculo cardíaco (KOLOS et al., 2018). Porém, é provável que a FKBP12.6 também possa interagir com o RYR1 (VENTURI et al., 2014). O cADPR pode se ligar a FKBP12 e FKBP12.6 resultando na sua dissociação do RYRs e com isso aumentar o vazamento de Ca^{2+} por este canal (WANG et al., 2004). Existem uma série de estudos mostrando que a FKBP12 interage com o RYR1 e estabiliza esse canal na forma fechada no músculo esquelético (GONANO; JONES, 2017; IVARSSON et al., 2019). Interessantemente o exercício intenso pode resultar em modificações pós-transducionais da FKBP12 ou calstabilina 1 e na sua dissociação do RYR1 aumentando o vazamento de Ca^{2+} do RS após o exercício ou estimulação intensa (IVARSSON et al., 2019). Porém, ainda não se sabe se o cADPR é importante para regular a calstabilina-1 no músculo esquelético durante ou após um período de contrações intensas. Ainda, a regulação do RYR1 pela FKBP12 e FKBP12.6 no músculo esquelético é controversa. Enquanto alguns estudos indicam que a FKBP12 regula abertura do RYR1 outros já indicam um controle no estado fechado, assim como outros estudos demonstram que o FKBP12 teria a uma função tanto em estados abertos e fechados do RYR1 (GONANO; JONES, 2017; WITHERSPOON; MEILLEUR, 2016).

O cADPR também pode controlar a $[Ca^{2+}]_i$ no músculo esquelético através da regulação da atividade da SERCA. Recentemente foi mostrado que o cADPR se liga à SERCA no músculo esquelético aumentando sua atividade durante o relaxamento muscular (PARK et al., 2018). observado que o exercício aumenta a expressão de CD38 em células isoladas do gastrocnêmio de camundongos que realizaram exercício em esteira, isso se sustenta até 6 horas após o exercício e por consequência aumento nas concentrações de cADPR. Esse aumento na concentração de cADPR ativa a SERCA, promovendo uma maior captação de Ca^{2+} de volta ao RS. Este aumento da captação do cálcio pelo RS mantém sua disponibilidade para liberação do RS durante a estimulação, contribuindo para a

capacidade de geração de força do músculo esquelético. Outro estudo observou que o cADPR é importante para regular a captação de glicose no músculo induzida pela estimulação elétrica de maneira dependente ao aumento dos níveis de $[Ca^{2+}]_i$ (PARK et al., 2015). Apesar de haver evidências de que o cADPR pode regular o $[Ca^{2+}]_i$ no músculo esquelético, ainda não se sabe qual é a importância desse segundo mensageiro na regulação da $[Ca^{2+}]_i$ e a geração de força durante o desenvolvimento de fadiga e para capacidade de geração de força durante a recuperação pós-fadiga.

2. HIPÓTESE

A hipótese central deste trabalho é que o segundo mensageiro de cálcio derivado de NAD, cADPR é importante para a regulação da $[Ca^{2+}]_i$, para geração de força, resistência a fadiga e na recuperação pós fadiga em fibras musculares esqueléticas.

3. OBJETIVOS

Definir a importância do segundo mensageiro de Ca^{2+} , cADPR, no processo de excitação contração, na resistência à fadiga e recuperação da função contrátil após fadiga do músculo esquelético.

Objetivos específicos

- Definir o efeito do tratamento com antagonista de cADPR na geração de força e resistência à fadiga de fibras únicas isoladas e intactas.
- Definir o efeito do tratamento com antagonista de cADPR na dinâmica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em fibras únicas isoladas e intactas.
- Definir o efeito do tratamento com antagonista de cADPR na recuperação da geração de força e na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ após a fadiga.

4. MÉTODOS

4.1. Considerações éticas

Todos os experimentos foram realizados no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB-UNICAMP) de acordo com as exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimento animal (CONCEA) e Comitê de Ética e Utilização Animal da UNICAMP (CEUA-UNICAMP). Os experimentos foram aprovados pelo CEUA-UNICAMP, com o número (5998-1/2022) (anexo 1).

4.2. Animais

Camundongos C57BL/6J machos foram mantidos em biotério controlado com ciclo claro/escuro (12/12 h), com temperatura e fluxo de ar controlados (~23 °C). Com acesso água e comida 24 h. Os camundongos foram sacrificados por overdose de anestésicos (combinação de ketamina e xilazina) com 10-12 semanas de vida.

4.3. Fibras Únicas Isoladas

O músculo *flexor digitorum brevis* (FDB) foi dissecado imediatamente após sacrifício dos camundongos. Possuindo a constituição aproximadamente de 44% de fibras Ila, 52% de fibras IIx e apenas 4% fibras do tipo I (TARPEY et al., 2018). Estas fibras únicas e intactas do músculo FDB foram dissecadas utilizando microtesouras e micropiças em solução de dissecção de Tyrode (136 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂.2H₂O, 0,5 mM MgCl₂.6H₂O, 0,4 mM NaH₂PO₄, 11,9 mM NaHCO₃ e 5,5 mM glicose) (CHENG; WESTERBLAD, 2017). A dissecção das fibras foi feita utilizando um microscópio stereozom com campo claro/escuro e aumento de até 80x. A dissecção mecânica é realizada mantendo os tendões intactos. Em seguida clipes de folha de alumínio em formato de T foram presos em cada tendão da fibra isolada. A célula com os clipes foi montada em uma câmara experimental (modelo N°. 801C, Aurora Scientific Inc., Aurora, ON, Canadá) (Fig. 3) estando com um dos clipes presos a um transdutor de força (modelo N°. 403B, Aurora Scientific Inc) e outro clipe preso a um braço móvel (YOUHANNA et al., 2023). Nesta câmara a fibra é mantida em um banho de 400 µl com um fundo de

vidro adequado para microscopia de fluorescência e posicionada entre dois eletrodos de platina utilizados para estimulação dela. Esse aparato conta com um sistema de perfusão e de controle de temperatura. A fibra foi constantemente banhada com solução de Tyrode de perfusão (121 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,4 mM NaH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 5,5 mM glucose e 0,1 mM EDTA). A solução de perfusão foi borbulhada com mistura de gás 95% O₂ e 5% CO₂. A obtenção de fibras isoladas por dissecação mecânica permite a manter os tendões conectados à fibra, os quais podem ser acoplados à um transdutor de força. Esse modelo possibilita a medição simultânea da força gerada e de parâmetros

intracelulares, como a [Ca²⁺]_i, em tempo real, por microscopia de fluorescência. Embora seja possível o uso de fibras isoladas por digestão enzimática para a análise da função contrátil através da medida do encurtamento do sarcômero, sua aplicação em protocolos

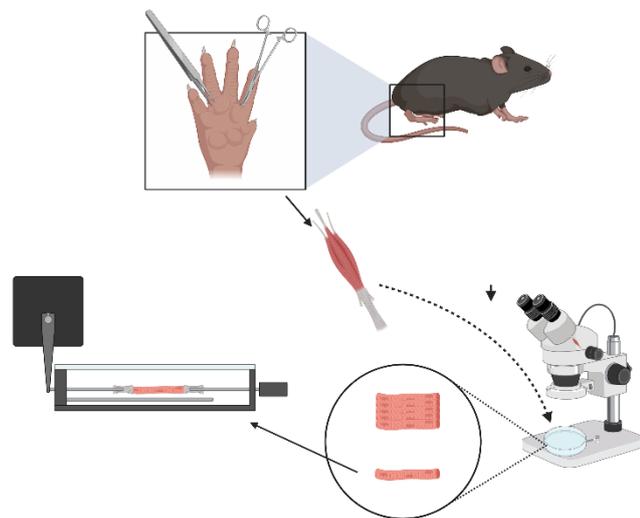


Figura 3. Obtenção de fibras isoladas únicas. Instrumentação e dissecação para obtenção de uma única fibra muscular, desde a retirada do músculo da pata traseira do camundongo C57BL/6J até a preparação de uma única fibra isolada intacta na câmara experimental. Produção do autor através do software BioRender.

de estimulações repetidas máximas, que induzem a fadiga, apresenta limitações. Nessa preparação, as fibras deve ser aderidas a uma superfície de vidro, o que frequentemente impede seu retorno ao comprimento inicial após contrações sucessivas, comprometendo a avaliação da função contrátil ao longo do desenvolvimento da fadiga.

4.4. Análise da Força e da $[Ca^{2+}]_i$

As medidas de força e $[Ca^{2+}]_i$ foram realizadas simultaneamente durante a estimulação das fibras. Para as medidas de força foi utilizado um transdutor de força sendo adquiridas utilizando o software 615-A, Aurora scientific Inc. Para análise da $[Ca^{2+}]_i$ foi utilizado o marcador fluorescente de Ca^{2+} INDO-1 AM (*Invitrogen / molecular probes, Life Technologies*). As fibras isoladas foram incubadas com solução de Tyrode contendo INDO-1 AM (10 μ M) e ácido plurônico 0,1% (Pluronic F-127, Sigma) por 1 hora em temperatura ambiente seguido de 20 minutos de lavagem com solução de Tyrode de perfusão contendo 0,2% FBS. O INDO-1 é excitado em 350 nm e emite fluorescência em dois comprimentos de onda (405 nm quando livre de Ca^{2+} e 495 nm quando ligado ao íon Ca^{2+}). Para leitura de fluorescência o aparato contendo a célula isolada foi posicionado no estágio um microscópio de fluorescência invertido com um sistema de fotometria que inclui um monocromador (fonte de luz), filtros e fotomultiplicadores (PMT) para detecção dos sinais de fluorescência. Foi utilizado o sistema RatioMaster de um

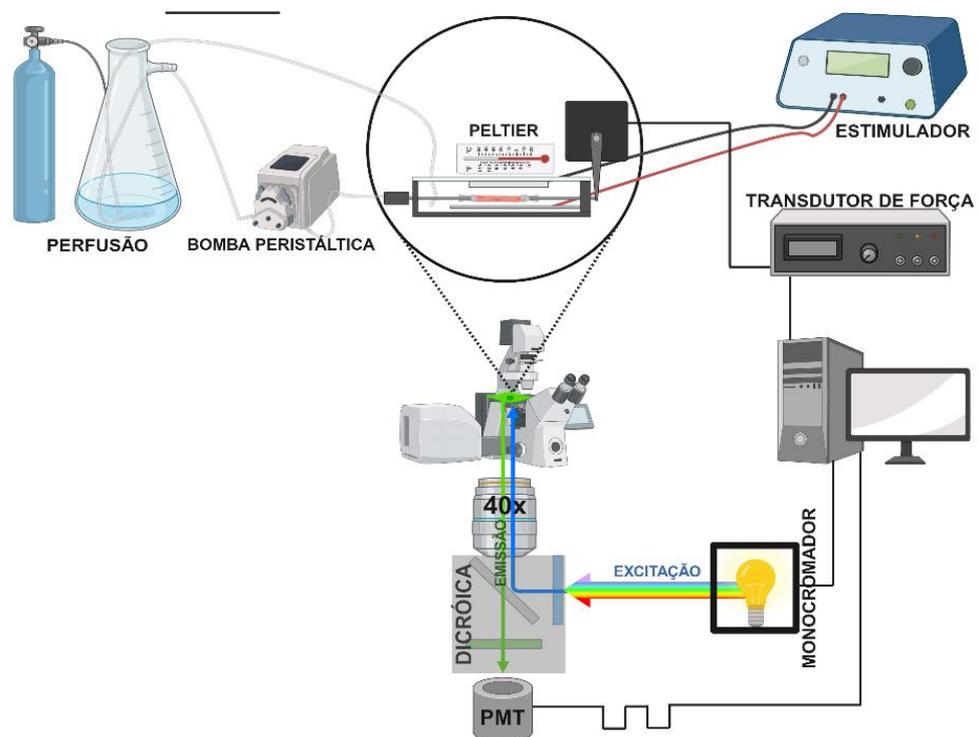


Figura 4. Sistema de estudo de fibra isoladas. Setup dos equipamentos utilizados para estudo de força e razão de INDO-1 ($[Ca^{2+}]_i$) durante a estimulação da fibra isolada de músculo esquelético. Produção do autor através do Software BioRender.

laboratório satélite do LABNECC (Laboratório Nacional de Estudos do Cálcio Celular, localizado no IB – UNICAMP). Os resultados foram obtidos através do software PTI FelixGx (Horiba) (Fig. 4).

O pico de força gerada (F_{pico} em mN) foi determinado pelo software 611A-Dynamic Muscle Analysis (DMA, Aurora Scientific). Já as alterações na $[Ca^{2+}]_i$ foram estimadas através da razão entre as emissões de fluorescência de INDO-1 da fibra excitada (495/405 nm), média dos 100 ms finais da estimulação da fibra (350 ms).

4.5. Protocolos experimentais

4.5.1. Comprimento ideal (L_0)

Antes de qualquer análise foi determinado o comprimento ideal da célula que resulta na maior geração de força pela fibra (L_0). O L_0 foi determinado estimulando a fibra com trens de 40 Hz (duração do trem de 350 ms, duração do pulso de 0,5 ms e 8 V) com 1 minuto de intervalo entre cada estimulação. Além disso foi medido o diâmetro da fibra, para o cálculo da área transversal, desta forma é calculado a tensão máxima (kPa) através da força gerada no L_0 em 100 Hz, fibras com tensões muito baixas foram descartadas do estudo (fibras gerando força máxima durante estimulação a 100 Hz abaixo de 250 kPa não foram utilizadas para análise). Nossas fibras deram em média 425.87 ± 23.54 .

4.5.2. Curva Força-Frequência

Após a definição do L_0 foi realizado um protocolo de estimulação para obtenção de uma curva de força-frequência (FF). Para obtenção da curva FF as células foram estimuladas a 8 V, com duração do trem de 350 ms, duração do pulso de 0,5 ms e frequências de estimulação de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100 e 120 Hz respectivamente a cada 1 minuto. Para definir o papel do cADPR, fibras isoladas foram incubadas com um antagonista de cADPR por 30 min. Para garantir que esse período de incubação por si só, não influenciasse a geração de força, foi necessário realizar uma análise controle. Para isso, após 30 minutos de repouso

em solução de Tyrode, algumas fibras foram estimuladas novamente para obtenção de uma segunda curva FF (FF2), com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de repouso na geração de força. Logo após a obtenção das curvas FF as células do grupo tratado foram incubadas com o antagonista de cADPR, o 8-Br-cADPR (20 μ M - Cayman-Chem) por 30 minutos. Após esse período de incubação uma nova curva FF foi obtida. As células do grupo controle foram incubadas com veículo (solução de Tyrode) e submetidas ao mesmo protocolo de estimulação que as fibras tratadas.

4.5.3. *Fadiga*

Após um intervalo de 20 minutos do último protocolo de FF, as fibras isoladas foram submetidas a um protocolo de fadiga (FAT). Neste protocolo as fibras foram estimuladas com trens de 350 ms de duração, 0.5 ms de duração de pulso e frequência de 100 Hz (contração máxima). A estimulação foi realizada inicialmente uma vez a cada 4 s durante 2 minutos, seguido de 2 minutos sendo estimuladas uma vez cada 3 segundos, seguido de 2 minutos realizando uma contração a cada 2 segundos e outro período realizando uma contração a cada 1 segundo (CHENG; WESTERBLAD, 2017). O protocolo foi interrompido quando a força pico (F_{pico}) gerada era igual a ~50% do valor da força pico da primeira contração inicial, sendo este momento definido como ponto de fadiga (CHENG; WESTERBLAD, 2017).

4.5.4. *Recuperação pós fadiga*

Para estudar a diminuição duradoura da geração de força em baixas frequências induzida pela fadiga (PLFFD) as células foram novamente estimuladas 30 minutos após o término do protocolo de fadiga, para obter uma curva FF (CHENG et al., 2015).

4.6. Desenho experimental

As fibras foram separadas em dois grupos, Não Tratado e 8-Br-cADPR (tratado com antagonista de cADPR). Ambos os grupos passaram pela Sequência L₀ → FF1_{controle} → FF2_{controle/tratado} → Fadiga → FF3 (PLFFD). Sendo que no grupo 8-Br-cADPR entre a FF1 e a FF2 foi realizado o tratamento com o antagonista de cADPR no intervalo de 30 minutos. L₀ → FF1_{controle} → FF2_{controle} → FF3_{tratado} → Fadiga → PLFFD. Esses resultados de FF1_{controle} X FF2_{controle} foram colocados juntos dos resultados controle do grupo não tratado.

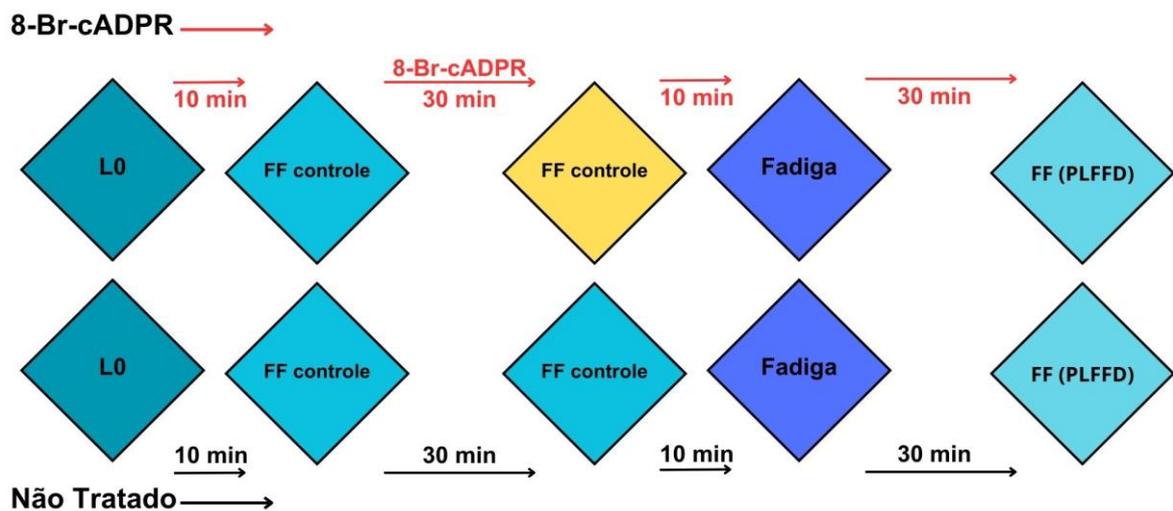


Figura 5. Desenho experimental. Sequência de etapas seguidas em cada um dos grupos que as fibras isoladas foram colocadas

4.7. Estatística e tratamento dos dados

Os valores estão apresentados com média \pm erro padrão. Foram utilizados teste-t ou two-way ANOVA (pareado e não pareado) seguido de pós-teste de Sidaks para determinar a existência de diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos (Controle, 8-Br-cADPR). Todas as análises foram feitas utilizando o software Graphpadprism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, Ca, USA) e um valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo.

Para a força e frequência as análises foram feitas com a média do valor dos 100 ms finais da F_{pico} (mN) e normalizando os valores em % ($F_{\text{pico}} \text{ xHz} / F_{\text{pico}} \text{ 100Hz} * 100$) e ($F_{\text{pico}} \text{ pós-tratamento} / F_{\text{pico}} \text{ pré-tratamento} * 100$). Para as medidas de fluorescência, foram analisados os 100 ms finais de cada estimulação comparando o momento

pós e pré-tratamento com 8-Br-cADPR em % da mesma forma como da força. Para a fadiga foi analisado a média de tempo e do número de estimulações entre as fibras não tratadas versus fibras tratadas com 8-Br-cADPR. E para o pós-fadiga foi feita análise apenas de estimulações em 30, 50 e 100 Hz comparando a força gerada e o sinal de fluorescência de INDO-1 da mesma fibra, antes e 30 minutos após o protocolo de fadiga.

5. RESULTADOS

5.1. O efeito do tempo sobre a F_{pico} e $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em diferentes frequências de estimulação

Devido ao tempo de tratamento com antagonista ser de 30 minutos, foi necessário testar o efeito deste tempo de incubação sobre a capacidade de gerar força das fibras, para distinguir se as possíveis alterações na força e na dinâmica de cálcio seriam causadas pelo tempo ou pelo tratamento com o antagonista.

Em frequências submáximas e máximas (1 a 120Hz) não foram notadas diferenças na força gerada após um período de 30 minutos de repouso simulando o período de incubação com o antagonista (F_{pico} absoluta em mN e força relativa a força em 100 Hz em porcentagem ($n = 11$) (Fig 6). Não foram observados nas medidas de fluorescência de INDO-1 (marcador de Ca^{2+}) diferenças significativas entre as duas $\text{FF}_{\text{controle}}$ ($n = 7$) (Fig 7.).

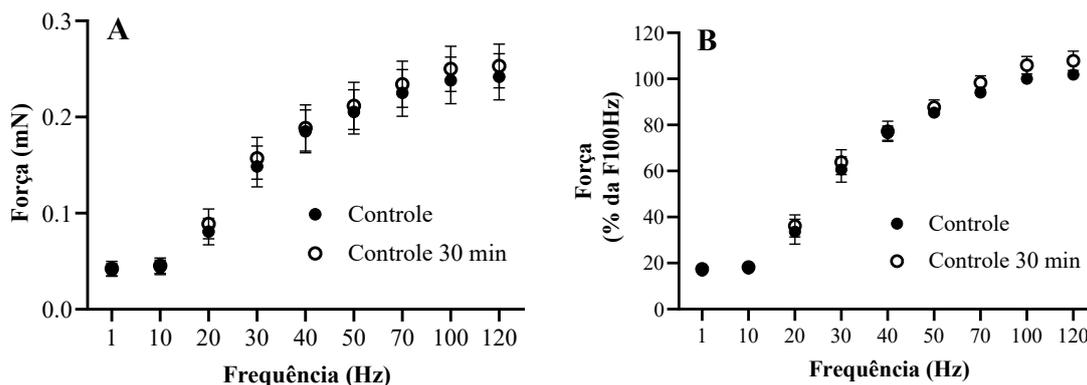


Figura 6. Força e frequência controle x controle 30 min após a primeira FF.

A – Força pico em mN.

B- Força em porcentagem referente a F_{pico} de 100 Hz do primeiro protocolo ($F_x/F_{100\text{Hz}} * 100$).

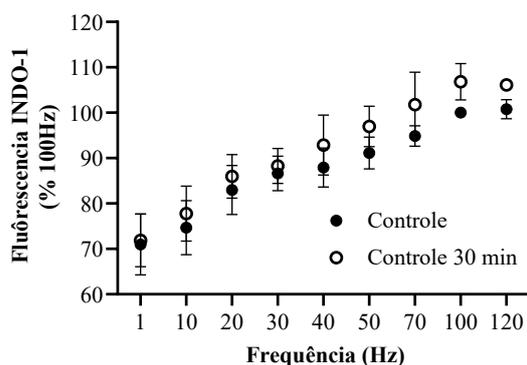
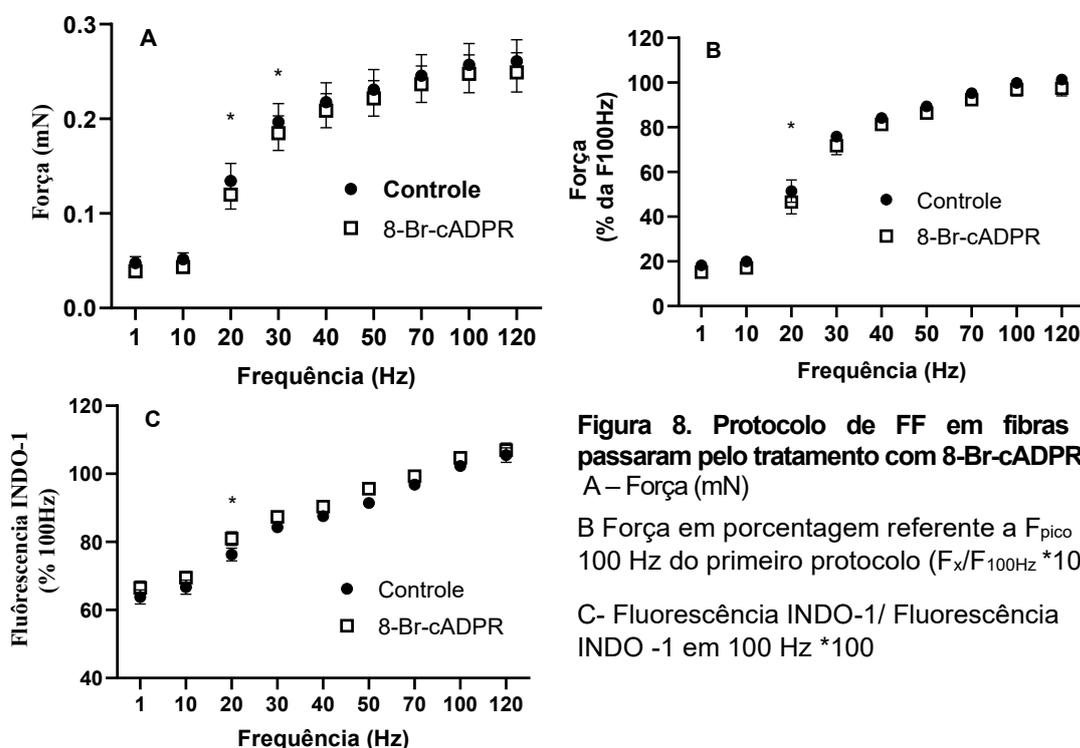


Figura 7. Fluorescência de INDO-1 por frequência, controle x controle 30 min após a primeira FF. % da fluorescência normalizada pela fluorescência na frequência de 100 Hz do primeiro protocolo de FF (Fluorescência INDO-1/Fluorescência INDO-1 em 100 Hz *100)

5.2. O efeito do tratamento com antagonista de cADPR na F_{pico} em diferentes frequências de estimulação

Para verificar a relação entre o cADPR e a geração de força nas fibras, foi analisada a F_{pico} , antes e após o tratamento com 8-Br-cADPR ($n = 9$). O tratamento com esse antagonista apenas alterou a nas frequências submáximas de 20 Hz ($0,1408 \pm 0,027$ mN vs. $0,1256 \pm 0,024$ mN; para CONTROLE e 8-Br-cADPR respectivamente; $P = 0,0042$) e 30 Hz ($0,1967 \pm 0,023$ mN vs. $0,1849 \pm 0,026$ mN; para CONTROLE e 8-Br-cADPR respectivamente; $P = 0,0340$). Quando a força relativa à máxima de 100 Hz foi analisada, foi observada diminuição somente para estimulação em 20 Hz ($54,86 \pm 9,004\%$ vs $49,86 \pm 9,039\%$ para CONTROLE e 8-Br-cADPR respectivamente; $P = 0,034$). Nas demais frequências não foram observadas diferenças significativas após o tratamento com 8-Br-cADPR (Fig 8.).

O mesmo efeito foi observado quando analisamos a fluorescência de INDO-1 ($n = 9$), que também apresentou diminuição de seus valores apenas na frequência de 20 Hz (Controle = $76,28 \pm 2,46$ versus $83,62 \pm 2,31$ % da razão em 100 Hz para Controle e 8-Br-cADPR respectivamente; $P = 0,0200$).



5.3. Tratamento com o antagonista 8-Br-cADPR ao longo de um protocolo de fadiga

Para analisar se o cADPR possui algum efeito no desenvolvimento da fadiga, fibras controle (sem tratamento) e fibras tratadas com 8-Br-cADPR passaram por um protocolo de contrações máximas repetidas. Não foram encontradas diferenças significativas no tempo de desenvolvimento de fadiga (<50% F_{pico} inicial) ($n = 5$) (Fig 9.), nem no número de contrações necessárias para observar diminuição de 50% da força pico da primeira contração do protocolo de fadiga (Fig 9.)

5.4. Recuperação da força e da $[Ca^{2+}]_i$ após desenvolvimento de fadiga

Após a indução da fadiga, foi analisada a recuperação da força após um período de recuperação de 30 min. As forças geradas nas frequências de 30 Hz, 50 Hz e 100 foram comparadas com os valores obtidos nas mesmas frequências

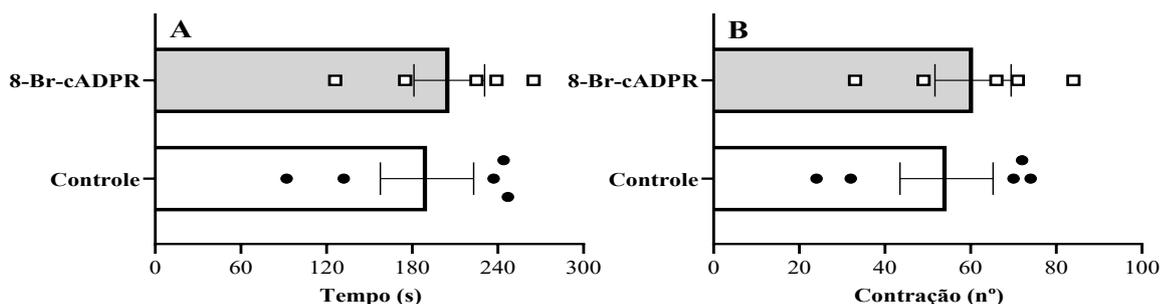


Figura 9 – Protocolo de Fadiga – Fibras Controle x Fibras tratadas com 8-Br-cADPR.

- A-** Tempo médio e tempo de cada fibra para desenvolvimento de Fadiga (50 % da F_{pico} inicial).
B- Média e valores individuais do número da contração em que foi observado o desenvolvimento de fadiga (<50 % da F_{pico} inicial).

antes do protocolo de fadiga, em cada fibra ($FF_{pós\ fadiga} / FF_{pré\ fadiga} * 100$). Como esperado, foram observadas diminuições na geração de força submáxima (30 Hz) em ambos os grupos 30 minutos após a fadiga. Porém, não foram observadas diferenças significativas na diminuição da força durante estimulações submáximas entre fibras controle e tratadas com 8-Br-cADPR. (Fig 10.). Interessantemente quando analisado a fluorescência de INDO-1 percebemos que a medida representativa de cálcio está aproximadamente 100% recuperada em todas as frequências, enquanto o grupo 8-Br-cADPR apenas em 100 Hz. Entretanto, os testes estatísticos não demonstram significância.

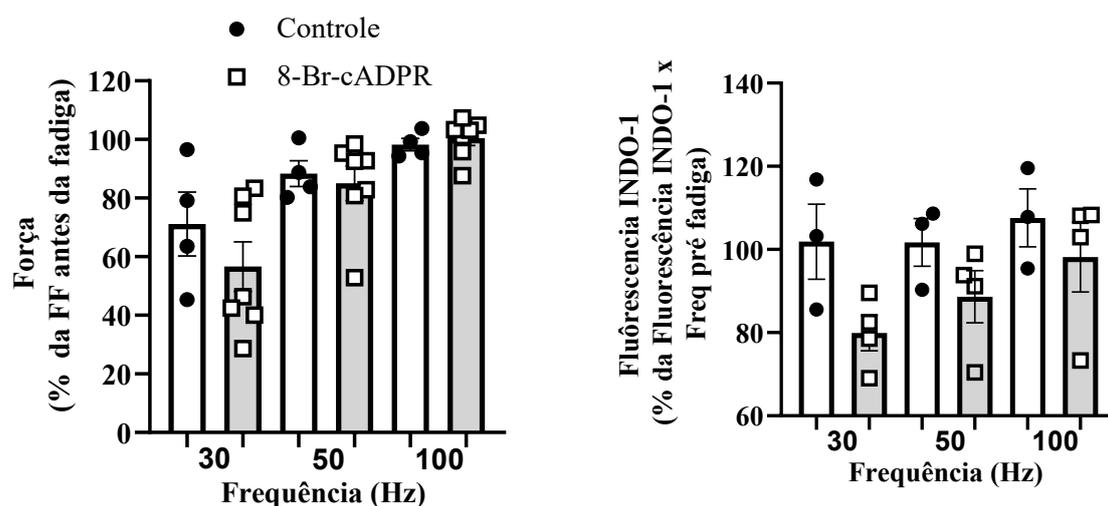


Figura 10 – Força e Fluorescência de INDO-1 após desenvolvimento de Fadiga. Comparativo entre grupo controle (sem tratamento) e grupo 8-Br-cADPR (tratado com antagonista de cADPR), média e valor de cada fibra relativa a mesma frequência antes do desenvolvimento de Fadiga. A- Força pico. B- Fluorescência de INDO-1

6. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o papel do cADPR endógeno na $[Ca^{2+}]_i$, na geração de força, durante a estimulação e no desenvolvimento da fadiga, e na recuperação após a fadiga em fibras musculares esqueléticas isoladas e intactas. Não foram observadas alterações na função contrátil e na $[Ca^{2+}]_i$ durante a estimulação de fibras tratadas com o antagonista de cADPR, 8-Br-cADPR. Assim, os resultados observados sugerem que o cADPR endógeno não deve ser importante para o controle do $[Ca^{2+}]_i$, da geração de força e resistência à fadiga em fibras musculares esqueléticas isoladas de camundongos 657BL/6J jovens e saudáveis.

O cADPR tem sido descrito como capaz de aumentar a $[Ca^{2+}]_i$ ao se ligar diretamente ao RyR1, ou de forma indireta, através de sua interação com a FKBP12, que promoveria sua dissociação do RyR1, aumentando o extravasamento de íons Ca^{2+} do RS para o citosol (GONANO; JONES, 2017; PARK et al., 2015). Existem evidências que o cADPR também pode interagir diretamente com a SERCA, aumentando a sua atividade e a captação íons Ca^{2+} pelo RS e por consequência a disponibilidade de cálcio no RS (PARK et al., 2018). O primeiro objetivo deste estudo foi analisar se o tratamento de fibras isoladas intactas com o 8-Br-cADPr resultaria em diminuição dos valores de $[Ca^{2+}]_i$ e da geração de força durante a estimulação. Quando fibras isoladas foram submetidas à dois protocolos de estimulação para obtenção de curvas FF, separadas por 30 minutos de repouso e sem nenhum tratamento, não foram observadas alterações na função contrátil e na $[Ca^{2+}]_i$. Estes resultados confirmam que o tempo adotado para a incubação com o 8-Br-cADPR não resulta em alterações na função contrátil e controle do $[Ca^{2+}]_i$.

Quando comparado a F_{pico} das fibras tratadas com 8-Br-cADPR antes e depois do tratamento com o antagonista, foi observado uma diminuição da força pico apenas nas frequências de estimulação de 20 Hz e 30 Hz. A análise da razão do sinal de fluorescência de INDO-1 também demonstrou um valor menor nas fibras tratadas com 8-Br-cADPR na frequência de 20 Hz, sugerindo que a diminuição da força resultou de uma menor $[Ca^{2+}]_i$ durante a estimulação em 20 Hz. Na hipótese inicial deste trabalho, era esperado observar uma diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ durante a estimulação das fibras tratadas

com o antagonista de cADPR, assim como uma menor geração de força, como demonstrado por Park e colaboradores em relação à $[Ca^{2+}]_i$ em fibras dissecadas enzimaticamente (PARK et al., 2015). No estudo de Park e colaboradores, o $[Ca^{2+}]_i$ se mostrou significativamente reduzido em fibras tratadas com 8Br-cADPR em relação às fibras controle durante períodos de estimulação contínua que variaram de ~1 min e 5 a 10 minutos (PARK et al., 2018) Contudo, os parâmetros de estimulação usados no estudo de Park e colaboradores (1 Hz, 50 V de 5 a 10 minutos estimulação contínua) divergem do protocolo usado neste presente trabalho (1 a 120 Hz, 350 ms duração do trem, 8V). Apesar da diferença nos parâmetros de estimulação, ainda era esperado observar alterações na $[Ca^{2+}]_i$ e na geração de força nas fibras tratadas com o antagonista de cADPR, considerando que estudos anteriores demonstraram reduções bastante significativas (~45%) da $[Ca^{2+}]_i$ durante a estimulação após o tratamento com 8-Br-cADPR Apesar desta diferença entre os protocolos de estimulação, ainda era esperada a diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ devido ao tratamento com o antagonista de cADPR ser o mesmo (mesma concentração e mesmo tempo de tratamento) e o efeito agudo que este teve sobre a $[Ca^{2+}]_i$ no estudo do Park. O protocolo de estimulação deste estudo foi respaldado em outros estudos que utilizaram de medidas de força e fluorescência simultâneas (GANDRA et al., 2018).

O presente estudo também investigou os efeitos de períodos mais prolongados de estimulação, como discutido a seguir, focando nos efeitos do 8-Br-cADPR em protocolos de estimulações que induzem à fadiga. Nestes protocolos, as fibras foram estimuladas intermitentemente por períodos de até ~4 min. Além disso, é importante salientar que estudo de Park e colaboradores fez o uso de fibras isoladas por digestão enzimática, este método de isolamento pode afetar a dinâmica da $[Ca^{2+}]_i$ durante a estimulação (GINESTE et al., 2022).

O presente estudo também esperava que o cADPR poderia apresentar um papel importante para determinar a resistência à fadiga no músculo esquelético uma vez que: 1- O cADPR pode ter sua formação aumentada após exercício físico e durante períodos prolongados de estimulação (PARK et al., 2015); 2- O possível papel do cADPR sobre a SERCA, aumentando

sua atividade, sendo que sua atividade da SERCA diminui com o desenvolvimento de fadiga (PARK et al., 2018). 3- A interação do cADPR com RYR1 controlando sua abertura . Entretanto, o tratamento com o antagonista de cADPR não resultou em alterações no tempo de desenvolvimento de fadiga nas fibras isoladas intactas no presente estudo (tempo para F_{pico} diminuir para 50% ou menos da F_{pico} inicial durante um período de contrações máximas repetidas).

Uma das principais causas do desenvolvimento de fadiga na fibra muscular é a diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ durante a estimulação. Esse efeito pode ser causado pela regulação dos canais de Ca^{2+} RyR1 e alterações na atividade da SERCA e a menor disponibilidade desse íon durante a contração, seja por uma menor ativação da RyR1, seja pela precipitação de cálcio no RS devido a entrada de P_i (CHENG; PLACE; WESTERBLAD, 2018). No tecido muscular, assim como em outros tecidos, o cADPR é descrito regular tanto a SERCA, quanto os RYRs (GUSE, 2015; LEE, 2012; VENTURI et al., 2012). Estudos do nosso grupo, demonstraram que o tratamento de fibras isoladas com um ativador específico da SERCA, CDN1163, resultou em diminuição da resistência à fadiga, provavelmente devido à um maior gasto energético associado ao aumento da atividade da SERCA (dados não publicados). Os resultados do presente estudo, onde o tempo para o desenvolvimento de fadiga não se alterou em fibras tratadas com 8-Br-cADPR, sugerem que o cADPR não deve ser importante para regular a atividade da SERCA ao longo de um protocolo de estimulações máximas intermitentes que induzem a fadiga.

Outra possibilidade é que o tratamento com 8-Br-cADPR poderia resultar em uma menor $[Ca^{2+}]_i$ durante a estimulação devido à um possível efeito desse composto na interação entre o cADPR e a proteína FKBP12. A FKBP12 interage com o RyR, aumentando a frequência de ativação do canal (GABURJAKOVA et al., 2001; KOLOS et al., 2018; VENTURI et al., 2014). A ligação do cADPR à FKBP12 pode resultar em desassociação da FKBP12 do RYRs (WANG et al., 2004). Já foi demonstrado, no músculo esquelético de camundongos submetidos à três semanas de exercício voluntário em rodas de corrida, ocorre uma maior dissociação da FKBP12 do RYR1 o que causa

um maior vazamento de cálcio do RS . No entanto, não é claro se um possível aumento nas concentrações de cADPR está envolvido nesse processo, também descrevendo uma maior tolerância ao exercício em 24h na 3ª semana (IVARSSON et al., 2019). Portanto, como descrito anteriormente, o tratamento com 8-Br-cADPR realizado no presente estudo não interferiu no desenvolvimento de fadiga, sugerindo que o cADPR endógeno não deve ter um papel crucial na regulação da $[Ca^{2+}]_i$ e da função contrátil durante períodos de estimulação intensas que levam ao desenvolvimento de fadiga.

Por fim um dos objetivos desse trabalho foi analisar o efeito do tratamento com 8-Br-cADPR na recuperação da fadiga. Como relatado em vários estudos, nós também observamos uma diminuição duradoura na geração de força em baixas frequências (PLFFD) após a fadiga, especialmente durante a estimulação à 30 Hz 30 minutos após a fadiga. Entretanto, nossos resultados sugerem que houve uma recuperação quase que total da $[Ca^{2+}]_i$, como indicado pela razão do sinal de INDO-1 durante a estimulação 30 minutos após a fadiga. Isso sugere que no presente estudo a menor geração de força durante a recuperação da fadiga está relacionada à uma menor sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . Contudo o tratamento com antagonista de cADPR não demonstrou alterações nas medidas de razão de INDO-1 e força em nenhuma frequência, mostrando que a recuperação pós fadiga não foi diferente entre os dois grupos. Portanto o cADPR não se demonstrou importante para a regulação do Ca^{2+} e geração da força durante a recuperação após o desenvolvimento de fadiga. Para aumentar o efeito da PLFFD poderia ser prolongado o protocolo de desenvolvimento de fadiga até 30% da F_{pico} inicial.

Os resultados descritos neste estudo sugerem que o tratamento agudo com antagonista de cADPR, 8-Br-cADPR não traz efeitos no desenvolvimento de fadiga e na geração de força, também não prejudicando contrátil do músculo esquelético. Uma das formas que a geração de cADPR pode estar diminuída nas fibras do músculo esquelético é com a inibição da enzima CD38 (PARK et al., 2018). O aumento da atividade da enzima CD38 no musculo esquelético tem sido relacionado à perda da função do músculo no envelhecimento (CAMACHO-PEREIRA et al., 2016). Essa perda da

função do músculo causada pelo aumento da atividade da CD38 está relacionada à diminuição dos níveis de NAD⁺, uma coenzima primordial para homeostase do corpo e função muscular, cujo consumo é intensificado pelo aumento da expressão e atividade da CD38 no envelhecimento (CAMACHO-PEREIRA et al., 2016). A CD38 também tem sido alvo de diversos estudos visando o entendimento de seus mecanismos de ação e ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para de diferentes doenças (KITADA; ARAKI; KOYA, 2023; TUPLING, 2004). Estudos em volta de doenças crônicas tem o interesse na inibição da CD38 para manter os níveis de NAD⁺ em diversos tecidos celulares (DESHPANDE et al., 2018; ZUO et al., 2021) , Estratégias terapêuticas centradas na inibição da CD38 poderiam ter como consequência a diminuição da formação de cADPR no músculo esquelético, uma vez que a CD38 é escrita como a principal formadora de cADPR nas fibras esqueléticas musculares (CHINI et al., 2018; DOUSA; CHINI; BEERS, 1996; PARK et al., 2018). O presente estudo traz uma nova perspectiva ao sugerir que o tratamento com inibidores de CD38 não deve resultar na perda da função muscular, uma vez que o cADPR endógeno não parece ser importante para a regulação do $[Ca^{2+}]_i$, na geração de força e no desenvolvimento da fadiga durante a estimulação em de fibras isoladas intactas.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o tratamento agudo com 8-Br-cADPR, um antagonista de um segundo mensageiro de cálcio derivado de NAD^+ , em fibras isoladas de camundongos jovens e saudáveis, não promoveu alterações na geração de força durante a estimulação em frequências submáximas ou máximas. Da mesma forma, não foram observados efeitos sobre o desenvolvimento de fadiga e recuperação da geração de força após a fadiga. A variação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ representada pelo sinal de fluorescência de INDO-1, também não se mostrou alterada com o tratamento com o antagonista de cADPR. Sendo assim, o cADPR endógeno não parece ser importante para o processo de acoplamento excitação-contração, no desenvolvimento da fadiga ou na recuperação da função contrátil após a fadiga em fibras isoladas de camundongos saudáveis e jovens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D. G.; LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. Impaired calcium release during fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 1, p. 296–305, jan. 2008.
- CAMACHO-PEREIRA, J. et al. CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 1127–1139, jun. 2016.
- CHAILLOU, T.; CHENG, A. J. Mechanisms of prolonged low-frequency force depression: in vivo studies get us closer to the truth. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 316, n. 5, p. R502–R503, 1 maio 2019.
- CHENG, A. J. et al. Antioxidant treatments do not improve force recovery after fatiguing stimulation of mouse skeletal muscle fibres. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 2, p. 457–472, 15 jan. 2015.
- CHENG, A. J.; PLACE, N.; WESTERBLAD, H. Molecular Basis for Exercise-Induced Fatigue: The Importance of Strictly Controlled Cellular Ca²⁺ Handling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 2, p. a029710, fev. 2018.
- CHENG, A. J.; WESTERBLAD, H. Mechanical isolation, and measurement of force and myoplasmic free [Ca²⁺] in fully intact single skeletal muscle fibers. **Nature Protocols**, v. 12, n. 9, p. 1763–1776, set. 2017.
- CHINI, E. N. et al. The Pharmacology of CD38/NADase: An Emerging Target in Cancer and Diseases of Aging. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 4, p. 424–436, abr. 2018.
- D'ERRICO, S. et al. Synthesis and Biological Evaluation of a New Structural Simplified Analogue of cADPR, a Calcium-Mobilizing Secondary Messenger Firstly Isolated from Sea Urchin Eggs. **Marine Drugs**, v. 16, n. 3, p. 89, 10 mar. 2018.
- DESHPANDE, D. A. et al. CD38/cADPR Signaling Pathway in Airway Disease: Regulatory Mechanisms. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–10, 2018.
- DOUSA, T. P.; CHINI, E. N.; BEERS, K. W. Adenine nucleotide diphosphates: emerging second messengers acting via intracellular Ca²⁺ release. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 4, p. C1007–C1024, 1 out. 1996.
- GABURJAKOVA, M. et al. FKBP12 Binding Modulates Ryanodine Receptor Channel Gating. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16931–16935, maio 2001.

GANDRA, P. G. et al. A mitochondrial-targeted antioxidant improves myofilament Ca²⁺ sensitivity during prolonged low frequency force depression at low. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 6, p. 1079–1089, 15 mar. 2018.

GINESTE, C. et al. Enzymatically dissociated muscle fibers display rapid dedifferentiation and impaired mitochondrial calcium control. **iScience**, v. 25, n. 12, p. 105654, dez. 2022.

GONANO, L. A.; JONES, P. P. FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge. **Channels**, v. 11, n. 5, p. 415–425, 3 set. 2017.

GONG, D.; YAN, N.; LEDFORD, H. A. Structural Basis for the Modulation of Ryanodine Receptors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 6, p. 489–501, jun. 2021.

GUSE, A. H. Calcium mobilizing second messengers derived from NAD. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 9, p. 1132–1137, set. 2015.

IVARSSON, N. et al. SR Ca²⁺ leak in skeletal muscle fibers acts as an intracellular signal to increase fatigue resistance. **Journal of General Physiology**, v. 151, n. 4, p. 567–577, 1 abr. 2019.

JONES, D. A. High- and low-frequency fatigue revisited. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 156, n. 3, p. 265–270, mar. 1996.

KITADA, M.; ARAKI, S.; KOYA, D. The Role of CD38 in the Pathogenesis of Cardiorenal Metabolic Disease and Aging, an Approach from Basic Research. **Cells**, v. 12, n. 4, p. 595, 12 fev. 2023.

KOLOS, J. M. et al. FKBP Ligands—Where We Are and Where to Go? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1425, 5 dez. 2018.

LAVER, D. R.; LENZ, G. K. E.; DULHUNTY, A. F. Phosphate ion channels in sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 535, n. 3, p. 715–728, set. 2001.

LEE, H. C. Cyclic ADP-ribose and Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) as Messengers for Calcium Mobilization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 38, p. 31633–31640, set. 2012.

ØRTENBLAD, N. et al. Role of glycogen availability in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ kinetics in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. 3, p. 711–725, fev. 2011.

PARK, D.-R. et al. Exercise Ameliorates Insulin Resistance via Ca²⁺ Signals Distinct From Those of Insulin for GLUT4 Translocation in Skeletal Muscles. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1224–1234, 1 abr. 2015.

PARK, D.-R. et al. CD38-cADPR-SERCA Signaling Axis Determines Skeletal Muscle Contractile Force in Response to β -Adrenergic Stimulation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 2017–2030, 2018.

RICHARDS, A. J. et al. Task-Dependent Mechanisms Underlying Prolonged Low-Frequency Force Depression. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, 4 nov. 2024.

ROSSI, A. E.; DIRKSEN, R. T. Sarcoplasmic reticulum: The dynamic calcium governor of muscle. **Muscle & Nerve**, v. 33, n. 6, p. 715–731, jun. 2006.

SUNDBERG, C. W.; FITTS, R. H. Bioenergetic basis of skeletal muscle fatigue. **Current Opinion in Physiology**, v. 10, p. 118–127, ago. 2019.

TARPEY, M. D. et al. Characterization and utilization of the flexor digitorum brevis for assessing skeletal muscle function. **Skeletal Muscle**, v. 8, n. 1, p. 14, dez. 2018.

TORNERO-AGUILERA, J. F. et al. Central and Peripheral Fatigue in Physical Exercise Explained: A Narrative Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 7, p. 3909, 25 mar. 2022.

TSARBOU, C. et al. The effect of fatigue on jump height and the risk of knee injury after a volleyball training game: A pilot study. **Biomedical Human Kinetics**, v. 13, n. 1, p. 197–204, 1 jan. 2021.

TUPLING, A. R. The Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Fatigue and Disease: Role of the Sarco(endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, n. 3, p. 308–329, 1 jun. 2004.

VENTURI, E. et al. From Eggs to Hearts: What Is the Link between Cyclic ADP-Ribose and Ryanodine Receptors? **Cardiovascular Therapeutics**, v. 30, n. 2, p. 109–116, abr. 2012.

VENTURI, E. et al. FKBP12.6 Activates RyR1: Investigating the Amino Acid Residues Critical for Channel Modulation. **Biophysical Journal**, v. 106, n. 4, p. 824–833, fev. 2014.

WANG, Y.-X. et al. FKBP12.6 and cADPR regulation of Ca^{2+} release in smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 286, n. 3, p. C538–C546, mar. 2004.

WITHERSPOON, J. W.; MEILLEUR, K. G. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 4, n. 1, p. 121, dez. 2016.

XU, H.; VAN REMMEN, H. The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: a potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. **Skeletal Muscle**, v. 11, n. 1, p. 25, 12 nov. 2021.

YAMAGUCHI, N.; KASAI, M. Potentiation of Depolarization-Induced Calcium Release from Skeletal Muscle Triads by Cyclic ADP-Ribose and Inositol 1,4,5-Trisphosphate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 240, n. 3, p. 772–777, nov. 1997.

YOUHANNA, S. et al. Calcium measurements in enzymatically dissociated or mechanically microdissected mouse primary skeletal muscle fibers. **STAR Protocols**, v. 4, n. 2, p. 102260, jun. 2023.

ZUO, W. et al. CD38: A Potential Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 35, n. 4, p. 815–828, ago. 2021.

ANEXOS

CERTIFICADO CEUA n° 91/2022



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Papel de segundos mensageiros de cálcio derivados de NAD na regulação do cálcio, geração de força e resistência a fadiga do músculo esquelético**, registrada com o n° **5998-1/2022**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Paulo Guimarães Gandra e Gustavo Manzanares, Guilherme Brito da Silva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI N° 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO N° 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/04/2022**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	31/12/2022 a 31/12/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/04/2022 a 31/12/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL6J
No. de animais:	32
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	32 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL6J
No. de animais:	32
Idade/Peso:	12.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	32 Machos
Origem:	CEMIB - UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios de Roedores da Bioquímica (bloco F), DBBT/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **28 de abril de 2022**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 29/04/2022, às 11:39 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**, em 28/04/2022, às 16:23 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
63472366 70F24DFD 8CD2DF10 7DBE6230

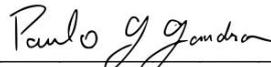


Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **PAPEL DO SEGUNDO MENSAGEIRO DE CÁLCIO DERIVADO DE NAD⁺, cADPR, NA REGULAÇÃO DE CÁLCIO, GERAÇÃO DE FORÇA E RESISTÊNCIA À FADIGA DE FIBRAS ISOLADAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de abril de 2025

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Gustavo Manzares**
RG n.º 377936960

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Paulo Guimarães Gandra**
RG n.º 294675528