

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

DANIEL STURZA LUCAS CAETANO

**DINÂMICA MITOCONDRIAL NA HIPERTROFIA CARDÍACA:
COMPARAÇÃO DE PROTOCOLO FISIOLÓGICO E PATOLÓGICO**

Porto Alegre

2019

DANIEL STURZA LUCAS CAETANO

**DINÂMICA MITOCONDRIAL NA HIPERTROFIA CARDÍACA:
COMPARAÇÃO DE PROTOCOLO FISIOLÓGICO E PATOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação,
apresentado no Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito parcial para a obtenção
do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andreia Biolo
Coorientador: Dr. Michael Andrades

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Sturza Lucas Caetano, Daniel
DINÂMICA MITOCONDRIAL NA HIPERTROFIA CARDÍACA:
COMPARAÇÃO DE PROTOCOLO FISIOLÓGICO E PATOLÓGICO /
Daniel Sturza Lucas Caetano. -- 2019.
48 f.
Orientadora: Andreia Biolo.

Coorientadora: Michael Andrades.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Dinâmica mitocondrial. 2. Hipertrofia cardíaca.
3. Mitocôndria. 4. Fissão. 5. Fusão. I. Biolo,
Andreia, orient. II. Andrades, Michael, coorient.
III. Título.

DANIEL STURZA LUCAS CAETANO

**DINÂMICA MITOCONDRIAL NA HIPERTROFIA CARDÍACA:
COMPARAÇÃO DE PROTOCOLO FISIOLÓGICO E PATOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 02 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela – UFRGS

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo – UFRGS

Prof^a. Dr^a Andreia Biolo – UFRGS
orientadora

Dr. Michael Everton Andrades – HCPA
coorientador

RESUMO

A hipertrofia cardíaca ocorre como resposta a um estímulo e é caracterizada pelo aumento da massa do coração, modulações moleculares e bioquímicas. Essa hipertrofia pode ter um caráter fisiológico e adaptativo ou patológico e mal-adaptativo, dependendo do tipo de estímulo dado ao órgão. Pouco se sabe sobre as diferenças bioquímicas que ocorrem nestes dois processos, em especial sobre o papel da mitocôndria, sua origem e reciclagem. A mitocôndria é a organela responsável pela produção energética. Porém, quando danificadas ou disfuncionais, elas têm sua capacidade de produção energética reduzida e passam por um processo chamado mitofagia. O equilíbrio entre mitocôndrias funcionais e disfuncionais também é regulado por um processo conhecido como dinâmica mitocondrial, que regula a sua fissão e fusão. Tanto a mitofagia quanto a dinâmica mitocondrial são mecanismos ainda não bem elucidado na literatura, mas já demonstrados em alguns estudos com modelos de hipertrofia patológica (HCP). Contudo, a sua comparação com a hipertrofia fisiológica (HCF) ainda não foi feita. Neste trabalho foram avaliados os imunociteos de (DRP1) fissão e (MFN2 e OPA1) fusão mitocondrial em tecidos cardíacos de animais submetidos a protocolo de indução de hipertrofia cardíaca fisiológica ou patológica, em dois tempos (agudo e crônico), a fim de comparar os níveis de estresse mitocondrial. A fissão mitocondrial está aumentada nos corações de animais com hipertrofia fisiológica quando comparada aos animais com hipertrofia patológica, assim como a fusão mitocondrial demonstrou tendência de também estar aumentada no grupo com hipertrofia cardíaca fisiológica vs hipertrofia cardíaca patológica. As mitocôndrias dos corações com HF demonstraram uma maior capacidade de adaptação quando comparadas aos corações com HP. Estes resultados obtidos no trabalho sugerem que os processos de dinâmica mitocondrial se encontram mais ativos na hipertrofia fisiológica do que na hipertrofia patológica. Essa resposta diferente pode estar associada com os processos adaptativos ou degenerativos característicos vistos em corações saudáveis ou doentes, respectivamente.

Palavras-chave: hipertrofia cardíaca. mitocôndria. dinâmica mitocondrial. DRP1. MFN2. OPA1.

ABSTRACT

Cardiac hypertrophy occurs as a response to a stimulus and is characterized by increased heart mass, molecular and biochemical modulations. The hypertrophy may be physiological and adaptive or pathological and maladaptive, depending on the type of stimulus given to the organ. The knowledge is poor about the biochemical differences that occur in these two processes, especially concerning the role of the mitochondria. The balance between functional and dysfunctional mitochondria is also regulated by a process known as mitochondrial dynamics, which regulates their fission and fusion. The mitochondrial dynamics is a mechanism that has not yet been elucidated in the literature but has already been demonstrated in some studies with pathological hypertrophy models. However, its comparison with physiological hypertrophy has not yet been made.

In this work, we evaluated mitochondrial fission (DRP1) and fusion (MFN2 and OPA1) proteins in cardiac tissues of mice (male, 8-14 weeks old) submitted to either acute or chronic cardiac hypertrophy induction protocol: physiologic or pathologic. We compared mitochondrial dynamics by assessing the levels of controlling proteins: DRP1, MFN2 and OPA-1. Mitochondrial fission is increased in the hearts of animals with physiological hypertrophy compared to the animals with pathological hypertrophy, just as mitochondrial fusion showed a tendency to be increased in the group with physiological cardiac hypertrophy vs pathological cardiac hypertrophy. The mitochondria of hearts with HF showed a greater adaptability when compared to hearts with HP. These results suggest that mitochondrial dynamics processes are more active in physiological hypertrophy than in pathological hypertrophy. This different response may be associated with the characteristic adaptive or degenerative processes seen in healthy or diseased hearts, respectively.

Keywords: cardiac hypertrophy. Mitochondria. mitochondrial dynamic. DRP1. MFN2. OPA1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de adaptação e mal-adaptação cardíaca a estímulos constantes ou intervalados.....	11
Figura 2 – Dinâmica Mitocondrial.....	14
Figura 3 – Mitofagia.....	15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAX - *BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*

BCL2-L-13 - *BCL2 Like 13*

BCL-XL - *B-cell Lymphoma - Extra Large*

BNIP3 - *BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa Protein - Interacting Protein 3*

BNIP3L/NIX - *BCL2 Interacting Protein 3-like*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DRP1 – *Dynamin - Related Protein 1*

ECL - Quimioluminescente à Base de Luminol

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FIS1 - *Mitochondrial Fission 1 Protein*

FUNDC1 - *FUN14 Domain Containing 1*

HCF - Hipertrofia Cardíaca Fisiológica

HCP - Hipertrofia Cardíaca Patológica

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

LC3/III – *Microtubule - Associated Proteins 1A/1B light chain 3B*

MFN1/2 - Mitofusín 1/2

MID49 e MID51 - *Mitochondrial Elongation Factor*

MPTP - *Mitochondrial Permeability Transition Pore*

OMA1 - Metalloendopeptidase

OPA1 - *Mitochondrial Dynamin Like GTPase*

P62 - *Nucleoporin p62*

PINK1 – *PTEN - Induced Kinase 1*

PVDF - Polímero Fluoreto de Polivinilideno

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TAC - *Transthoracic Aortic Banding*

YMEL1 - *ATP - Dependent Metalloprotease Hiper*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Hipertrofia Cardíaca	9
1.2 Hipertrofia Fisiológica	9
1.3 Hipertrofia Patológica	10
1.4 Dinâmica Mitocondrial	11
1.5 Mitofagia	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.3 Objetivos Específicos	16
4 ARTIGO CIENTIFICO	17
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
5.1 Conclusão	30
5.2 Perspectivas	30
6 REFERÊNCIAS	31
ANEXO A –NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA: AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertrofia Cardíaca

A hipertrofia cardíaca é caracterizada pelo aumento do tamanho e massa do coração (CARREÑO et al., 2006) em resposta a diferentes estímulos, como injúria (infarto agudo do miocárdio), sobrecargas crônicas de pressão (hipertensão arterial, estenose aórtica), de volume (insuficiência mitral ou aórtica), inflamação (miocardites) e exercício físico (GUPTA et al., 2007). Esse aumento do músculo pode ser pela adição de sarcômeros em série - caracterizando uma hipertrofia cardíaca excêntrica - ou pela adição de sarcômeros em paralelo - caracterizando uma hipertrofia cardíaca concêntrica (MAILLET; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2013) (Figura 1). De acordo com a intensidade e duração do estímulo, o coração pode sofrer uma hipertrofia fisiológica (adaptativa) ou patológica (mal adaptativa), as quais se distinguem bioquimicamente e morfológicamente (HOU; KANG, 2012)

1.2 Hipertrofia Fisiológica

O exercício físico é um estímulo conhecido para o desenvolvimento de uma hipertrofia fisiológica adaptativa do coração. A sobrecarga de pressão que o músculo cardíaco sofre não é persistente devido ao exercício físico de caráter intermitente (FRANCHINI, 2001; MARON; PELLICCIA, 2006). Ainda, a sobrecarga de pressão causa modificações fisiológicas, moleculares e celulares na tentativa de suprir a nova demanda do organismo, culminando em uma hipertrofia fisiológica passível de reversão quando cessado o estímulo (Figura 1) (KOVACS; BAGGISH, 2016). Por se tratar de uma sobrecarga intermitente, o exercício não acarreta em anormalidades cardíacas. A adição das novas fibras, em paralelo ou em série, ocasionam um aumento da força contrátil do músculo cardíaco (BERNARDO et al., 2010; FERNANDES et al., 2015). Além disso, há também um aumento na vascularização do tecido para supri-los (BERNARDO et al., 2010; MAILLET; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2013).

As primeiras organelas a sofrerem com as novas demandas energéticas dos cardiomiócitos são as mitocôndrias. Para suprir a nova demanda energética do tecido

essas organelas necessitam aumentar sua produção de energia. Para que haja essa mudança na produção energética as mitocôndrias sofrem mudanças morfológicas, essas adaptações são conhecidas como dinâmica mitocondrial (SEDLACKOVA; KOROLCHUK, 2019).

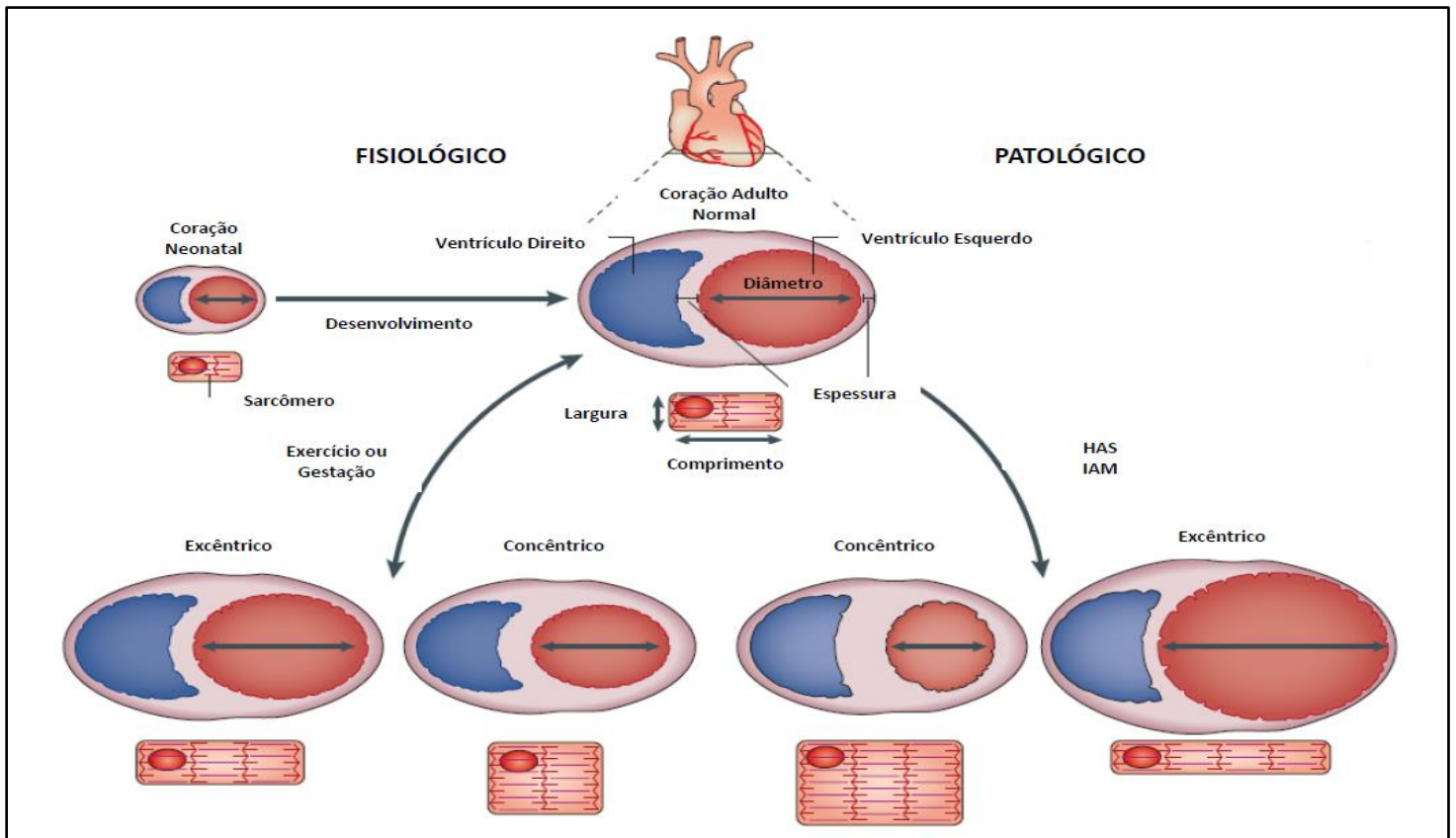
1.3 Hipertrofia Patológica

A hipertrofia cardíaca patológica inicia-se como forma compensatória a alguns estímulos (aumento de pressão ou volume, dano celular, estímulos adrenérgicos persistentes). Porém, a continuidade destes estímulos leva o órgão a um limite de não retorno, podendo acarretar, inclusive, na sua falência. Neste último caso, o coração perde a capacidade de bombear sangue em quantidade suficiente para suprir o funcionamento normal do corpo (ADAMS; ZANNAD, 1998) .

A hipertensão arterial é um dos principais estímulos para uma hipertrofia patológica, pois induz a remodelação cardíaca, uma resposta progressiva do coração aos insultos agudos e crônicos que pode ser definida como um conjunto de alterações moleculares, celulares e intersticiais, que se manifestam clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração (Figura 1) (AZEVEDO et al., 2016). Na prática, vê-se aumento de tamanho dos miócitos, fibrose tecidual, inflamação, morte celular e perda de capacidade contrátil (AZEVEDO et al., 2016; COHN; FERRARI; SHARPE, 2000).

Embora o remodelamento ocorra como resposta a distintas condições etiológicas, as rotas moleculares, bioquímicas e as alterações hemodinâmicas que levam ao remodelamento ventricular são comparáveis entre etiologias de hipertrofia (COHN; FERRARI; SHARPE, 2000; EXPERT GROUP ON BIOMARKERS, 2014). Ocorrem influências de múltiplos sistemas sobre esses mecanismos, entre eles salientamos os mecanismos envolvidos na autofagia de mitocôndrias (mitofagia) e na dinâmica mitocondrial.

Figura 1: Mecanismo de adaptação e mal-adaptação cardíaca a estímulos constantes ou intervalados.



Fonte: Figura adaptada de (MAILLET; VAN BERLO; MOLKENTIN, 2013).

1.4 Dinâmica Mitochondrial

As mitocôndrias são organelas suscetíveis a danos oxidativos e para contrapor a esse possível dano elas possuem um mecanismo denominado dinâmica mitocondrial, tornando-as mais eficientes na produção de ATP (WESTERMANN, 2010). Esse mecanismo também auxilia na remoção/degradação das organelas que estejam danificadas (WALLACE, 2005). Esse é um processo de mudança na morfologia da mitocôndria e serve para manter a homeostase mitocondrial. Essa dinâmica pode ser utilizada pela célula para dois fins; fundir ou fissionar mitocôndrias (Figura 2) (HOM; SHEU, 2009). Esses processos ocorrem a todo momento, tanto para retirar partes despolarizadas ou danificadas, quanto para conjugar mitocôndrias em bom estado (ONG; HAUSENLOY, 2010). A fusão mitocondrial tem o papel de tentar proteger a organela da degradação, é mais

eficiente para a produção de energia e compartilhamento de conteúdos entre mitocôndrias (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012). A fissão mitocondrial é facilitada quando a célula está com uma alta energética ou quando esta em processo de mitofagia (WESTERMANN, 2010).

As mudanças na morfologia mitocondrial são reguladas por proteínas que atuam sobre a fissão (DRP1 e FIS1) e fusão (Mitofusina 1 e 2 - MFN, OPA1) e o balanço entre esses dois processos é essencial para a viabilidade da célula (Figura 2) (IKEDA et al., 2015).

A proteína DRP1 encontra-se principalmente no citosol e quando necessário, transloca-se para a membrana externa da mitocôndria, ancorando-se na FIS1.(YOON et al., 2003). Quando FIS1 está em níveis normais na célula, ela induz a fissão mitocondrial em mitocôndrias longas para facilitar sua remoção por mitofagia, uma vez que a mitocôndria fragmentada torna-se mais fácil de ser degradada pela autofagia mitocondrial (YOON et al., 2006). Porém, aumento de expressão de FIS1 acentua o processo de fissão e está associada com a liberação de Citocromo c no citosol, iniciando o processo de apoptose celular induzido pela mitocôndria (LEE et al., 2004).

Existem dois sítios de fosforilação da DRP1 que estão relacionados com a dinâmica mitocondrial, estes são na S616 e S637. Quando fosforilada na S616 a DRP1 ativa a fissão mitocondrial, se estabilizando na membrana externa da mitocôndria através da sua ligação com Mid49 e Mid51 (fatores de alongamento mitocondrial) (PALMER et al., 2011). Com função oposta, quando fosforilada na S637 a DRP1 possui um papel de inibir a fissão, ou seja, se torna pró fusão, neste caso a DRP1 perde a afinidade pela membrana externa da mitocôndria (Figura 2) (WANG et al., 2012). A razão das fosforilações S616/S637 é um dos indicativos da função da DRP1 na dinâmica mitocondrial (KO et al., 2016)

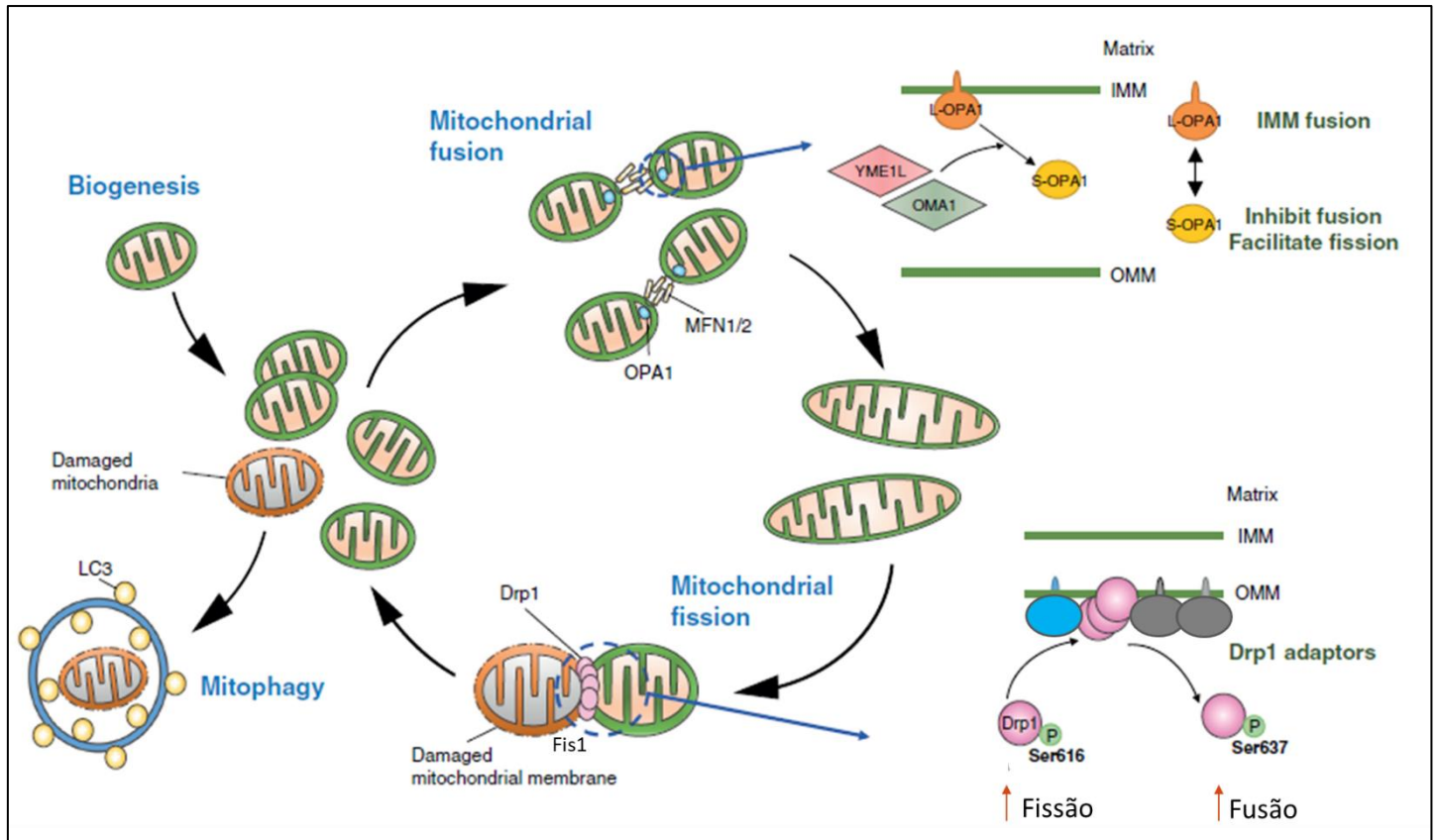
O processo oposto ao de fissão é o de fusão, que é mediado pelas proteínas OPA1, Mitofusina 1 e Mitofusina 2. As mitofusinas são GTPases localizadas na membrana externa da mitocôndria e fazem a primeira etapa da fusão mitocondrial: a fusão das membranas externas (HALES; FULLER, 1997). A proteína OPA1 é uma GTPase presente na membrana interna da mitocôndria e promove a segunda etapa da fusão mitocondrial: a fusão das membranas internas. Essa proteína também possui o papel de regular as cristas mitocondriais evitando a liberação do Citocromo

c no citosol durante o processo de apoptose celular induzido pela mitocôndria (VARANITA et al., 2015).

A proteína OPA1 ou l-OPA1 (long form) pode ser fragmentada pelas peptidases OMA1 e YMEL1 em um fragmento denominado s-OPA1 (short form). As isoformas “s” e “l” da OPA1 estão em constante equilíbrio na membrana interna da mitocôndria (Figura 2) (EHSES et al., 2009). A peptidase OMA1 possui uma maior afeição pela l-OPA1 conseqüentemente fragmenta a proteína com maior velocidade quando a mitocôndria está sob condições de estresse, como por exemplo despolarização da membrana externa (ANAND et al., 2014). O desbalanço na atividade das peptidases leva a uma maior quantidade da isoforma "S" podendo indicar que a mitocôndria será fragmentada (WANG et al., 2014).

A fusão mitocondrial é seletiva, ocorrendo entre duas mitocôndrias polarizadas. Além disso, ela é sincronizada com a fissão mitocondrial, na qual gera-se mitocôndrias-filha desiguais, sendo uma delas despolarizada e a outra polarizada. A mitocôndria despolarizada é então removida por mitofagia (Figura 2) (SCOTT; YOULE, 2010). Tem sido dito que a frequência e a seletividade da fusão são necessárias para manter a função mitocondrial saudável e permitir que a mitofagia ocorra (MOULI; TWIG; SHIRIHAI, 2009). Alguns estudos sugerem que a despolarização mitocondrial induzida pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) pode estimular a remoção por mitofagia (RODRIGUEZ-ENRIQUEZ et al., 2009), pois mitocôndrias despolarizadas e fissionadas apresentam poros abertos, assim estimulando esse processo (CARREIRA et al., 2010).

Figura 2: Dinâmica Mitochondrial.



Fonte: Figura adaptada de (NAH; MIYAMOTO; SADOSHIMA, 2017).

1.5 Mitofagia

A autofagia específica da mitocôndria é denominada mitofagia e é um processo de reciclagem de mitocôndrias (VÁSQUEZ-TRINCADO et al., 2016).

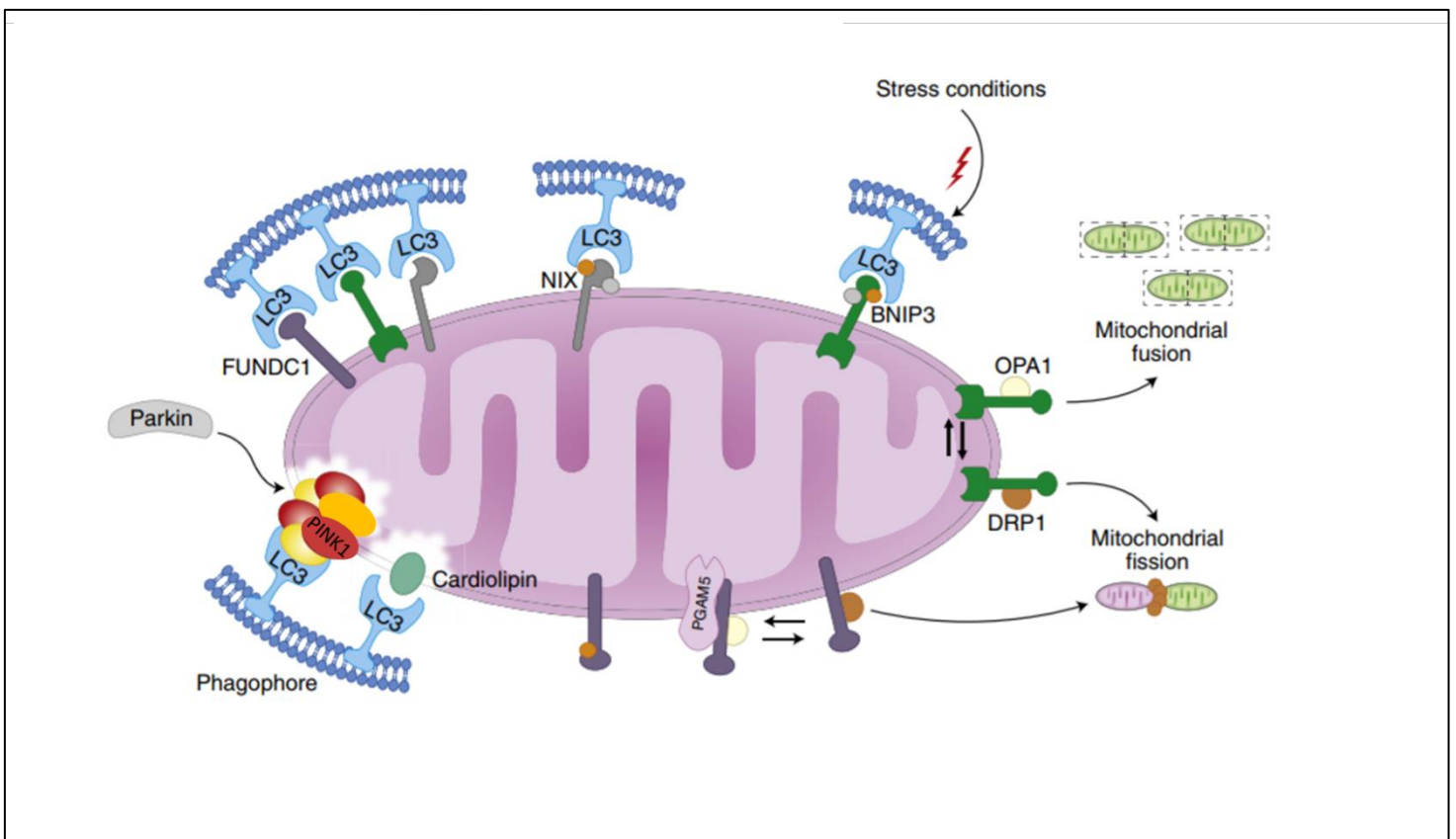
A via mais bem esclarecida e que é a mais proeminente na mitofagia é a via dependente de Parkin. Após a despolarização mitocondrial ocorre a ativação da PINK1, que recruta a proteína Parkin para a membrana mitocondrial externa através da fosforilação de MFN ou da própria Parkin, que por sua vez recruta receptores/adaptadores de LC3 e induz o sequestro de mitocôndrias danificadas por autofagossomos (KONDAPALLI et al., 2012).

Embora a mitofagia seja mediada primariamente por mecanismos dependentes de Parkin e PINK1, existem outros mecanismos alternativos e independentes desta via (PALIKARAS; LIONAKI; TAVERNARAKIS, 2015). Dentre estes, os mecanismos mediados por BNIP3/NIX, FUNDC1, Cardiolipina e BCL2-L-13 (Figura 3)(PALIKARAS; LIONAKI; TAVERNARAKIS, 2018).

O mecanismo da BNIP3/NIX (Figura 3) possui poucas evidências na literatura. Os estudos que relatam esse mecanismo evidenciam seu envolvimento na resposta a hipóxia (VÁSQUEZ-TRINCADO et al., 2016) e na proteção da célula contra as EROs (ZHANG et al., 2008). Outros estudos apontam que BNIP3 e NIX apresentam vias redundantes na mitofagia pois o silenciamento de apenas uma das proteínas não induz um efeito proeminente na mitofagia, mas o silenciamento das duas proteínas causa uma inibição na mitofagia induzida por hipóxia (BELLOT et al., 2009).

BNIP3 e NIX são proteínas localizadas na membrana externa da mitocôndria, elas possuem sítios de ligação que interagem com LC3II na formação do autofagossomo induzido pela BCL-XL (MELSER et al., 2013). No músculo cardíaco, BNIP3 e NIX são reguladas pela hipóxia e dependentes da sinalização de Galtaq, e suas expressões são associadas com o decaimento da função do miocárdio (ZHANG; NEY, 2009).

Figura 3: Mitofagia - Processo de mitofagia com as diferentes proteínas da via



Fonte: Figura adaptada de (PALIKARAS; LIONAKI; TAVERNARAKIS, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A dinâmica mitocondrial e a mitofagia são processos bem conhecidos e fundamentais para a manutenção da capacidade energética das células. O coração é especialmente dependente destes processos, visto que é um órgão em constante movimento e de grande demanda energética. Visto que a capacidade contrátil e energética desenvolve-se diferentemente na hipertrofia fisiológica e patológica, é necessário entender as vias que regulam esse aspecto. Dentre os mecanismos de adaptação do tecido cardíaco a diferentes tipos de insultos, a dinâmica mitocondrial na hipertrofia ainda é um processo pouco esclarecido e que pode apresentar diferenças em seu desenvolvimento em processos patológicos e fisiológicos. A compreensão de como os mecanismos de adaptação mitocondrial atuam na hipertrofia fisiológica e patológica podem auxiliar no entendimento das vias de sinalização e, potencialmente, abrir espaço para intervenções terapêuticas.

3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho é comparar níveis de adaptação mitocondrial através de proteínas de fissão e fusão de mitocôndrias em amostras de material biológico de camundongos com hipertrofia cardíaca fisiológica e de camundongos com hipertrofia cardíaca patológica.

3.1 Objetivo Geral

Comparar níveis de proteínas relacionadas com a dinâmica mitocondrial em protocolo de hipertrofia cardíaca fisiológica e hipertrofia cardíaca patológica.

3.3 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são os seguintes:

- a) avaliar por Western Blot a proteína de fissão mitocondrial DRP1;
- b) avaliar as proteínas de fusão mitocondrial MFN2 e OPA1.

4 ARTIGO CIENTIFICO

Revista: American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology

DINÂMICA MITOCONDRIAL NA HIPERTROFIA CARDÍACA - COMPARAÇÃO DE PROTOCOLO FISIOLÓGICO E PATOLÓGICO

Daniel Sturza^{1 2}; Mariana Breidenbach^{1 2}; Aimée Souto¹; Andrea Biolo^{1 2}; Michael Andrades¹

¹Hospital de Clínicas de Porto Alegre

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ABSTRACT

Cardiac hypertrophy occurs as a response to a stimulus and is characterized by increased heart mass, molecular and biochemical modulations. The hypertrophy may be physiological and adaptive or pathological and maladaptive, depending on the type of stimulus given to the organ. The knowledge is poor about the biochemical differences that occur in these two processes, especially concerning the role of the mitochondria. The balance between functional and dysfunctional mitochondria is also regulated by a process known as mitochondrial dynamics, which regulates their fission and fusion. The mitochondrial dynamics is a mechanism that has not yet been elucidated in the literature but has already been demonstrated in some studies with pathological hypertrophy models. However, its comparison with physiological hypertrophy has not yet been made.

In this work, we evaluated mitochondrial fission (DRP1) and fusion (MFN2 and OPA1) proteins in cardiac tissues of mice (male, 8-14 weeks old) submitted to either acute or chronic cardiac hypertrophy induction protocol: physiologic or pathologic. We compared mitochondrial dynamics by assessing the levels of controlling proteins: DRP1, MFN2 and OPA-1. Mitochondrial fission is increased in the hearts of animals with physiological hypertrophy compared to the animals with pathological hypertrophy, just as mitochondrial fusion showed a tendency to be increased in the group with physiological cardiac hypertrophy vs pathological cardiac hypertrophy. The mitochondria of hearts with PhCH showed a greater adaptability when compared to hearts with PaCH. These results suggest that mitochondrial dynamics processes are more active in physiological hypertrophy than in pathological hypertrophy. This different response may be associated with the characteristic adaptive or degenerative processes seen in healthy or diseased hearts, respectively.

Keywords: Physiological, pathological, cardiac hypertrophy, mitochondria, mitochondrial dynamic, DRP1, MFN2, OPA1

Introdução

A hipertrofia cardíaca é caracterizada pelo aumento do tamanho e massa do coração (2) em resposta a diferentes estímulos, como injúria (infarto agudo do miocárdio), sobrecargas crônicas de pressão (hipertensão arterial, estenose aórtica), de volume (insuficiência mitral ou aórtica), inflamação (miocardites) e exercício físico (8). De acordo com a intensidade e duração do estímulo, o coração pode sofrer uma hipertrofia adaptativa frente à nova demanda do organismo, ou mal adaptativa, que é inicialmente compensatória mas, devido aos estímulos contínuos, gera dano tecidual e compromete a funcionalidade do órgão (11).

A hipertensão arterial é um dos principais estímulos para uma hipertrofia patológica, pois induz a remodelação cardíaca (1, 4). Embora o remodelamento ocorra como resposta a distintas condições etiológicas, as rotas moleculares, bioquímicas e as alterações hemodinâmicas que levam ao remodelamento ventricular são comparáveis entre etiologias de hipertrofia (4, 6). Ocorrem influências de múltiplos sistemas sobre esses mecanismos, entre eles salientamos os mecanismos envolvidos na autofagia de mitocôndrias (mitofagia) e na dinâmica mitocondrial.

A dinâmica mitocondrial é um processo de mudança na morfologia da mitocôndria, a qual pode ser utilizada para fusionar ou fissionar mitocôndrias (10). Essas duas dinâmicas ocorrem a todo momento na mitocôndria, tanto para retirar partes despolarizadas ou danificadas, quanto para conjugar mitocôndrias em bom estado (18). As mudanças na morfologia mitocondrial são reguladas por proteínas que atuam sobre a fissão (DRP1 e FIS1) e fusão (Mitofusina 1 e 2 - MFN, OPA1). O balanço entre esses dois processos é essencial para a viabilidade da célula (12).

A proteína DRP1 é uma proteína citosólica (24), que quando se transloca para a mitocôndria pode ser fosforilada na S616, tendo função pró fissão, também pode ser

fosforilada na S637, inibindo a fissão (20)(23). A razão das fosforilações S616/S637 é um dos indicativos da função da DRP1 na dinâmica mitocondrial (13)

O processo oposto ao de fissão é o de fusão, que é mediado pelas proteínas OPA1, Mitofusina 1 e Mitofusina 2. As mitofusinas são GTPases localizadas na membrana externa da mitocôndria e realizam a fusão das membranas externas (9). A proteína OPA1 promove a fusão das membranas internas, ela possui uma isoforma l-OPA1 (long form - pró fusão) que ao ser clivada pelas peptidases OMA1 e YMEL1 gera um fragmento denominado s-OPA1 (short form - pró fissão). Estas isoformas estão em constante equilíbrio na membrana interna da mitocôndria (5). A fusão e a fissão mitocondrial são processos seletivos e sincronizados e estão diretamente ligados com a mitofagia (21).

A autofagia específica da mitocôndria é denominado mitofagia, e é um processo de reciclagem de mitocôndrias que ocorre na célula (22). A via mais bem esclarecida e que é a mais proeminente na mitofagia é a via dependente de Parkin. Após a despolarização mitocondrial ocorre a ativação da PINK1, que recruta a proteína Parkin para a membrana mitocondrial externa através da fosforilação de MFN ou da própria Parkin, que por sua vez recruta receptores/adaptadores de LC3 e induz o sequestro de mitocôndrias danificadas por autofagossomos (14).

Embora a mitofagia seja mediada primariamente por mecanismos dependentes de Parkin e PINK1, existem outros mecanismos alternativos e independentes desta via (19). Dentre estes, destacamos mecanismos mediados por BNIP3/NIX, FUNDC1, Cardiopina e BCL2-L-13 (17).

O mecanismo da BNIP3/NIX possui poucas evidências na literatura, os estudos que relatam esse mecanismo evidenciam seu envolvimento na resposta a hipóxia (22) e na proteção da célula contra as EROs (25). BNIP3 e NIX são proteínas localizadas na membrana externa da mitocôndria, elas possuem sítios de ligação que interagem com LC3II na formação

do autofagossomo induzido pela BCL-XL (16). No músculo cardíaco, BNIP3 e NIX são reguladas pela hipóxia e dependentes da sinalização de G_{alfaq} , e suas expressões são associadas com o decaimento da função do miocárdio (26).

Materiais e métodos

Animais

Este é um trabalho com materiais biológicos advindo de trabalhos anteriores. Foram utilizados tecido cardíaco de camundongos Balb/c machos que foram submetidos à cirurgia de bandejamento aórtico transtorácico (CEUA-HCPA 13-0157) e de camundongos submetidos a um protocolo de exercício (CEUA-HCPA 14-0443). Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), sob um ciclo claro-escuro de 12:12 e tinham acesso livre à comida e água.

Protocolo de hipertrofia patológica

Os animais foram divididos em quatro grupos: operado mas sem constrição da aorta grupo com 7 dias de seguimento (SHAM-agudo, n=10), operado com constrição aórtica transversal 7 dias (TAC-agudo, n=8), operado mas sem constrição (SHAM-crônico, n=9) e operado com constrição aórtica transversal (TAC-crônico, n=10) com 35 dias de seguimento.

A TAC foi realizada da seguinte forma: os ratos foram anestesiados com isoflurano a 2,5% em 0,1 mL de O₂ e intubados para ventilação mecânica (Modelo 687, Harvard Apparatus). Os ratos foram ventilados com um volume constante de 0,2 mL e uma frequência respiratória de 140 respirações por minuto. Os animais eram colocados em uma almofada de aquecimento a 37 °C, os procedimentos cirúrgicos foram realizados usando um microscópio estéreo (Leica M80). Foi feita uma incisão no esterno e o arco aórtico foi exposto e amarrado (sutura de seda 6-0) contra uma agulha 26 G (0,45 mm) entre o tronco braquiocefálico e

artéria carótida comum esquerda. A agulha foi removida imediatamente para restaurar o fluxo sanguíneo. O peito foi fechado com sutura e os animais receberam cetoprofeno (0,1 mg/kg s.c.) para analgesia. O procedimento em camundongos SHAM era idêntico, mas sem a constrição da aorta. Todos os ratos foram deixados a recuperar numa câmara de recuperação a 37°C com oxigénio fornecido durante a noite.

Os grupos TAC e SHAM tiveram os tecidos colhidos após 7 e 35 dias da cirurgia inicial. Todos os animais foram pesados e anestesiados com xilazina (100 mg/kg) e cetamina (10 mg/kg), seguidos de abertura torácica cirúrgica e rápida excisão do coração. a hipertrofia cardíaca foi medida pela relação peso do ventrículo esquerdo/comprimento tibia (PVE/CT em mg/mm) e relação peso ventricular esquerdo/peso corporal (PVE/PC em mg/g). As tíbias foram coletadas e radiografadas por um técnico treinado. As radiografias foram digitalizadas e o comprimento da tibia foi realizado pelo Image Pro-Plus (versão 4.1.0.0 Media Cybernetics, L.P.).

Protocolo de hipertrofia fisiológica

Os animais foram alocados aleatoriamente por lote e caixa. Os animais foram avaliados agudamente (7 dias) ou cronicamente (28 dias), gerando quatro grupos: 7 dias (SED-agudo , n=12), 28 dias (SED-crônico, n=12), 7 dias (EXE-agudo , n=13) e 28 dias (EXE-crônico , n=15).

O treinamento consistiu em nadar por 90 minutos duas vezes ao dia, 5 dias por semana, durante um total de 7 ou 28 dias, com temperatura da água entre 30 e 32°C. No primeiro dia, os camundongos foram adaptados por 3 dias com tempo progressivo: 5 minutos - dia 1, 10 minutos - dia 2, 15 minutos - dia 3. Em seguida, no dia inicial do protocolo iniciado por 20 minutos; a duração foi aumentada em 10 minutos todos os dias até o dia 5 e em 15 minutos nos dias 6 e 7 duas vezes ao dia. Todas as sessões subsequentes duraram 90

minutos - duas vezes por dia. Para minimizar a influência do estresse hídrico, os animais sedentários foram colocados na piscina por 5 minutos, duas vezes por semana, durante o protocolo experimental.

Uma piscina adaptada foi construída para a implementação deste protocolo. O sistema é composto por um tanque de vidro medindo 10 mm de espessura, 60 cm de largura, 100 cm de comprimento e 50 cm de altura. O tanque interno é composto de vidro de 4mm, dividido em 9 grupos, com uma área de superfície de 30x15 cm por raia e profundidade de 35 cm para permitir o treinamento individual. Para evitar a flutuação do animal durante a natação, foi utilizado um sistema de bolhas, consistindo em um cano de água conectado a uma bomba de ar que foi acoplada à base inferior do tanque interno. Foi utilizado um aquecimento automatizado, o sistema manteve a temperatura entre 30 e 32°C e um filtro com capacidade de 420 L/h foi usado para manter o aparelho limpo.

Após 24 h do último protocolo, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados. Os corações foram colhidos, os átrios e o ventrículo direito foram imediatamente excisados para isolar o ventrículo esquerdo (VE), a hipertrofia cardíaca foi medida pela relação peso do ventrículo esquerdo/comprimento tíbia (PVE/CT em mg/mm) e relação peso ventricular esquerdo/peso corporal (PVE/PC em mg/g). As tíbias foram coletadas e radiografadas por um técnico treinado. As radiografias foram digitalizadas e o comprimento da tíbia foi realizado pelo Image Pro-Plus (versão 4.1.0.0 Media Cybernetics, L.P.).

Todo o material biológico coletado foi conservado em freezer -80 °C.

Western Blot

Para a quantificação de proteínas nas amostras de tecido cardíaco, o método utilizado foi o de Western Blot. As amostras foram homogeneizadas em tampão contendo inibidor de

proteases e SDS, foram preparadas em tampão de carregamento e aplicadas em gel SDS-PAGE (4% para o gel de entrada e 12% para o gel de resolução). As proteínas foram separadas de acordo com o seu peso molecular e transferidas para membranas de PVDF por 45 min com 0,42 mA. As membranas foram coloridas com Azul de Commassie (marcador de peptídeos), fotografadas e bloqueadas por 2 h em TTBS+BSA 5% e incubadas com anticorpo primário para as proteínas alvos durante a noite. Os anticorpos primários utilizados (anti-MFN2, #9482 *Cell Signaling*; anti-DRP1, #5391 *Cell Signaling*; anti-OPA1; #80471 *Cell Signaling*) foram diluídos 1:1000 em TTBS com 5% de BSA. Após, as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-*rabbit* IgG diluído em TTBS com 5%BSA (#7074 *Cell Signaling*) durante 2 h em movimentação contínua. As membranas foram reveladas com ECL e registradas em um fotodocumentador digital. Algumas das membranas foram desibridizadas com tampão contendo beta-mercaptoetanol.

Quantificação

A análise da intensidade de cada banda foi feita no software *ImageJ*, usando ferramentas internas para análise de gel. Foi retirado o *background* das imagens em 50%, contraste modificado no modo automático, todas as bandas de cada membrana foram selecionadas horizontalmente e quantificadas. As análises foram feitas por um avaliador cegado. Os valores foram normalizados pela intensidade de coloração de Azul de Commassie. Para diminuir a diferença entre experimentos, uma mesma amostra foi corrida em todos os géis, e por ela as outras amostras foram ponderadas. O anticorpo para OPA1 detecta as duas isoformas da proteína s-OPA e l-OPA, nos pesos de 80 kDa e 100 kDa, respectivamente. As duas bandas foram quantificadas e o resultado está expresso como razão l-OPA/s-OPA.

Análise estatística

Os grupos com hipertrofia foram normalizados pelos seus respectivos controles e os dados demonstram vezes de aumento (ou diminuição) em relação aos controles. A análise estatística utilizada foi o modelo de regressão multivariável ou também conhecido do inglês *general linear model (GLM)*. Análise de pares de grupos foi realizada pelo teste de *Fisher's Least Significant Difference (LSD)*. Os dados estão expressos como mediana e intervalo interquartil.

Resultados

O tecido cardíaco de cada um dos animais foi escolhido de acordo com o seu grau de hipertrofia, ou seja, apenas tecidos de coração hipertrofiado foram selecionados para entrar nesse estudo. A média do peso do VE/comprimento da tíbia estão descritos na tabela 1, assim como o tamanho amostral de cada grupo.

Grupo	Tamanho amostral	Índice de hipertrofia cardíaca	Desv.pad
Protocolo de HCF			
SED-agudo	5	5,52	9%
EXE-agudo	5	6,02	
SED-crônico	11	5,34	13%
EXE-crônico	13	6,06	
Protocolo de HCP			
SHAM-agudo	8	5,48	22%
TAC-agudo	7	6,74	
SHAM-crônico	8	6,04	28%
TAC-crônico	9	7,73	

Tabela 1: Característica dos grupos e das amostras biológicas

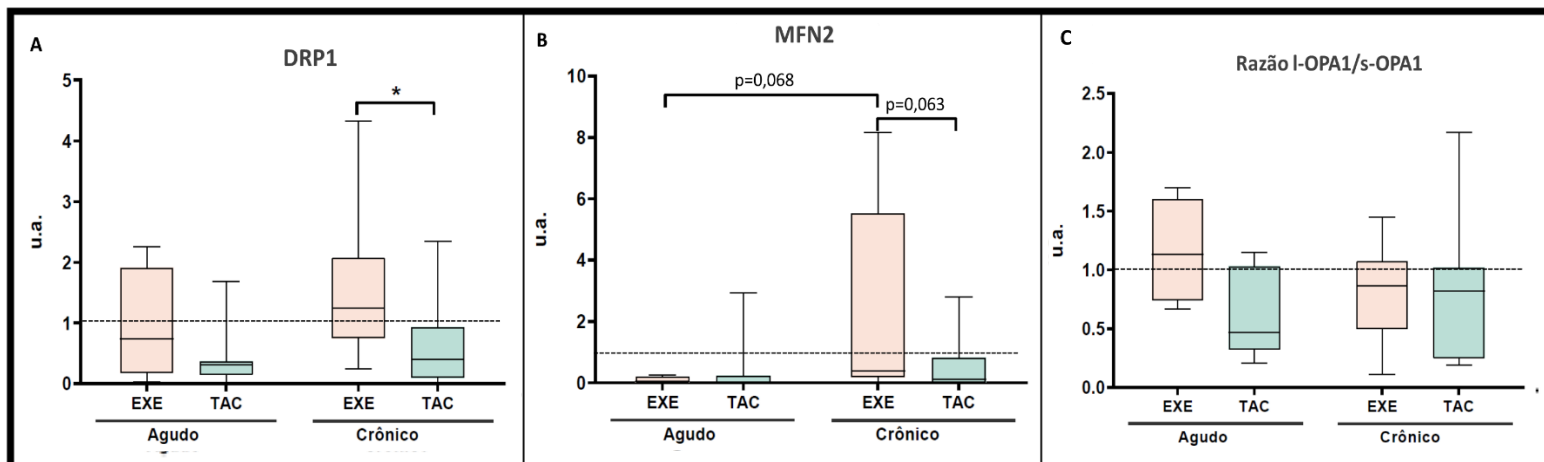


Figura 1 - Imunoconteúdo das proteínas de dinâmica mitocondrial. Os dados estão expressos como mediana e intervalo interquartil. Os grupos com hipertrofia estão normalizados pelos seus respectivos controles e os dados demonstram vezes de aumento/diminuição em relação aos controles. (A) Proteína de fissão mitocondrial DRP1. (GLM, $p=0,072$; LSD, * $p=0,041$). (B) Proteína de fusão mitocondrial MFN2. (GLM, $p=0,122$; LSD, # $p=0,068$; * $p=0,063$). (C) Razão l-OPA1/s-OPA1. (GLM $p=0,422$).

Efeito dos protocolos nas proteínas de dinâmica mitocondrial

A proteína de fissão mitocondrial DRP1 não apresentou alteração de imunoconteúdo ao longo do tempo no coração de animais submetidos ao protocolo de hipertrofia fisiológica ou patológica. No entanto, a hipertrofia fisiológica parece ter o processo de fissão mitocondrial mais ativo do que a hipertrofia patológica (GLM $p=0,072$; LSD $p=0,041$) (Figura 1A)

A proteína de fusão mitocondrial MFN2, demonstrou uma tendência na alteração de imunoconteúdo no grupo EXE ao longo do tempo (GLM $p=0,068$), assim como também tende ao aumento no processo de fusão mitocondrial na hipertrofia fisiológica crônica quando comparado com a hipertrofia patológica crônica cronicamente (GLM $p=0,063$) (Figura 1B).

A razão dos fragmentos l-OPA e s-OPA não apresentou alteração no imunoconteúdo ao longo do tempo nos grupos, assim como, também não demonstrou alteração entre os protocolos (Figura 1C).

Discussão

O objetivo do nosso trabalho era comparar a dinâmica mitocondrial em corações de camundongos com hipertrofia cardíaca fisiológica ou patológica. Os nossos resultados sugerem que a hipertrofia cardíaca fisiológica mantém ativos os recursos mitocondriais de fissão e fusão após treinamento crônico.

Neste trabalho, avaliamos a fissão mitocondrial pelo imunoconteúdo da proteína DRP1 e pelo balanço dos fragmentos de alto e baixo peso molecular da OPA-1. Não detectamos aumento de DRP1 ao longo do desenvolvimento da hipertrofia, seja fisiológica ou patológica. Porém, a comparação entre os tipos de hipertrofia dentro de cada tempo de seguimento demonstrou um aumento de DRP1 (GLM, $p=0,072$; LSD, * $p=0,041$; $n=11$ EXE e $n=9$ TAC) no acompanhamento crônico. O reduzido número amostral deste experimento impede conclusões mais consistentes e futuros estudos são necessários para elucidar esse mecanismo. Por outro lado, não vimos alterações na razão l-OPA1/s-OPA1. Essa razão é mantida pela clivagem da l-OPA1 pelas peptidases OMA1 e YMEL1. Aumento da clivagem e da fração s-OPA1 indicaria fissão mitocondrial enquanto que diminuição de clivagem e aumento de l-OPA1 indicaria fusão mitocondrial (5). Apesar do imunoconteúdo de DRP1 total ser relevante para a dinâmica mitocondrial, fosforilações em sítios de ativação ou inibição devem ser considerados. Foi visto que a proteína DRP1 está relacionada com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica, assim como a maior ativação de seus sítios de fosforilação (3). Para uma melhor percepção do que está acontecendo na dinâmica mitocondrial, as fosforilações da DRP1 devem ser analisadas futuramente.

A proteína MFN2 é encontrada na membrana externa da mitocôndria, e junto com a OPA1 realizam a fusão de mitocôndrias saudáveis (7). As análises feitas para MFN2 demonstraram que a proteína possui uma tendência a alteração ao longo do tempo no grupo de hipertrofia fisiológica, e também tende ao aumento na hipertrofia fisiológica crônica

comparado com a hipertrofia patológica. Um pré requisito para que haja fusão através da MFN2 é o potencial de membrana da mitocôndria (15) e a diminuição no grupo TAC crônico pode ser um sinal de que as mitocôndrias dos cardiomiócitos não estão se adaptando às novas demandas do tecido e podem estar sofrendo com o estresse celular.

Tanto o aumento de DRP1 no grupo com hipertrofia fisiológica crônica, quanto o de MFN2 podem demonstrar uma maior e melhor ativação da adaptação mitocondrial em corações com hipertrofia fisiológica do que em corações com hipertrofia patológica cronicamente.

Como limitações principais deste estudo, podemos apontar: i) a ausência da avaliação da proteína DRP1 fosforilada, que é um marcador mais confiável da atividade desta proteína do que o imunocnteúdo de DRP total; ii) o pequeno número amostral disponível até o momento e que pode ter colaborado para uma falta de poder estatístico.

Conclusão

Com os resultados obtidos no trabalho, sugerimos que processos de dinâmica mitocondrial encontram-se mais ativos na hipertrofia fisiológica do que na hipertrofia patológica. Essa resposta diferente pode estar associada com os processos adaptativos ou degenerativos característicos vistos em corações saudáveis ou doentes, respectivamente.

Referências

1. **Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM.** Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol* 106: 62–69, 2016.
2. **Carreño JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE.** [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Rev Esp Cardiol* 59: 473–486, 2006.
3. **Chang Y-W, Chang Y-T, Wang Q, Lin JJ-C, Chen Y-J, Chen C-C.** Quantitative phosphoproteomic study of pressure-overloaded mouse heart reveals dynamin-related protein 1 as a modulator of cardiac hypertrophy. *Mol Cell Proteomics* 12: 3094–3107, 2013.
4. **Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N.** Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 35: 569–582, 2000.
5. **Ehnes S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou J-C, Westermann B, Rugarli EI, Langer T.** Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* 187: 1023–1036, 2009.
6. **EXpert Group on Biomarkers.** Biomarkers in cardiology--part 1--in heart failure and specific cardiomyopathies. *Arq Bras Cardiol* 103: 451–459, 2014.
7. **Fang L, Moore X-L, Gao X-M, Dart AM, Lim YL, Du X-J.** Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Life Sci* 80: 2154–2160, 2007.
8. **Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, Bodian C, Ullman T.** Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology* 133: 1099–105; quiz 1340–1, 2007.
9. **Hales KG, Fuller MT.** Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90: 121–129, 1997.
10. **Hom J, Sheu S-S.** Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 46: 811–820, 2009.
11. **Hou J, Kang YJ.** Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 135: 337–354, 2012.
12. **Ikeda Y, Shirakabe A, Brady C, Zablocki D, Ohishi M, Sadoshima J.** Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 78: 116–122, 2015.
13. **Ko A-R, Hyun H-W, Min S-J, Kim J-E.** The Differential DRP1 Phosphorylation and Mitochondrial Dynamics in the Regional Specific Astroglial Death Induced by Status Epilepticus. *Front Cell Neurosci* 10: 124, 2016.

14. **Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gourlay R, Burchell L, Walden H, Macartney TJ, Deak M, Knebel A, Alessi DR, Muqit MMK.** PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol* 2: 120080, 2012.
15. **Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M.** Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13: 4343–4354, 2002.
16. **Melser S, Chatelain EH, Lavie J, Mahfouf W, Jose C, Obre E, Goorden S, Priault M, Elgersma Y, Rezvani HR, Rossignol R, Bénard G.** Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metab* 17: 719–730, 2013.
17. **Nah J, Miyamoto S, Sadoshima J.** Mitophagy as a Protective Mechanism against Myocardial Stress. *Compr Physiol* 7: 1407–1424, 2017.
18. **Ong S-B, Hausenloy DJ.** Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 88: 16–29, 2010.
19. **Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N.** Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death Differ* 22: 1399–1401, 2015.
20. **Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT.** MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 12: 565–573, 2011.
21. **Scott I, Youle RJ.** Mitochondrial fission and fusion. *Essays Biochem* 47: 85–98, 2010.
22. **Vásquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, Parra V, Hill JA, Rothermel BA, Lavandro S.** Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J Physiol* 594: 509–525, 2016.
23. **Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X.** The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 148: 228–243, 2012.
24. **Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA.** The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23: 5409–5420, 2003.
25. **Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL.** Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 283: 10892–10903, 2008.
26. **Zhang J, Ney PA.** Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* 16: 939–946, 2009.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusão

Com os resultados obtidos neste trabalho, sugerimos que os processos de dinâmica mitocondrial se encontram mais ativos na hipertrofia fisiológica do que na hipertrofia patológica cronicamente. Essa resposta diferente pode estar associada com os processos adaptativos ou degenerativos característicos vistos em corações saudáveis ou doentes, respectivamente.

5.2 Perspectivas

De acordo com os nossos resultados, posteriormente desejamos realizar a análise de proteínas envolvidas na mitofagia como Parkin e em específico BNIP3/NIX a fim de identificar se esta proteína está mais presente em nossas amostras. Também, será avaliada a proteína DRP1 fosforilada, para podermos ver um cenário mais completo da dinâmica mitocondrial dentro dos protocolos.

6 REFERÊNCIAS

ADAMS, K. F., Jr; ZANNAD, F. Clinical definition and epidemiology of advanced heart failure. **American heart journal**, [s. l.], v. 135, n. 6 Pt 2 Su, p. S204–15, 1998.

ANAND, Ruchika et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. **The Journal of cell biology**, [s. l.], v. 204, n. 6, p. 919–929, 2014.

AZEVEDO, Paula S. et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 62–69, 2016.

BELLOT, Grégory et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 2570–2581, 2009.

BERNARDO, Bianca C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology & therapeutics**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 191–227, 2010.

CARREIRA, Raquel S. et al. Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells. **Autophagy**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 462–472, 2010.

CARREÑO, Juan Eduardo et al. [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. **Revista española de cardiología**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 473–486, 2006.

COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 569–582, 2000.

EHSES, Sarah et al. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. **The Journal of cell biology**, [s. l.], v. 187, n. 7, p. 1023–1036, 2009.

EXPERT GROUP ON BIOMARKERS. Biomarkers in cardiology--part 1--in heart failure and specific cardiomyopathies. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, [s. l.], v. 103, n. 6, p. 451–459, 2014.

FERNANDES, Tiago et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, [s. l.], v. 309, n. 4, p. H543–52, 2015.

FRANCHINI, Kleber G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. **Rev Bras Hipertens**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 125–142, 2001.

GUPTA, Roopali Bansal et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 133, n. 4, p. 1099–105; quiz 1340–1, 2007.

HALES, K. G.; FULLER, M. T. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. **Cell**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 121–129, 1997.

HOM, Jennifer; SHEU, Shey-Shing. Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. **Journal of molecular and cellular cardiology**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 811–820, 2009.

HOU, Jianglong; KANG, Y. James. Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets. **Pharmacology & therapeutics**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 337–354, 2012.

IKEDA, Yoshiyuki et al. Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system. **Journal of molecular and cellular cardiology**, [s. l.], v. 78, p. 116–122, 2015.

KO, Ah-Reum et al. The Differential DRP1 Phosphorylation and Mitochondrial Dynamics in the Regional Specific Astroglial Death Induced by Status Epilepticus. **Frontiers in cellular neuroscience**, [s. l.], v. 10, p. 124, 2016.

KONDAPALLI, Chandana et al. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. **Open biology**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 120080, 2012.

KOVACS, Richard; BAGGISH, Aaron L. Cardiovascular adaptation in athletes. **Trends in cardiovascular medicine**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 46–52, 2016.

LEE, Yang-Ja et al. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. **Molecular biology of the cell**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 5001–5011, 2004.

MAILLET, Marjorie; VAN BERLO, Jop H.; MOLKENTIN, Jeffery D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 38–48, 2013.

MARON, Barry J.; PELLICCIA, Antonio. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. **Circulation**, [s. l.], v. 114, n. 15, p. 1633–1644, 2006.

MELSER, Su et al. Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 719–730, 2013.

MOULI, Pradeep K.; TWIG, Gilad; SHIRIHAI, Orian S. Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. **Biophysical journal**, [s. l.], v. 96, n. 9, p. 3509–3518, 2009.

NAH, Jihoon; MIYAMOTO, Shigeki; SADOSHIMA, Junichi. Mitophagy as a Protective Mechanism against Myocardial Stress. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1407–1424, 2017.

ONG, Sang-Bing; HAUSENLOY, Derek J. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. **Cardiovascular research**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 16–29, 2010.

PALIKARAS, K.; LIONAKI, E.; TAVERNARAKIS, N. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. **Cell death and differentiation**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 1399–1401, 2015.

- PALIKARAS, Konstantinos; LIONAKI, Eirini; TAVERNARAKIS, Nektarios. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. **Nature cell biology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 1013–1022, 2018.
- PALMER, Catherine S. et al. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. **EMBO reports**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 565–573, 2011.
- RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, Sara et al. Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes. **Autophagy**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 1099–1106, 2009.
- SCOTT, Iain; YOULE, Richard J. Mitochondrial fission and fusion. **Essays in biochemistry**, [s. l.], v. 47, p. 85–98, 2010.
- SEDLACKOVA, Lucia; KOROLCHUK, Viktor I. Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival. **Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1866, n. 4, p. 575–587, 2019.
- VARANITA, Tatiana et al. The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 834–844, 2015.
- VÁSQUEZ-TRINCADO, César et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. **The Journal of physiology**, [s. l.], v. 594, n. 3, p. 509–525, 2016.
- WALLACE, Douglas C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annual review of genetics**, [s. l.], v. 39, p. 359–407, 2005.
- WANG, X. et al. Mitochondrial dysfunction-associated OPA1 cleavage contributes to muscle degeneration: preventative effect of hydroxytyrosol acetate. **Cell death & disease**, [s. l.], v. 5, p. e1521, 2014.
- WANG, Zhigao et al. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. **Cell**, [s. l.], v. 148, n. 1-2, p. 228–243, 2012.
- WESTERMANN, Benedikt. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 872–884, 2010.
- YOON, Yisang et al. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 23, n. 15, p. 5409–5420, 2003.
- YOON, Young-Sil et al. Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. **Journal of cellular physiology**, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 468–480, 2006.
- YOULE, Richard J.; VAN DER BLIEK, Alexander M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. **Science**, [s. l.], v. 337, n. 6098, p. 1062–1065, 2012.
- ZHANG, Huafeng et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 283, n. 16, p. 10892–10903, 2008.

ZHANG, J.; NEY, P. A. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. **Cell death and differentiation**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 939–946, 2009.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA: AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY

Manuscript Formatting Requirements

FlexSubmit

New submissions are not scrutinized for compliance with our technical standards (reference format, order of components, etc.). As long as the required information is present, (all author information, abstract, running title, figures and tables, links to supplemental data, references, etc.) the manuscript will be reviewed for scientific content.

Manuscripts may be returned to authors if figure presentation or the clarity/transparency of Methods is lacking.

If the manuscript is promising, the revised manuscript must be formatted according to journal guidelines upon resubmission.

File Formats for Online Submission and Publication

Manuscripts may be submitted to the APS Peer Review system in the following formats: Microsoft Word (.doc or .docx), Rich Text Format (.rtf), or PDF. Manuscript submissions should contain all required elements, such as the abstract, all main text, bibliography, figures, figure legends, tables, and table legends, and any hyperlinks to data supplements in a single file. Please note that LaTeX files (.tex) cannot be used for production of accepted articles.

APS accepts manuscripts in one of two formats: double-spaced in wide, one-column, traditional manuscript format, or single-spaced in two-column journal format. You may embed copies of the figures into the text for review purposes, but if you choose to embed figures, any revisions to figures during review (see instructions for Preparing Figures) will require you to upload the newly revised individual figure files to our online submission system, and the copies you had previously embedded must also be updated to reflect the revised figures.

Style

All text should conform to standard American English style and usage. Authors for whom English is not their native language are strongly encouraged to seek the aid of a professional English language editorial service. Many companies specialize in life sciences and medicine (and other areas of science) and will edit your manuscript for a fee. The American Physiological Society does not recommend or endorse specific companies.

Be sure that the language in your manuscript is original, without inclusion of any previously published textual passages (including those from authors' own prior publications). Authors may wish to screen their manuscript for textual similarities prior to submission using a fee-for-service scholarly publishing databases such as iThenticate. Please note that APS does not endorse any screening program nor guarantees that these screening tools will detect all instances of textual overlap.

Spelling and Editorial Style

Authors should consult Webster's Third New International Dictionary or Merriam Webster's Collegiate Dictionary, 11th edition, for spelling and compounding. The APS Journals follow American English rules for spelling. All manuscripts will be edited by highly trained professional copy editors, according to the APS house style and guidelines.

Abbreviations, Symbols, and Terminology

Abbreviations should be defined at first usage. However, at the discretion of the APS editorial staff, many internationally accepted (or otherwise compellingly conventional) abbreviations do not need to be defined; please consult the List of Commonly Accepted Abbreviations. For word usage, symbols, etc., authors are referred to *Scientific Style and Format Online*, 8th Edition (8th ed., 2014). For chemical and biochemical terms and abbreviations, consult the recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature. Isotope specification must conform to the IUPAC system. Authors are referred to the following articles for style in specialized fields: "Glossary on respiration and gas exchange" (*J Appl Physiol* 34: 549-558, 1973); and "Glossary of terms for thermal

physiology" (J Appl Physiol 35: 941-961, 1973).

Special Symbols

For special characters not available on the standard 104-key keyboard (e.g., Greek characters, mathematical symbols, figure symbols), use the Symbol font or use the "Insert Symbol" function in Microsoft Word; do not use Math font or image files (e.g., GIF) within the text for special characters or text constructions.

Trade Names

Proprietary (trademarked) names should be capitalized, with the spelling carefully checked. The generic name or generic descriptor should accompany the trade name the first time it appears.

Gene, Protein, and Species Nomenclature

Authors should use standard nomenclature and annotation, following current established conventions for properly presenting gene vs. protein symbols and names, as well as using current scientific binomial species names, in accordance with the appropriate official organization. For human genes, contact the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). For mouse genes, contact Mouse Genomic Informatics (MGI) for mouse genes. For rat genes, contact the Rat Genome Database (RGD). Other resources are available for other species, and authors are expected to seek out such resources during the manuscript composition process and/or during revision.

Manuscript Composition

Title Page

All submissions must contain a title page. The title page must contain the full title of the article; author(s) name(s); all departments and institutions in which the work was done; an abbreviated title for the running head; and the corresponding author's name, e-mail, and physical address for correspondence. Only one author may be designated as the corresponding author. However, two or more authors can be identified as contributing to the manuscript equally by using an asterisk.

Title

Make the title succinct and informative. Avoid unnecessary words like "Studies in....". The title must not exceed 160 characters, including spaces between words.

Authors

List all authors' names and their first names or initials exactly as they should be known. Do not include any specific titles (e.g., PhD, MD, and Prof. are not needed). Include a brief itemized list of how each author contributed to the study.

"Group authorship" is allowed, with the name of a group (such as a consortium or program) to be listed as an author, with members of the group listed in the Acknowledgments section; however, the Program Director of the named group must be the one who signs for the group when the group's "author" signature is needed, i.e., on a Mandatory Submission Form or a Change of Authorship Form.

Authors may present their names in non-Latin characters (in their native writing system) alongside the standard English transliteration of their name in the main author line of the published article; for example, "Ta-Ming Wang (王大明)". We will accept any non-Latin languages that have standard Unicode characters designated for the native characters. For authors who choose this option, please only provide the native expression for the original written form of the transliterated name; that is, do not include any associated degree, rank, or title information in the native format. This feature is meant for the person's name only, not for ancillary information

regarding academic achievement or institutional affiliation. To take advantage of this feature, please insert the native expression of your name alongside the English transliteration in the main title page of your manuscript submission.

ORCID

The APS Journals program participates in the ORCID Registry. Authors have the option to attach their ORCID identifier to their author profile in the APS Manuscript Submission system, or register for one if they are a new participant. The ORCID identifier will be included in the article metadata, if published, which may facilitate broad-reaching linkages of many pieces of an author's work across multiple databases (such as Pubmed, PMC, and others).

ORCID is "an open, non-profit, community-based effort to create a permanent registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers."

Please see the ORCID website for more information and to register for an ORCID identifier.

FundRef

The APS Journals program participates in the FundRef Registry (a CrossRef.org initiative).

Authors will be able to indicate the funder(s) associated with their work via an interface in the APS Manuscript Submission system. This FundRef identifier will be included in the article metadata, if published, which may facilitate discovery of the article by anyone who is able to search on that funder name in the FundRef Registry.

FundRef "provides a standard way to report funding sources for published scholarly research. Publishers deposit funding information from articles and other content using a standard taxonomy of funder names. This funding data are then made publicly available through CrossRef's search interfaces and APIs for funders and other interested parties to analyze."

Please see the CrossRef website for more information about the FundRef Registry.

Affiliation

List all departments and institutions in which the work was done, with city and state or country. Identify each author's affiliation by superscript numbers matched to the appropriate institution. Affiliation must reflect the organization(s) supporting the author(s) while the research was done. This may differ from the current affiliations of the author(s), which will be listed in such cases in the Acknowledgments section as the present address(es) of the author(s).

Running Head

The running head is an abbreviated version of the title, which will appear at the top of every page subsequent to the first page. Running heads must not exceed 60 characters including spaces between words.

Address for Correspondence

Only one author may be designated as the corresponding author. A full address for correspondence must be included with a current e-mail address for the corresponding author (an institutional email address or a personal email address that is verifiable in the literature is required). The address of the corresponding author will appear on the first page of the article. Please note that a valid e-mail address is essential to participate in the APS electronic proofing service. Also, provide your phone and fax numbers for use while your article is in production. If the contact information to be used during production differs from that to be included in the final article, indicate this explicitly.

Abstract

A one-paragraph abstract of not more than 250 words must accompany each manuscript. Longer abstracts may be subject to editorial truncation. The abstract should state what was done and why (including species and state of anesthesia), what was found (in terms of data, if space allows), and what was concluded. Even for short editorial-style articles, a brief "abstract" should be provided, if only to identify the topic (e.g., "This is an editorial summarizing recent new developments in physiology.").

Graphical Abstract

Note: These are currently optional for Physiological Reviews and required for American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. Other APS journals do not allow graphical abstract submission at this time.

In addition to a text abstract, authors should submit a graphical abstract—a single, concise, informative, visual summary of the main findings of the article. The graphical abstract will appear in the PDF of the ahead-of-print version and at the beginning of the final HTML version of the article. It may also be used to promote the research on social media platforms.

A graphical abstract should allow readers to quickly gain an understanding of the main message of the paper in a visually appealing way. It is intended to encourage browsing and help readers identify which papers are most relevant to their research interests.

The graphical abstract can be a new image or a key figure from the original paper that clearly summarizes the content.

The graphical abstract should

be schematic, demonstrating the mechanistic findings of the research (a drawing, diagram, graph, etc.)

be simple

be original—no trademark or copyright images

use color

use text sparingly, mainly for labels

read from top down or left to right

Image Specifications

Size: Use a 4:3 ratio for your image (optimal: 40 x 30 picas / 6.5 x 5 inches / 17 x 13 cm / 2000 x 1500 px)

Font: Use one sans serif font (such as Arial or Helvetica) consistently, 10–14 points

File type: EPS, AI, PPT, TIFF, PSD, or PDF (preferred)

Resolution: The image should have a minimum resolution of 300 dpi.

Color: RGB mode

Please do not include a heading "Graphical Abstract" within the image file.

Video Abstract

Note: These are currently available only for American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.

Video abstracts can increase the visibility of our authors' research. Using video, authors can go outside of the written article to convey their research and reach a wider audience. A link to the video will reside with the article abstract and will also be uploaded to the APS YouTube Channel.

Guidelines:

Please keep the video to no longer than four minutes.

The video should introduce the article topic, highlight the main points, and discuss future potential developments as a result of the work.

The video should introduce the article topic, highlight the main points, and discuss future potential developments as a result of the work.

Authors should speak clearly and slowly during the presentation. Be sure that you are close enough to the microphone that your voice is easily heard in the audio.

The presentation should be understandable to users outside of the immediate field of the article.

Usage of lab footage or other relevant material is encouraged.

Please do not use copyrighted images or music in the video, as rights permissions can get complicated.

If using text, please make it large enough to read on screens.

If you are using PowerPoint slides, please ask the journal's editorial office to supply you with an APS-branded template for the opening and closing slides.

Before sending it to us always view the video yourself to ensure it is of adequate quality—that it is easy to see and hear everything on the video.

Video Specifications

Because all video abstracts will be included in our YouTube Channel, please supply the highest quality video possible in a YouTube-supported format with the maximum suggested resolution and bitrate.

Minimum specifications are as follows:

File size: 100 MB maximum

Frame rate: 25–30 frames per second

Aspect ratio: 16:9 or 4:3, deinterlaced

Format: .mov, .mpg, .avi, or .mp4 (.mp4 preferred)

Frame size: 320 x 240 pixels or greater

Video codec: H.264, mp2, mp4

Video bitrate: 480–2672 Kbps

Audio codec: 16-bit AAC

Audio bitrate: 128–192 kbps

Please verify that all videos are viewable in QuickTime before submission.

New & Noteworthy

Participating Journals: AJP-Heart (AHeart), Journal of Applied Physiology (JAPPL), Journal of Neurophysiology (JN), AJP-Gastrointestinal (AGI), and Advances (ADV).

New & Noteworthy is a brand of annotation summarizing what is new about an author's original research. Only authors submitting research articles to APS participating journals (see above) should submit their annotation in the online EJPress submission form field, ensuring that the exact statement also appears in their final submitted manuscript after Abstract and Keywords.

Specifications:

WORD LIMIT: 75 words for AHeart, JAPPL, JN, AGI, and ADV.

AHeart, JAPPL, JN, AGI

Annotations apply only to Original Research Articles, Innovative Methodologies, and Rapid Reports.

Annotations appear in final published articles and the journal table of contents.

Branded "New & Noteworthy"

ADV

Annotations apply to all articles in the journal.

Snapshot statement is solely posted on the journal's Facebook page with a link back to the published

article.

Keywords

Include three to five words or short phrases relevant to the article.

Main Text

Introduction

Provide a brief overview of the scope and relevance of the study, especially with regard to previous advancements in related fields.

Materials and Methods

Describe techniques, cell/animal models used (including species, strain, and sex), and lists of reagents, chemicals, and equipment, as well as the names of manufacturers and suppliers, including URLs for those supplies obtained online and Research Resource Identifiers (RRIDs), so that your study can be most easily replicated by others. For studies involving humans, the sex and/or gender of participants must be reported. Also in this section, describe the statistical methods that were used to evaluate the data. If clinical trials were used, a statement of registration is required; also, for all investigations involving humans or animals, a statement of protocol approval from an IRB or IACUC, or an equivalent statement, must be included (see Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings). All animal or human studies must contain an explicit statement that the protocols were submitted to, and approved by, an institutional review board or committee or that the protocols were performed under a license obtained from such a committee, board, or governing office.

See Experimental Details to Report in Your Manuscript for more information.

See Abbreviations, Symbols, and Terminology for style information.

See Data Repository Standards for information on reporting experimental resources.

Results

Provide the experimental data and results as well as the particular statistical significance of the data. See Promoting Transparent Reporting for more information.

APS has published an editorial on the use of statistics, and authors are encouraged to consult it.

Advances in Physiology Education supports adherence of two of the 2004 Guidelines for Reporting Statistics:

Guideline 5. Report variability using a standard deviation. If the standard deviation is not a meaningful estimate of variability, as when the data are skewed, then the range or interquartile range provide more meaningful estimates. Report a standard deviation with notation of this form: 90 mmHg (SD 10).

Guideline 7. Report a precise P value. The sequel to the 2004 Guidelines (see Table 2) offers the appropriate precision for rounding P values.

Discussion

Sometimes combined with the results in a section called "Results and Discussion". Explain your interpretation of the data, especially compared with previously published material cited in the References.

Appendix

An Appendix may be included (and is often helpful) in mathematical modeling or computational papers, e.g., to provide details of a solution strategy.

Glossary

A glossary may be included in equation-laden articles with many different symbols (such as mathematical modeling or computational papers), specifying the units (and/or dimensions) as well as each definition. The glossary will appear after the Discussion (or after any Appendixes) and before the Acknowledgments. See this article for an example.

Acknowledgments

The Acknowledgments section is where you may wish to thank people indirectly involved with the research (e.g., technical assistance; gifts of samples, reagents, or cell lines; loans of equipment or laboratory space; comments or suggestions during the creation of the manuscript). However, it is important that anyone listed here know in advance of your acknowledgement of their contribution, as documented during the submission process. Current addresses of authors (which may differ from those in the affiliation line) may be included here.

Do not include "promissory notes." APS Journal policy is against inclusion of implicit or explicit promises that future work will be published.

Do not include dedications (e.g., to persons living or deceased). Dedications of articles are not permitted.

List the grants, fellowships, and donations that funded (partially or completely) the research. However, industry-sponsored grants should be listed under Disclosures.

Grants

List the grants, fellowships, and donations that funded (partially or completely) the research. However, industry-sponsored grants should be listed under Disclosures.

Disclosures

Authors are required at the time of submission to disclose any perceived or potential conflict of interest, financial or otherwise. See Author Conflict of Interest. If the article is accepted for publication, information on the perceived or potential conflict of interest, or lack thereof, must be noted in the Disclosures section.

Footnotes

The footnotes section is the place to list any additional items pertinent to your article. Footnotes should be numbered consecutively throughout. They should be assembled on a separate page at the end of the article.

Endnotes

The Endnotes section includes information for non-peer-reviewed data that may be available to readers from an institutional web site or repository.

Citing Unpublished Observations, Personal Communications, and "In Press" Manuscripts

Submitted papers still in preparation or in peer review and/or any other unpublished materials, observations, or personal communications cannot be included in the reference list, which may only list published work. However, such material can be cited in the text, but at submission, authors will be required to confirm that all individuals acknowledged in the manuscript are aware that they are being acknowledged and approve of the manner and the context of the acknowledgement. This includes, but is not limited to the following circumstances:

to publish information disclosed in a personal communication or unpublished observation;

to recognize additional individuals who helped in preparation of the manuscript;

for permission from a copyright holder to discuss information that has been accepted for publication but is "in press" and not yet available, online or otherwise.

For both unpublished observations and personal communications, provide the cited person's last name and all initials.

Figure Captions

Every figure must have a caption, which describes to the reader in sentence form, the relevant details of the figure, placing it in the proper context of the manuscript. These textual figure captions must be listed in order in the manuscript, following the reference list.

See Promoting Transparent Reporting in APS Publications to Enhance Data Reproducibility for more information.

Tables

Whenever possible, authors are encouraged to submit figures rather than tables. Statistical summary tables should be submitted when possible, rather than tables with many lines of individual values. Lengthy tables of data that cannot be presented in a suitable manner, according to APS standards of print publication, may be extracted and set as a supplement to the online article. These supplements remain an integral part of the article for the reader, as text referring to these tables will remain in the article, and links directly to the supplements will be embedded and prominently indicated at all points

of entry to the online article (see Data Supplements).

Submitted tables should adhere to the following guidelines:

Tables must not duplicate material in text or figures.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and prepared with the size of the journal page in mind: 3.5 in. wide, single column; 7 in. wide, double column.

Each table should have a brief title; explanatory notes should be in the legend, not in the title.

Nonsignificant decimal places in tabular data should be omitted.

Short or abbreviated column heads should be used and explained if necessary in the legend.

Statistical measures of variations, SD, SE, etc., must be identified. (Example: "Values are means \pm SE.")

Table footnotes should be listed in order of their appearance and identified by standard symbols: *, †, ‡, § for four or fewer; for five or more, consecutive superscript lowercase letters should be used (e.g., a, b, c, etc.).

Equations

Manuscripts with many mathematical characters and equations should be prepared using MathType version 6.0 or higher (available from Design Science, Inc.). Manuscripts with a minimal amount of math may be prepared using word-processing tools such as Microsoft Word Equation Editor, or with features such as bold, italics, superscript and subscript together with characters in the Symbol or Greek fonts. Do not use the Wingdings or Webdings fonts. Please do not submit equations as images. Inline math text that can be regular text (e.g., $x^2[n - 2]$) should be provided as such. Please do not set these as MathType.

Mathematical equations should be simplified as much as possible and carefully checked.

Use the slant line (/) for simple fractions $(a + b)/(x + y)$ in the text rather than the built-up fraction $a + b[\text{over}]x + y$, which should only be used if the equation is offset from the text.

Use subscripts or superscripts wherever feasible and appropriate to simplify the equations.

Please use notation that is consistent with the standard nomenclature in applied mathematics. As an aid to the reader, please state the convention that you are following, especially if it is uncommon.

Symbols should be defined as they first appear in the text. A glossary may be included (and is often helpful) in articles with many different symbols, specifying the units (dimensions) as well as each definition. The Glossary will usually precede the Methods section.

APS style allows punctuation in displayed equations.

Mathematical Models

Presentation of the model(s) must be sufficiently clear to allow physiologists with limited experience in modeling to follow the model development, limitations, and physiological relevance. Assumptions concerning the importance of physiological processes included in the model should be clearly stated.

If the model equation(s) require solution, the method of solution should be described in sufficient detail to permit readers to duplicate the solution in their own laboratories. Algorithms from commercial software libraries should be so identified. Details of the solution strategy may be summarized in an Appendix.

For simulations, sources or estimation methods for all parameter values should be presented and the numerical values given in the text or a table. A sensitivity analysis must be performed for important parameters (covering ranges of values relevant to the manuscript) to determine how the model predictions are affected by numerical parameter values.

If the model is used to estimate parameter values, measures of the uncertainties associated with the estimated parameter values should be presented.

For models intended for use in a predictive setting, validation of the model with a data set not used for model parameter estimation (i.e., cross-validation) is recommended. Sensitivity analysis or parameter uncertainty determination is an important component of modern modeling practice that allows

assessment of the validity of a model.

Results obtained with the model(s) should be compared with appropriate physiological data, either from literature or from new experiments. Simulation results may be examined for prediction of changes or trends in physiological variables similar to those reported for in vitro or in vivo studies. The discussion should include information on the physiological significance of the model study, limitations of the model, and suggestions for new modeling and/or experimental studies.

Articles based on original computer simulation software **Magnifying Glass**

Upon submission of a paper reporting computer simulation using original, author-generated code, authors are encouraged to deposit software and code via a public repository, such as GitHub, if not already deposited to a public repository. A link to the software deposit should be included in the cover letter. Alternatively, authors may submit a working version of their software and computer code as supporting data for access by the reviewers. It will be kept confidential during review, and in case of a negative decision (i.e., rejection).

a. In any case, authors must make available upon request, to editors and reviewers, any previously unreported custom computer code used to generate results that are reported in the paper and central to its main claims. Any practical issues preventing code sharing will be evaluated by the editors, who reserve the right to decline the paper if important code is unavailable.

b. Upon manuscript submission, authors should check the box marked "computer simulation".

Upon manuscript R1 revision (assuming authors are invited by the journal to revise their manuscript), authors should deposit a full working version of their software and computer code to a public website/repository, one that retains original and updated versions of the model and code – if not already deposited publicly – and include the link to the deposited software in the Methods section.

a. Authors must state Terms of Use included with the deposited software. Authors should consult the Intellectual Property owner (usually the author's institution) regarding requirements, if any, for active user compliance agreement to Terms of Use.

b. Original software and code must remain available indefinitely.

c. Updates to the model and code should be reported on the repository site, with comments as to why particular changes were made with the dates of original deposit and each change identified. In this way, published material remains available in its published form, but improvements are also available from the same immediately accessible web-based repository location.

Authors should inform editors about any practical issues preventing public deposit of the computer code and be prepared to make computer code available to readers upon request after publication.

References

Authors are responsible for accuracy of citations. References must be limited to directly pertinent published works or papers that have been accepted for publication. An abstract, properly identified as "Abstract", may be cited only when it is the sole source.

Reference lists should be arranged alphabetically by author and numbered serially. The reference number should be placed in parentheses at the appropriate place in the text.

The style of citation should be as follows, with journal name abbreviated as in Medline, PubMed, and Index Medicus. Appropriate templates for your citation management software are available from the respective company websites (e.g., [EndNote](#)).

The examples given below are shown with numbers because that is the style for most APS Journals, except for the Journal of Neurophysiology (see note, below, after these examples). The first is a standard book reference; the second is a standard reference to an "early view" or "prepress" reference, such as the APS "Articles in PresS" (note the use of the "digital object identifier"—doi—in this citation); the third is a standard journal reference.

1. Pollock DM. Endothelin receptor subtypes and tissue distribution. In: *Endothelin Molecular Biology, Physiology, and Pathology*, edited by Highsmith RF. Totowa, NJ: Humana, 1998, p.1-29.
2. Scarafia LE, Winter A, Swinney DC. Quantitative expression analysis of the cellular specificity

- of HECT-domain ubiquitin E3 ligases. *Physiol Genomics* (April 26, 2001). doi:10.1152/physiolgenomics.00075.2001.
- Villalobos AR, Parmelee JT, Renfro JL. Choline uptake across the ventricular membrane of neonate rat choroid plexus. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C1288-C1296, 1999. MORE [Example References](#)

References for the *Journal of Neurophysiology* should be arranged alphabetically by author. The appropriate author name and year for each reference should be included in parentheses at the proper point in the text using the following style (this is ONLY for the *Journal of Neurophysiology*, NOT for other APS Journals):

- one author (Brown 1982)
- two authors (Brown and Smith 1982)
- three or more authors (Brown et al. 1982).

For the in text citations in the *Journal of Neurophysiology*, here are some other important details. If more than two references are cited by different authors, separate entries with a semicolon (Brown 1982; Smith 1983). If more than two references are cited by the same first author (or single author), use "et al." where appropriate plus the date, even if the subsequent authors are not the same in all the references (Brown et al. 1982, 1983). Note the use of commas between two consecutive years or nonconsecutive years. Do not use dashes for ranges (Brown et al. 1982, 1983, 1986, 1987, 1988). If more than two references with the same year and author(s) are cited, use lowercase letters after the year (Brown 1982a, 1982b). Lowercase letters should be inserted in same-year references in the reference list.

Example References

Journal Articles

- Villalobos AR, Parmelee JT, Renfro JL. Choline uptake across the ventricular membrane of neonate rat choroid plexus. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C1288-C1296, 1999.

Book References

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley, 1995, p. 25-26.
- Pollock DM. Endothelin receptor subtypes and tissue distribution. In: *Endothelin Molecular Biology, Physiology, and Pathology*, edited by Highsmith RF. Totowa, NJ: Humana, 1998.

APS Handbook of Physiology Series

Large textbooks require very specific citation information. For example, the APS Handbooks series contains a huge amount of information, and the inclusion in the citation of the section, volume, part, and chapter is essential to aid the reader in finding the information quickly (please note that the APS chooses not to list editors for the APS Handbooks).

- Kaufman MP, Forster HV. Reflexes controlling circulatory, ventilatory, and airway responses to exercise. In: *Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems. Control of Respiratory and Cardiovascular Systems*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1996, sect. 12, pt. II, chapt. 10, p. 381-447.

Articles Published on the Web

Many more reports than in past years are being published primarily, if not exclusively, on the World Wide Web. Such articles should be cited in the "online" style as shown below. Author/editor (if known). (Revision or copyright date, if available). Title of page [Publication medium]. Page publisher. URL (Protocol://Site/Path/File) [Access date].

1. Dudoit S, Yang YH, Callow MJ, Speed TJ. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments [Online]. Dept. of Statistics, Univ. of California at Berkeley. <http://www.stat.berkeley.edu/users/terry/zarray/Html/matt.html> [3 Sept. 2000].
2. Friedman N, Linial M, Nachman I, Peter D. Using Bayesian networks to analyze expression data [Online]. Stanford University. <http://robotics.stanford.edu/people/nir/Abstracts/FLNP1Full.html> [2000].

Note that the date may be general or specific, to the day. Some citations may have portions published in print and other relevant portions deposited online. However, if directions to the online portions are available in the printed work, this sort of citation should be avoided.

1. Joachims T. Making large-scale SVM learning practical. In: *Advances in Kernel Methods: Support Vector Learning*, edited by Scholkopf B, Burges C, and Smola A. MIT Press, 1999. [The software is available at http://www-ai.cs.uni-dortmund.de/SOFTWARE/SVM_LIGHT/svm_light.eng.html]
2. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 9: 3273-3297, 1998. [The data are available at <http://cellcycle-www.stanford.edu>]

DOIs and Early Publication in Articles in Press

Current technology allows publication of an article in several editions. For example, the final, citable draft of an accepted article may be posted to a web site, pending final copyediting and page layout/design. This initial post to the web qualifies as publication, but eventually the article will reach the readership in a final, polished form. The APS publishes peer-reviewed articles upon acceptance as Articles in Press. These articles may be cited and establish publication's priority before they appear in final print and online forms. (Please note the required use of a "digital object identifier" -- DOI -- in this citation.)

1. Scarafia LE, Winter A, Swinney DC. Quantitative expression analysis of the cellular specificity of HECT-domain ubiquitin E3 ligases. *Physiol Genomics* (April 26, 2001). doi:10.1152/physiolgenomics.00075.2001.

However, once this article has reached its final stage of publication, it will be cited with its new publication data, as follows:

1. Scarafia LE, Winter A, Swinney DC. Quantitative expression analysis of the cellular specificity of HECT-domain ubiquitin E3 ligases. *Physiol Genomics* 4: 147-153, 2001. First published April 26, 2001; doi:10.1152/physiolgenomics.00075.2001.

Technical Documents, Congress Proceedings, etc.

Technical documents, congress proceedings, and some other sorts of material may often be published

by the specific institution that sponsored the research.

1. Efron R, Tibshirani B, Goss V, Chu G. *Microarrays and Their Use in a Comparative Experiment* (Technical Report). Palo Alto, CA: Department of Statistics, Stanford University, 2000.

Corrigenda/Errata

If an article required a correction, after first publication, this should be noted in the citation of the original article.

1. Hallows KR, Packman CH, Knauf PA. Acute cell volume changes in anisotonic media affect F-actin content of HL-60 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 261: C1154-C1161, 1991. (Corrigendum. *Am J Physiol Cell Physiol* 268: March 1995, following table of contents)
2. Steenman M, Chen YW, Le Cunff M, Lamirault G, Varro A, Hoffman E, Leger JJ. Transcriptomal analysis of failing and nonfailing human hearts. *Physiol Genomics* 12: 97-112, 2003. First published November 12, 2002; doi:10.1152/physiolgenomics.00148.2002. (Corrigendum. *Physiol Genomics* 18:128, 2004)

Translations

1. Fritsch G, Hitzig E. Uber die Elektrische. In: *Some Papers on the Cerebral Cortex*, translated and edited by von Bomin G. Springfield, IL: Thomas, 1960, p. 73-96.
2. Gavrilov KA, Perel TS. Earthworms and other invertebrates in the soil under...[in Russian]. *Pochovedenia* 8: 133-140, 1958.
3. Gavrilov KA, Perel TS. Earthworms and other invertebrates in the soil under...[in Russian, English summary]. *Pochovedenia* 8: 133-140, 1958.
4. Vol'Kensktein MV. *Molecules and Life: An Introduction to Molecular Biology*. New York: Plenum, 1970. [Transl. from the Russian.]

Many Authors

It is APS Publications policy to list all authors in a research group. That is, the use of only the first author's name, followed by "et al." is unacceptable.

1. Lander ES et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001.

should read:

1. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx

PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Szustakowski J, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001.

However, if there is an inclusive name for the research group as a whole (as in the case above, the "International Human Genome Sequencing Consortium"), it should be used rather than listing hundreds of authors.

So, for example, it is correct to cite:

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001.