Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

ALEXANDRE JAYME LOPES DANTAS COSTA

EXERCÍCIO AERÓBICO NA DOENÇA DE CHAGAS: Estudo da Remodelação Cardíaca Durante a InfecçãoExperimental em Camundongos.

Belo Horizonte-MG
Julho de 2022

ALEXANDRE JAYME LOPES DANTAS COSTA

EXERCÍCIO AERÓBICO NA DOENÇA DE CHAGAS: Estudo da Remodelação Cardíaca Durante a Infecção Experimental Crônica em Camundongos.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz
Coorientador: Prof. Dr. Artur Santos Miranda

Belo Horizonte-MG,
Julho de 2022

043 Costa, Alexandre Jayme Lopes Dantas.
Exercício aeróbico na Doença de Chagas: estudo da remodelação cardíaca durante a infecção experimental em camundongos [manuscrito] / Alexandre Jayme Lopes Dantas Costa. – 2022.
108 f. : il. ; 29,5 cm.
Orientador: Jader dos Santos Cruz. Coorientador: Artur Santos Miranda.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Doença de Chagas. 3. Cardiomiopatia Chagásica. 4. Contração Miocárdica. 5. Arritmias Cardíacas. 6. Exercício Físico. I. Cruz, Jader dos Santos. II. Miranda, Artur Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis – CRB 6 – 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE N° 359 DE ALEXANDRE JAYME LOPES DANTAS COSTA

Às 14:00 horas do dia 15 do mês de julho de 2022, transmitida via plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Alexandre Jayme Lopes Dantas Costa.** A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz,** orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Antônio José Natali,** CCB/Universidade Federal de Viçosa, **Profa. Dra. Danusa Dias Soares,** EEFFTO/Universidade Federal de Minas Gerais, **Dr. Diego Santos de Souza,** EPM/Universidade Federal de São Paulo, **Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau,** ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz,** ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"Exercício Aeróbico na Doença de Chagas: Estudo da Remodelação Cardíaca Durante a Infecção Experimental em Camundongos".** Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 15 de julho de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Danusa Dias Soares**, **Professora do Magistério Superior**, em 20/07/2022, às 14:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Jader dos Santos Cruz**, **Chefe de departamento**, em 20/07/2022, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau**, **Professor do Magistério Superior**, em 20/07/2022, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Antonio Jose Natali**, **Usuário Externo**, em 21/07/2022, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Diego Santos de Souza**, **Usuário Externo**, em 21/07/2022,

às 17:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1567839** e o código CRC **4C30DCE0**.

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, Simião e Denise, as minhas irmãs, Silvia e Esther e a minha esposa Bárbara.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Jader Cruz, por ter aberto as portas do laboratório, pelo auxilio e treinamento ao longo da minha jornada no doutorado e presença constante e ativa na realização deste trabalho. Você é um exemplo de pesquisador, que espero conseguir seguir. Agradeço também pela confiança depositada em mim e por ter acreditado e comprado a ideia desse projeto. Sem você, nada disso seria possível! Não poderia também de expressar a minha gratidão por além de ser meu orientador, ter se tornado um grande amigo, que com toda certeza, eu quero sempre ter por perto.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Artur Santos Miranda, grande pesquisador, orientador e amigo. Não somente por me orientar e me mostrar caminhos, mas também pelos conselhos e pela disponibilidade e paciência em ensinar. E também pelas conversar não-científicas e os momentos de descontração que com toda certeza, tornaram a realização desse experimento mais leve. Você é um pesquisador ao qual eu admiro e pretendo seguir seus passos.

Aos meus pais Simião e Denise que por tantas vezes abdicaram dos seus sonhos para que os nossos se tornassem realidade. Muito obrigado pelo amor, dedicação e pelo carinho e preocupação. Vocês são a base dessa conquista. Às minhas irmãs Esther e Silvia, por todo amor, sinceridade, companheirismo e palavras de incentivo.

À minha esposa Bárbara por sempre estar ao meu lado em todos os momentos dessa e de outras trajetórias. Obrigado por compreender e respeitar os momentos em que precisei me ausentar, seique foram muitos. Por me motivar quando ninguém mais poderia e me mostrar as coisas boas atémesmo onde não havia, sempre com uma palavra de animação e conforto. Pelo carinho, zelo e cuidado comigo e com a gente. Faltariam espaços aqui para o tanto que tenho para te agradecer, mas queria pelo menos dizer que sou muito grato por você fazer parte da minha vida. Ah, essa vitória é nossa!

Aos amigos Pedro e Ivan pela presença, paciência, cuidado com os animais, ensinamentos, contribuições, momentos de descontração e pela disponibilidade de estar sábados e domingos no laboratório ajudando no processo da construção desse trabalho. A vocês, meu imenso muito obrigado.

Aos amigos(as) Gabriela, Catarina, Daniel, Mariana, Julliane, Paula, Mayra, Diego e Aimée pelas trocas de experiências, pela incessante e incansável ajuda na realização deste trabalho e pelos excelentes momentos vividos.

Ao prof. Dr. Danilo Roman-Campos pela disponibilidade em ajudar, pela troca de conhecimento e aprendizado. Principalmente por gentilmente permitir que seus alunos fizessem parte da realização das etapas de experimentos desta tese.

Ao Prof. Dr. Renato de Lima, à Prof. Dra. Ana Caetano e à Prof. Marilia Martins por disponibilizar a estrutura de seus laboratórios e equipamentos utilizados na realização dos

experimentos desse projeto.

Ao Silvio, técnico do biotério da fisiologia pela paciência e disponibilidade do seu tempo para o cuidado com os animais.

Ao laboratório de Membranas Excitáveis (LAMEX), minha segunda casa, por toda estrutura para realização deste trabalho.

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

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia.

Aos animais experimentais, que merecem todo o respeito e gratidão.

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

Apoio Institucional e financeiro

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Membranas Excitáveis (LAMEX- Prof. Dr. Jader Cruz), situado no Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, em colaboração com os Laboratório de CardioBiologia (Prof. Dr. Danilo Romam-Campos), situados no Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina. Colaboração com o Prof. Dr. ArturSantos Miranda, situado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, com o Laboratório de Toxicologia Veterinária (Prof. Dra. Marilia Martins Melo) e o Laboratório de Patologia Molecular (Prof. Dr. Renato de Lima Santos), situados no Departamento de Clinica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG

Os experimentos envolvendo microscopia foram realizados no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), do ICB, UFMG.

Esta tese teve apoio financeiro das seguintes instituições:

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
2. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Painel superior (CAPES)
3. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado deMinas Gerais (FAPEMIG).

Resumo

A doença de chagas é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* e é uma das doenças negligenciadas da América do sul, reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Descoberta em 1909 por Carlos Chagas, a fisiopatologia da doença pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica. Na fase aguda ocorre uma grande expansão do número de parasitos, comativação crônica do sistema imune e indução de uma intensa miocardite. Com a progressão da doença, na fase crônica, a lesão miocárdica imunomediada pode levar à fibrose miocárdica intersticial em todo o miocárdio com consequente agravo das arritmias cardíacas e levar à morte. Atualmente, o tratamento da doença crônica é baseada em amenizar os sintomas. Dessa forma, é feita de maneira não específica e de acordo com as diretrizes de outras cardiopatias, o que torna as abordagens ineficientes. Evidencias tem demonstrado que o exercício físico moderado representa um fator de resistência ao desenvolvimento de infecções causadas por protozoários em animais e humanos, atuando como estimulador da resposta imunológica no controle da infecção pelo *T. cruzi*, podendo ser uma terapia não farmacológica eficaz na doença de Chagas. O objetivo deste trabalho é explorar o potencial do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada realizado pré infecção e mantido pós infecção como possível terapêutica na cardiopatia chagásica, investigando as bases celulares e sistêmicas associadas na modulação da progressão da infecção experimental com *T. cruzi*. Utilizamos camundongos machos da linhagem Balb/c que foram separados aleatoriamente em quatro grupos, controle sedentário, chagas sedentário, controle treinado, chagadas treinado. Os animais dos grupos treinados foram submetidos a um protocolo de treinamento aeróbico de 16 semanas, 5 dias por semana, 1 hora por dia, com intensidade de 60% da velocidade máxima de corrida. Ao final da 8º semana os animais foram infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. O treinamento físico de intensidade moderada foi capaz de diminuir o pico da parasitemia e reduzir drasticamente a mortalidade dos animais infectados. Como consequência, observamos uma diminuição no perfil inflamatório e aumento na ocupância dos cardiomiócitos nos animais treinado infectado em comparação com os sedentários infectado. O treinamento físico também melhorou a capacidade aeróbica, impediu a perda de peso e melhorou os parâmetros eletrofisiológicos e contrátil, reduzindo a alternância do PA e diminuindo as arritmias cardíacas em cardiomiócitos isolados de animais treinado. De maneira conjunta, os resultados apresentados nesse trabalho irão contribuir para a elucidação dos efeitos do treinamento físico nas propriedades eletromecânicas na doença de chagas em cardiomiócitos isolados. Além disso, foi possível demonstrar os efeitos benéficos do treinamento físico e assim, propor novas estratégias que irão contribuir para a redução das arritmias típicas

da DC, bem como a influência do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada na progressão dessa doença.

Palavras chaves: Cardiomiopatia chagásica, treinamento físico, excitabilidade, contratilidade, arritmias, Doença de Chagas.

Abstract

Chagas disease is caused by the parasite Trypanosoma cruzi, and is one of the neglected diseases of South America, recognized by the World Health Organization (WHO). Discovered in 1909 by Carlos Chagas, the pathophysiology of the disease can be divided into two phases, acute and chronic. In the acute phase there is a large expansion of the number of parasites, with chronic activation of the immune system and induction of intense myocarditis. With disease progression, in the chronic phase, the immune-mediated myocardial injury can lead to interstitial myocardial fibrosis throughout the myocardium, with consequent worsening of cardiac arrhythmias and death. Currently, the treatment of the disease is based on alleviating the symptoms. This is done in a non-specific manner and according to the guidelines of other heart diseases, which leads to general and non-specific approaches. Moderate physical exercise is known to induce resistance to infections caused by protozoa in animals and humans, working as a stimulator of immune response in the control of infection by *T. cruzi*, and may be an effective non-pharmacological therapy in Chagas disease. This study explores the potential of moderate intensity aerobic physical training performed pre-infection and maintained post-infection as a possible therapy in Chagas' disease, investigating the cellular and systemic bases associated in modulating the progression of experimental infection with T. cruzi. Experimental infection was carried out in Balb/c mice, randomly separated into four groups, sedentary control, sedentary chagas, trained control, trained chagas. Trained mice were subjected to a 16-week aerobic training protocol, 5 days per week, 1 hour per day, at an intensity of 60% of maximum running speed. At the end of the 8th week the animals were infected with the Colombian strain of *T. cruzi*. Moderate intensity physical training was able to decrease the parasitemia peak and reduce the mortality of infected animals. As a consequence, we observed a decrease in the inflammatory profile and increase in cardiomyocyte occupancy in the trained infected animals compared to the sedentary infected ones. Physical training also improved aerobic capacity, prevented weight loss, and improved electrophysiological and contractile parameters in isolated cardiomyocytes, reducing AP alternans, which correlates with decreasing the appearance and severity of cardiac arrhythmias in trained animals. Together, the results presented in this work will contribute to the elucidation of the effects of physical training on the electromechanical properties in isolated cardiomyocytes in Chagas disease. Moreover, it was possible to demonstrate the beneficial effects of physical training and thus, to propose new strategies that will contribute to the reduction of arrhythmias typical of CD, as well as the influence of moderate intensity aerobic physical training in the progression of this disease.

Keywords: Chagas' cardiomyopathy, physical training, excitability, contractility, arrhythmias, Chagas' disease.

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxo sanguíneo e anatomia básica do coração.....19
Figura 2: Sistema de condução elétrica do coração.....22
Figura 3: Correlação eletrocardiograma e eventos elétricos no coração.....24
Figura 4: Potencial de ação cardíaco ventricular de humanos e camundongos.....26
Figura 5: Representação do musculo estriado esquelético cardíaco. 28
Figura 6: Esquema representativo do processo de acoplamento excitação contração cardíaco. 30
Figura 7: Via de sinalização β-adrenérgica nos cardiomiócitos. 31
Figura 8: Distribuição global dos casos de infecção por *Trypanossoma cruzi*.....34
Figura 9: Curso natural da doença de Chagas. 40
Figura 10: Modelo para diferenciação das células Th das células das células TCD4^{+} *naive*..... 42
Figura 11: Traçado representativo de uma contração celular..... 52
Figura 12: Traçado representativo da imagem de fluorescência para o transiente $[Ca^{2+}]_i$..... 53
Figura 13: Efeitos do treinamento físico na parasitemia e mortalidade durante a fase crônica da doença de Chagas..... 56
Figura 14: Efeito do treinamento físico no peso corporal durante a fase crônica da doença de Chagas..... 57
Figura 15: Papel do exercício físico na capacidade aeróbica durante a fase crônica da doença de Chagas..... 58
Figura 16: Efeito do treinamento físico na histopatologia durante a fase crônica da doença de Chagas..... 59
Figura 17: Efeito do treinamento físico no eletrocardiograma (ECG) durante a fase crônica..... 60
Figura 18: Efeito do treinamento físico nas propriedades do potencial de ação em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas 62

Figura 19: Papel do treinamento físico na alternância da duração do potencial de ação em cardiomiócito do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas..... 64
Figura 20: Papel do treinamento físico na atividade espontânea do potencial de ação em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas..... 66
Figura 21: Efeito do treinamento físico na dinâmica de cálcio dos cardiomiócitos durante a fase crônica da doença de Chagas..... 67
Figura 22: Efeito do treinamento físico na contratilidade celular dos cardiomiócitos durante a fase crônica da doença de Chagas..... 69

I. Lista de Tabelas

Tabela 1: Protocolo de treinamento.....50

Sumário

1. Introdução.....18
1.1. Estrutura anatômica do coração.....18
1.2. Ciclo Cardíaco. 19
1.3. Excitabilidade cardíaca 20
1.4. Potencial de ação cardíaco. 24
1.5. Bases celulares e moleculares da contração do musculo cardíaco. 27
1.6. Acoplamento excitação-contração cardíaco. 29
2. Doença de Chagas. 32
2.1. Histórico. 32
2.2. Epidemiologia 33
2.3. Etiologia 34
2.4. Patogênese.....35
2.5. Resposta imunológica 40
2.6. Tratamento. 43
2.7. Treinamento Físico. 45
3. Objetivo.....47
3.1. Objetivo específico. 47
4. Materiais e Métodos.....47
4.1. Animais de experimentação. 47
4.2. Infecção. 48
4.3. Familiarização à corrida em esteira rolante. 48
4.4. Teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga. 31
4.5. Medidas de consumo de oxigênio. 48
4.6. Protocolo de treinamento físico. 49
4.7. Isolamento dos cardiomiócitos. 49
4.8. Experimento de contratilidade celular. 50
4.9. Microscopia confocal. 51
4.10. Histologia 52
4.11. Eletrocardiograma. 53
4.12. Experimento de Patch-clamp. 54
4.13. Análise estatística 54
5. Resultados. 55
5.1. Efeito do treinamento físico na parasitemia e mortalidade durante a fase crônica da doença

de Chagas. 55
5.2. Efeitos do treinamento físico no peso corporal durante a fase crônica da doença de Chagas 56
5.3. Papel do treinamento físico na capacidade aeróbica durante a fase crônica da doença de Chagas. 57
5.4. Efeitos do treinamento físico na histopatologia durante a fase crônica da doença de Chagas. 58
5.5. Efeitos do treinamento físico no eletrocardiograma (ECG) durante a fase crônica da doença de Chagas. 60
5.6. Papel do treinamento físico nas propriedades do potencial de ação em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas. 61
5.7. Efeito do treinamento físico na alternância da duração do potencial de ação em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas. 63
5.8. Papel do treinamento físico na atividade espontânea do potencial de ação em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas. 65
5.9. Efeito do treinamento físico no manejo intracelular de cálcio dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas. 67
5.10. Efeito do treinamento físico na contratilidade dos cardiomiócitos durante a fase crônica dadoença de Chagas. 68
6. Discussão. 69
7. Conclusão. 82
8. Referência Bibliográfica 83

1. Introdução

1.1 Estrutura anatômica do coração de mamíferos

O coração, órgão central do sistema circulatório, funciona como bomba contrátil-propulsora que bombeia o sangue para a rede vascular, que compõe a circulação sanguínea. Desse formar, possibilita que o suprimento sanguíneo chegue a todas as partes do corpo, satisfazendo às demandas metabólicas do organismo através da distribuição de nutrientes e oxigênio, bem como sendo responsável por transportar os resíduos do metabolismo para os sistemas excretores (Bass and Takahashi 2010). Estas funções de transporte são possíveis graças à atividade contrátil do coração(Torrent-Guasp 1998, Hall 2011).

O coração de mamíferos é composto por quatro câmaras que incluem dois átrios e dois ventrículos. O septo interatrial está localizado entre ambos os átrios, separando-os em esquerdo e direito. Já o septo interventricular está localizado entre os ventrículos, separando-os em esquerdo e direito. O átrio direito (AD) é ligado ao ventrículo direito (VD) pela válvula tricúspide que impede o refluxo de sangue do VD para o AD, enquanto que o átrio esquerdo (AE) é ligado ao ventrículo esquerdo (VE) pela válvula mitral, que impede o retorno do sangue do VE para o AE. O VE recebe sangue arterial rico em oxigênio (O_2) do AE e bombeia, através da aorta, em alta pressão, para a circulação geral, enquanto que o VD recebe sangue venoso do AD e ejeta-o para a circulação pulmonar através do tronco pulmonar, que se divide em artérias pulmonares direita e esquerda (Torrent-Guasp, Buckberg et al. 2001, Martins 2015).

O coração conta com quatro grupos de válvulas, importantes estruturas que direcionam o fluxo sanguíneo através das câmaras cardíacas. As válvulas semilunares, denominadas valva pulmonar e valva aórtica, estão localizadas na saída do tronco pulmonar e na saída da artéria aorta, respectivamente. Há também as válvulas atrioventriculares, denominadas valva tricúspide e mitral. Essas estruturas são responsáveis por impedir o refluxo de sangue para os átrios durante a contração ventricular ou dos vasos para os ventrículos durante o período de relaxamento(Curi and Araújo Filho 2009, Conti 2015). Portanto, toda essa estrutura cardíaca limita a mistura do sangue arterial com o sangue venoso, já que não há comunicação direta entre o lado direito e esquerdo do coração. Um esboço do coração é apresentado na figura 1.

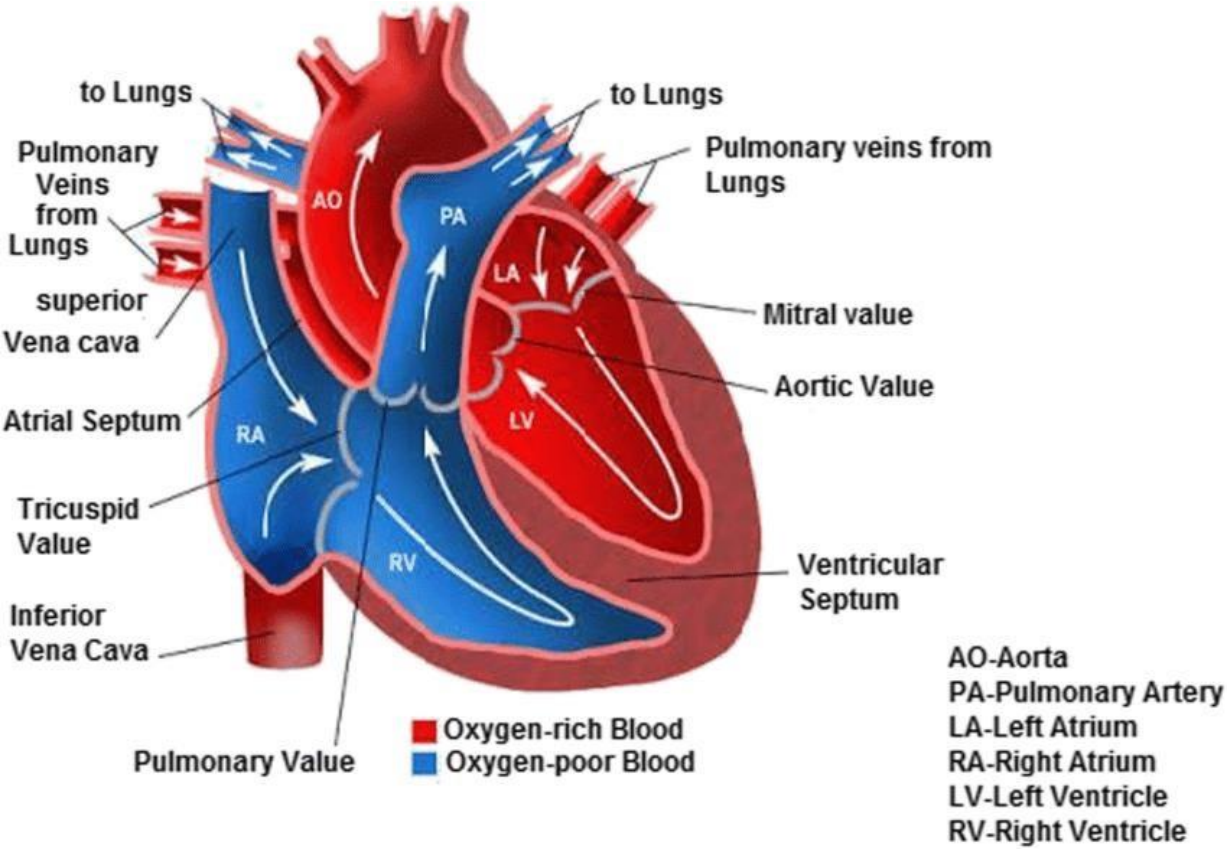

Figura 1**.** Fluxo sanguíneo e anatomia básica do coração. Fonte: (Prabhu, Kuppusamy et al. 2020)

1.2 Ciclo cardíaco

O ciclo cardíaco representa o conjunto de eventos elétricos e mecânicos que ocorrem ao longo de um batimento, que compreende o período de relaxamento, chamado de diástole, durante a qual o coração se enche de sangue, seguido pelo período de contração, chamado de sístole(Curi and Araújo Filho 2009). O tempo médio da duração de um ciclo cardíaco é em torno de 0,8 segundos, dos quais 0,3 segundos são destinados à sístole ventricular e 0,5 segundos para a diástole, porém, esses tempos são fortemente afetados pela modulação da frequência cardíaca, ou seja, se a frequência cardíaca aumenta, o tempo de duração de cada ciclo cardíaco diminui(Conti 2015).

Para melhor compreensão do ciclo cardíaco, começaremos pela diástole, período caracterizado logo após a sístole, onde os ventrículos acabaram de ejetar parte do sangue contido em seu interior e começa a fase de relaxamento ventricular, caracterizado pelo fechamento das valvas aórtica e pulmonar, queda da pressão intraventricular esquerda e direita, sem alteração do volume ventricular, caracterizando o período conhecido como relaxamento isovolumétrico. Nessa fase, devido à assincronia de contração do atrioventricular, os átrios já estão relaxados e prontos para receber o sangue venoso, ou seja, concomitante com o relaxamento ventricular,

acontece o enchimento atrial através do recebimento de sangue pelas veias cava inferior, veia cava superior e seio coronário para o átrio direito (sangue venoso proveniente da circulação sistêmica). As veias pulmonares trazem sangue arterial proveniente da circulação pulmonar para o átrio esquerdo(Hall 2011). À medida que recebem o sangue, a pressão nos átrios é aumentada até atingir valores suficiente para abertura das valvas atrioventriculares, promovendo a passagem de sangue passivamente para os ventrículos. Somado a isso acontecendo a contração atrial, que é responsável por ejetar um volume sanguíneo adicional para os ventrículos, contribuindo com cerca de 30% do volume de sangue do débito sistólico final do ventrículo(Gavaghan 1998).

Ao término da diástole, o coração prepara-se para ejetar o sangue recebido na fase anterior, fase chamada de sístole ventricular. Nesse momento os ventrículos estão repletos de sangue e a pressão em seu interior reflete a pressão diastólica final, o músculo cardíaco inicia sua contração vencendo a pressão nos átrios e fechando as valvas atrioventriculares. Como o ventrículo ainda não atingiu níveis pressóricos suficientes para vencer a pressão na aorta/pulmonar, a contração nesse momento não é suficiente para abrir as valvas semilunares, sendo assim o volume de sangue permanece no ventrículo denotando a fase de contração isovolumétrica, novamente todas a valvas estão fechadas, impedido o refluxo de sangue para os átrios. Na sequência, as pressões ventriculares vencem as pressões aórtica e pulmonar, abrem-se as valvas semilunares e o sangue é ejetado dos ventrículos de maneira abrupta, determinando a fase de ejeção rápida. À medida que o sangue vai sendo ejetado as pressões nos vasos da base (artéria aorta e pulmonar) vai aumentando e diminuindo então a velocidade do fluxo da ejeção determinando o período de ejeção lenta. Terminada a sístole, o coração se prepara para a diástole novamente completando um ciclo que se repete a cada batimento(Pazin-Filho, Schmidt et al. 2004).

1.3 Excitabilidade cardíaca

O coração dispõe de um sistema especializado em gerar impulsos elétricos, que provoca as contrações rítmicas do miocárdio e conduzem impulsos elétricos de maneira rápida para todo coração através de estruturas especializadas que constituem o eixo do sistema de condução cardíaco. Esse sistema inicia o impulso elétrico o qual permite regular a força e a frequência dos batimentos cardíacos, resultando em uma contração sincronizada dos átrios e ventrículos. O estimulo inicial nó sinusal (sinoatrial, NSA), localizado na junção da veia cava superior com o AD e foi descrito pela primeira vez por Keith e Flack em 1907 (Keith and Flack 1906). O NSA é considerado o marca-passo primário do coração devido ao fato dessas células manifestarem despolarizações espontâneas que são capazes de desencadear potenciais de ação de forma rítmica sem a necessidade de estimulação externa, sendo essa frequência de autoestimulação denominada

frequência intrínseca do coração(Boineau, Schuessler et al. 1978, Betts, Roberts et al. 2003, Padala, Cabrera et al. 2021). Um outro componente do sistema foi descrito pela primeira vez em 1906 pelo patologista japonês Sunao Tawara (Tawara 1906), que observou miócitos especializados que constituem o eixo de condução átrio-ventricular . Esse eixo de condução compreende o nó átrio-ventricular (NAV) que dá origem ao feixe de condução no coração, chamado feixe de His. Esse feixe passa através de um orifício inferior ao nível do esqueleto fibroso do coração para o septo interventricular onde se divide e forma o ramo direito e ramo esquerdo. Estes ramos estendem-se sob a estrutura do endocárdio de ambos os lados do septo interventricular até à região apical dos ventrículos direito e esquerdo. As ramificações inferiores e terminais dos ramos do feixe de His dão origem aos ramos mais inferiores denominados por rede de Purkinje(Sigg, Iaizzo et al. 2010, Conti 2015).

O processo de estimulação elétrica do coração, que dura em média 0,19 segundos começa com o processo de auto-despolarização das células do no NSA e uma onda despolarizante se propaga pelo átrio direito e através do feixe de Bachmann é conduzido até o átrio esquerdo, ocasionando a contração atrial. Ao final da despolarização atrial, através de vias intermodais, o sinal excitatório alcança o NAV. Interessante destacar que o NAV também possui capacidade auto-estimulatória, porém possui frequência reduzida de disparos quando comparada ao NSA (± 50 pulsos/min. vs. ± 70 pulsos/min., respectivamente), e portanto, o ritmo intrínseco do coração é normalmente dominado pelo NSA. Entretanto, o NAV pode funcionar como um sistema de backup acessório em caso de falha da estimulação sinusal (Katz 2010, Khonsary 2017). Ao passar pelo NAV, os impulsos sofrem uma desaceleração, permitindo que os átrios se contraiam uma fração de segundo antes dos ventrículos, permitindo que a contração atrial termine instantes antes que os ventrículos iniciem a sua contração, possibilitando que a contração atrial e ventricular não ocorra de maneira simultânea, e sim de forma sincronizada(Katz 2010, Smaill, Zhao et al. 2013).

Após a propagação pela região AV, a despolarização segue a via de condução através do feixe de His, que se divide em dois ramos, o ramo direito e ramo esquerdo, levando a estimulação elétrica aos ventrículos direito e esquerdo. Finalmente, a onda despolarizante percorre as fibras de Purkinje, que se divergem penetrando as paredes do miocárdio, transversalmente, do endocárdio ao epicárdico(Wellens 2012). A figura 2 traz a representação esquemática das estruturas do sistema de condução cardíaco.

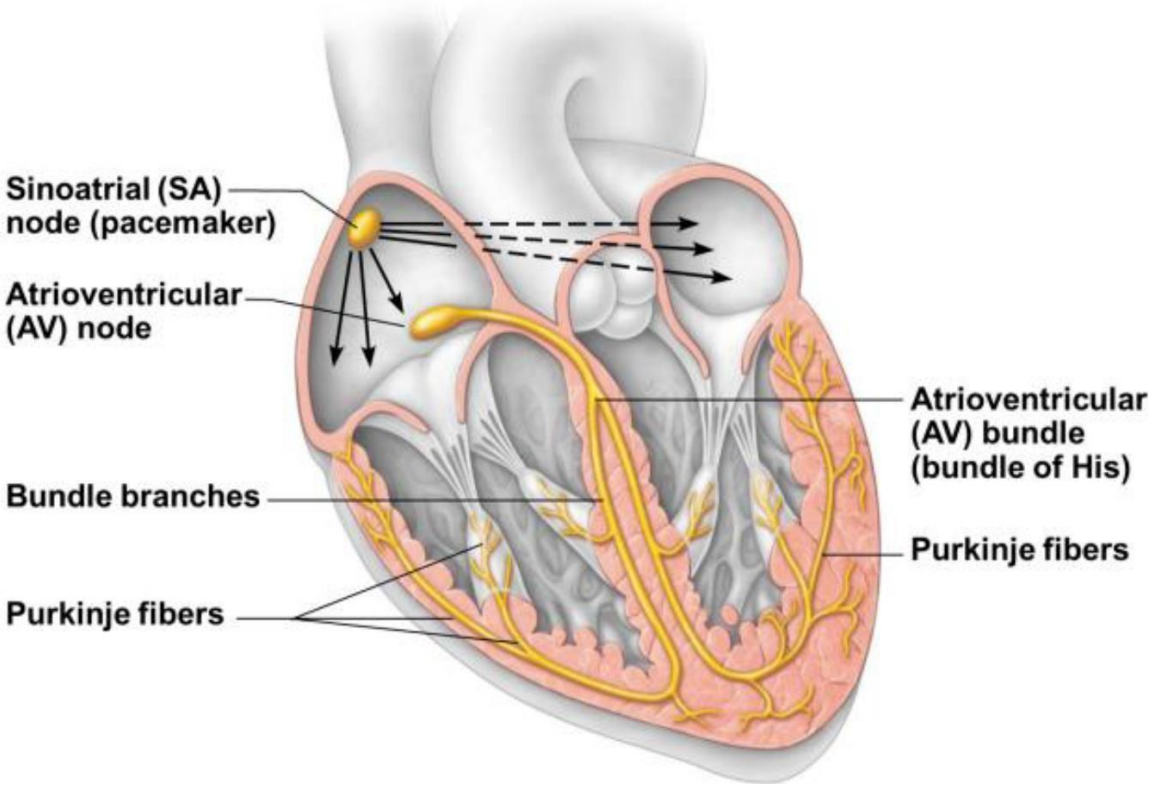

Figura 2. Representação gráfica do sistema de condução elétrica do coração mostrando o nodo sinoatrial, nodo atrioventricular, feixe de His, fibras de Purkinje. Fonte: (Cirillo 2018).

Os processos de despolarização e repolarização geram correntes elétricas que percorrem as membranas das células miocárdicas. A onda resultante dessa atividade elétrica nas células excitáveis cardíacas é capaz de gerar um campo elétrico detectável na superfície corporal, sendo sua atividade passível de mensuração. Assim, o eletrocardiograma (ECG) é uma medida de como a atividade elétrica do coração muda ao longo do tempo à medida que os potenciais de ação se propagam por todo o coração durante cada ciclo cardíaco, medido na superfície corporal(Dupre, Vincent et al. 2005), sendo que o traçado eletrocardiográfico é tipicamente composto pelas ondas P, seguimento PR, o complexo QRS, seguimento ST e a onda T (Figura 3). Esse exame se tornou um teste diagnóstico importante na rotina para detecção de doenças cardíacas.

A onda P representa a despolarização coordenada e sequencial do átrio direito e esquerdo. O segmento PR é a ponte temporal entre a ativação atrial e a ativação ventricular e é medido como a distância entre o início da onda P e o início do complexo QRS. Esse intervalo provê informações sobre o perfil de condução de impulso elétrico intra/interatrial e dos átrios para os ventrículos. É significativo mencionar também que o segmento PR serve de linha de base (também referida como linha de referência ou linha isoelétrica) da curva ECG, onde a amplitude de qualquer

deflexão/onda é mensurada utilizando o segmento PR como linha de base. É importante mencionar que a repolarização atrial ocorre simultaneamente à despolarização ventricular que tem maior amplitude devido à maior massa muscular dos ventrículos, sendo um processo elétrico mais potente (Braunwald 2005, Hall 2011). Dessa forma seu registro eletrocardiográfico fica mascarado. O complexo QRS é formado por três ondas (Q, R e S) representando a despolarização ventricular, desde a região do septo interventricular (onda Q) e inclui tanto o ventrículo direito quanto esquerdo. Em sequência, o segmento ST é o período de tempo em que os ventrículos estão completamente despolarizados e se contraindo. Normalmente é isoelétrico (0 mV). O intervalo QT é medido do início do complexo QRS até o final da onda T, variando com a frequência cardíaca e é o segmento de tempo referente ao início da despolarização ventricular até à repolarização. E por fim, a onda T representa a repolarização ventricular e precede o relaxamento ventricular. Vale ressaltar que nos tecidos adjacentes ao sistema de condução, há a presença de junções comunicantes (junções GAP) que viabilizam o acoplamento elétrico intercelular entre as células do miocárdio, permitindo assim a propagação do estímulo célula a célula. Esta junção mantem a união elétrica e forma uma rede de células comunicantes que garantem a contração conjunta todo o músculo e são chamados sincício funcional (Braithwaite and Al Khalili 2019). A Figura 3 ilustra o registro elétrico de um ciclo cardíaco, com informações dos componentes analisados no ECG.

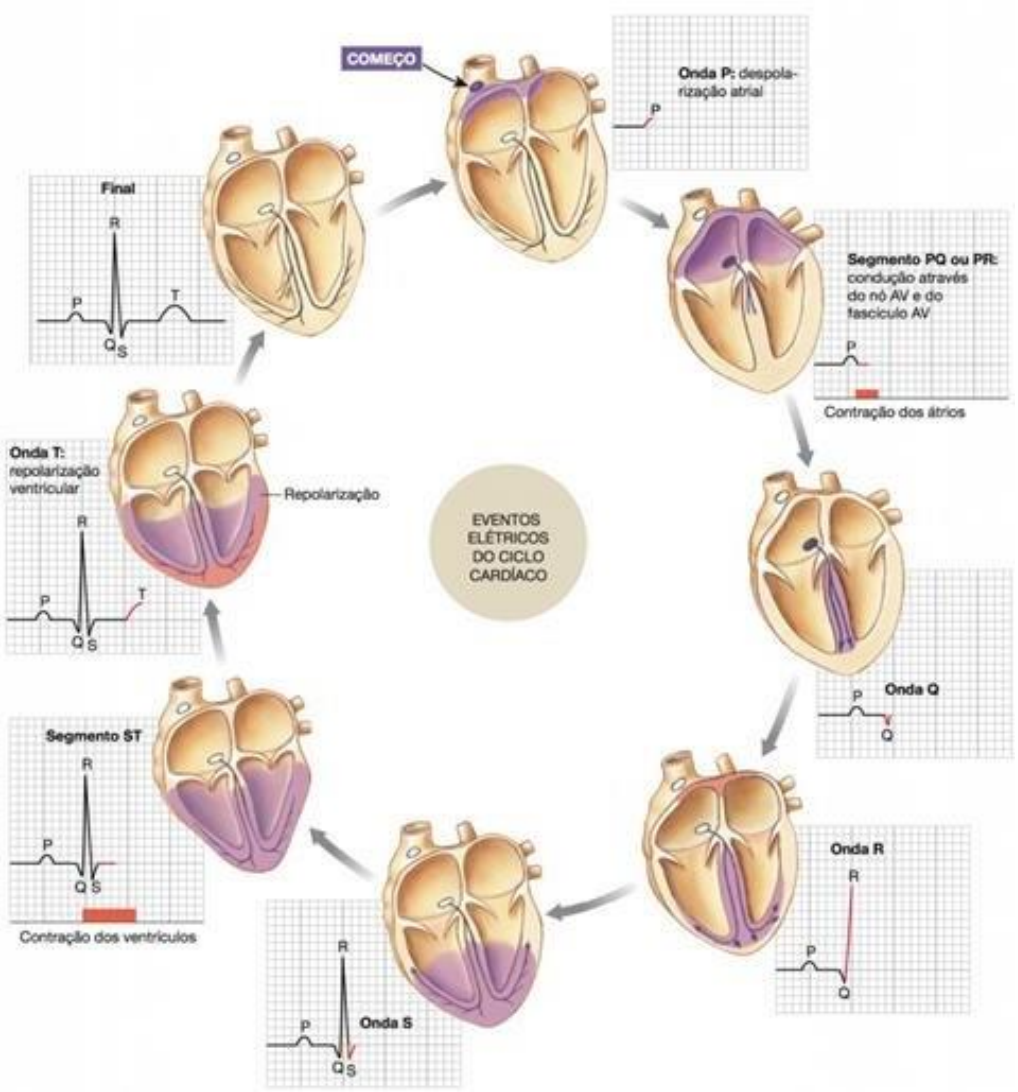

Figura 3**.** Correlação entre o ECG e os eventos elétricos nas diferentes regiões do coração despolarizadas (em roxo) e repolarizadas (em laranja). Fonte: (HALL, de Fisiologia Médica et al. 2011)

1.4 Potencial de ação cardíaco (PA)

A geração do potencial de ação (PA) é um evento de membrana, caracterizado pela alteração conformacional de proteínas transmembranas como os canais iônicos e proteínas transportadoras, o que leva à alteração da condutância dessa membrana à ións permeantes, de acordo com o gradiente eletroquímico para cada íon. As alterações de função dos canais e transportadores pode ser guiado por diversos fatores como a alteração de voltagem transmembrana ou pela interação com moléculas sinalizadoras, estiramento celular, alteração de pH, etc., e o plantel de canais que experimentam diferentes formas de regulação, bem como sua densidade de expressão na membrana determinam o formato de onda do PA em cada tipo de célula excitável. (Hille 1992, Varró, Tomek et al. 2021).

Os canais iônicos podem ser classificados através da propriedade da permeabilidade seletiva para um determinado cátion ou ânion, como por exemplo sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}) (Grant 2009). Também podem ser classificados de acordo com as propriedades de *gating* dos canais, podendo ser os: 1) canais sensíveis à voltagem, 2) dependentes de ligante, 3) ativados por estímulos mecânicos (estiramento). Dentre essas classes, os canais podem ainda ser subdivididos através de suas propriedades farmacológicas em relação a agonistas e antagonistas (Marban, Yamagishi et al. 1998, Terlau and Stühmer 1998). Os canais iônicos sensíveis à voltagem têm papel principal na gênese do PA. O PA cardíaco é dividido em fases, cada uma refletindo os principais movimentos iônicos que ocorrem através da membrana (Hille 1992, Shih 1994). Essas fases são detalhadas a seguir:

Fase 0: É a fase de despolarização cardíaca, caracterizada pela abertura e ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem, cenário que favorece o influxo de íons Na^+ para o meio intracelular gerando a despolarização do potencial de membrana. A despolarização causada na fase 0 também leva à ativação dos canais para Ca^{2+} e K^+. Entretanto os canais de Na+ possuem cinética de ativação mais acelerada, promovendo a despolarização celular.

Fase1: Essa fase é marcada a partir do ponto de inflexão do PA, ponto em que a taxa de variação da voltagem de membrana é zero, ou seja, o processo de inativação de I_{Na} e de ativação de I_K/I_{Ca} se alcança um estágio tal que o influxo de Na^+ em favor de seu gradiente eletroquímico se equivale ao efluxo de K^+ e Ca^{2+}. A partir desse ponto dá-se início à repolarização. Na fase 1 se observa o início da repolarização do sarcolema, com importante contribuição da ativação das correntes de K^+ transientes rápidas (I_{to}).

Fase 2: Ativação da corrente de cálcio tipo L ($I_{Ca\text{-}L}$) iniciada na fase anterior, concomitante à inativação da I_{to}. Com isso, o influxo de cálcio provoca atraso no processo de repolarização celular, mantendo o potencial de membrana despolarizado, caracterizando a faze de platô do potencial de ação cardíaco. Ainda nesta fase, outros canais de potássio dependentes de voltagem, com uma cinética de ativação mais lenta (I_{Ks}) começam a ser ativados, participando do processo de repolarização celular.

Fase 3: Ocorre a inativação de I_{ca} e o aumento na condutância de outros tipos de canais para K^+, com papel fundamental dos canais potássio do tipo retificadores de entrada (I_{K1}), ativados por hiperpolarização da membrana.

Fase 4: Estágio conhecido como potencial de repouso celular. Nessa fase, a maioria dos canais dependentes de voltagem estão fechados, havendo contribuições ativas dos I_{K1} e dos canais de potássio sensíveis a adenosina trifosfato (ATP).

A Figura 4 ilustra a representação das diferentes fases do PA de um cardiomiócito ventricular humano e de camundongos e as diferentes contribuições dos principais canais iônicos envolvidos na gênese do PA.

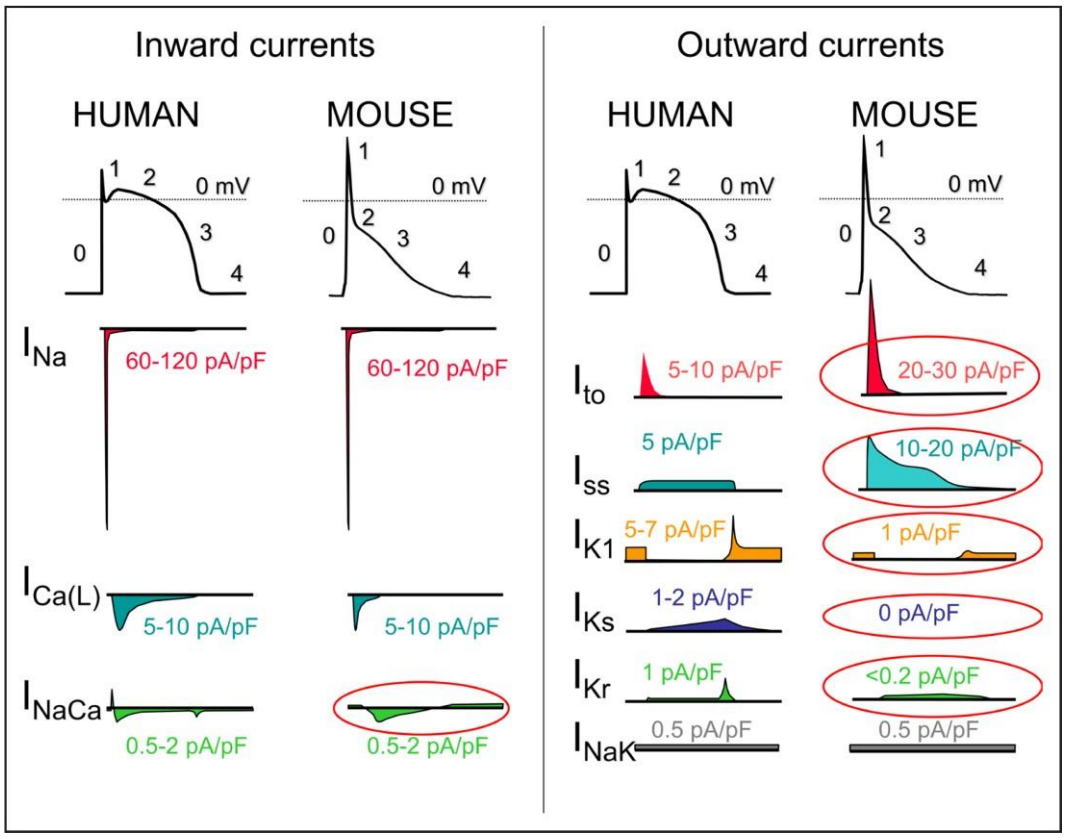

Figura 4. **Potencial de ação cardíaco ventricular de humano e camundongos e as principais correntes iônicas atuantes.** As condutâncias iônicas são apresentadas em concordância com o curso temporal do PA, bem como são apresentadas as densidades médias do pico de cada corrente, normalizado em relação à capacitância elétrica da célula cardíaca (pA/pF). $I_{Ca(L)}$ indica corrente Ca tipo L; $I_{Ca(T)}$, corrente Ca tipo T; I_{Na}, corrente Na; I_{NaCa}, corrente Na/Ca-*Exchange*; I_{NaK}, corrente da bomba NaK-TPase; I_{K1}, corrente K retificadora de entrada; I_{Kr}, corrente K retificadora retardada do tipo rápida; IKs, corrente K retificadora retardada do tipo lenta; Iss, ativação rápida das correntes K de estado estável; e Ito, corrente K transiente de saída Fonte: Blackwell *et al.*, 2022 (Blackwell, Schmeckpeper et al. 2022)

Apesar dos mecanismo geradores do PA serem semelhante em humanos e murinos, estudos eletrofisiológicos mostram que existem algumas particularidades em relação às isoformas dos canais e suas contribuições relativas, o que confere diferenças marcantes nas formas de onda do PA(Joukar 2021). Humanos apresentam PA com maior duração em decorrência de uma maior densidade de corrente de Ca^{2+}, aumento na corrente do Na/Ca-

Exchange e menores correntes repolarizantes (I_K). Já o camundongo não apresenta na forma da onda do PA a característica de *peak and dome* observada nos humanos, isso é devido ao aumento da $I_{to,}$ o que gera uma repolarização inicial muito rápida e a I_{Ca} inativa rapidamente. Como consequência, não há espaço para a formação de platôs acentuados, portanto, a duração do potencial de ação é extremamente curta, o que é condizente com a alta frequência cardíaca dos camundongos(Nánási, Horváth et al. 2021).

1.5 Bases celulares e moleculares da contração do músculo cardíaco

A compreensão da histologia do sistema cardiovascular é relevante, já que a estrutura cardíaca é um determinante fundamental de todos os aspectos relevantes da função cardíaca sob os pontos de vista funcional e patológico. Importante ressaltar que a intima relação entre estrutura e função é bidirecional: a estrutura cardíaca é também afetada pelos ambientes mecânico e eletrofisiológico. Esta conversa cruzada estrutura-função envolve todas as populações celulares no coração.

As unidades contráteis do cardiomiócito são denominadas sarcômeros, e cada sarcômero é formado por várias proteínas: as proteínas contráteis miosina (filamento grosso) e actina (filamento fino), além das proteínas estruturais responsáveis pela organização e integridade funcional do sarcômero, de forma a favorecer a interação entre as proteínas presentes no sarcômero.

Os filamentos finos (actina) são ancorados nas linhas Z em cada extremidade, as quais demarcam cada sarcômero. A actina é uma proteína globular com duas cadeias helicoidais de filamento fino, sendo o principal componente de regulação do comprimento do sarcômero (Hall 2011). É composta também por outros dois componentes, a tropomiosina e a troponina (do tipo C, I, T), formando o complexo troponina-tropomiosina. A tropomiosina é um filamento longo flexível em α-hélice aderido em forma espiral ao filamento de actina que tem como função estruturar e esconder o sítio de interação da actina com a miosina. Esses filamentos em estado de repouso (diástole) bloqueiam os pontos ativos da actina em conjunto com a troponina, impedindo a ligação actina-miosina (impedindo a contração). A troponina é composta por três subunidades: Troponina-T (ancora-se na cadeia de tropomiosina –TnT). Ancorada à TnTc está a Troponina-C (possui um sítio sensível a variações da concentração dos íons de Ca^{2+} - TnC) e a Troponina-I (afinidade com a actina – TnL)(Lieber 2002, Frontera and Ochala 2015).

Já os filamentos de miosina (grossos) são ancorados na banda-M e nas linhas-Z em cada extremidade pela titina, uma proteína estrutural importante no processo contrátil(Wang, Forbes et al. 2001). O miofilamento de titina contém duas regiões, uma extensível, que está

principalmente localizada na banda-I, permitindo a variação fisiológica no comprimento do sarcômero cardíaco e a região pouco extensível tem a função de ligar a linha-Z à linha-M. A titina é importante na maquinaria contrátil devido a suas propriedades elásticas que atuam de modo a torná-la com função semelhante a molas moleculares, contribuindo para a elasticidade passiva da fibra muscular(Horowits, Kempner et al. 1986, Maruyama 1997). A miosina é um hexâmero formado por duas cadeias pesadas de miosina (MHC) e quatro cadeias leves (MLC)(Scott, Stevens et al. 2001, Dal Pai-Silva, Dal Pai et al. 2005).

O processo de contração é gerado pela interação entre os miofilamentos de actina e miosina, que geram o encurtamento do sarcômero. Resumidamente, na diástole, quando a concentração de calcio intracelular é baixa, não há ligação do cálcio com o sítio específico da TnC e assim, a interação entre TnI e a TnC é fraca, prevalecendo a interação da TnI com a actina. Essa conformação favorece o complexo troponina-tropomiosina a bloquear o sítio ativo da actina que interage com a miosina(Katz 1996). Assim que a concentração de calcio aumenta no meio intracelular, esse cálcio se liga ao sítio especifico na TnC, favorecendo assim a interação da TnC com a TnI. A interação TnC-TnI desloca a TnI do sítio ativo da actina. Assim, a miosina pode livremente se ligar a actina, ativando a atividade ATPasica da miosina resultam na hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP), resultando na formação de uma ponte cruzada levando ao desenvolvimento de tensão dentro do cardiomiócito, dessa forma deflagrada a contração(Bers and Guo 2005).

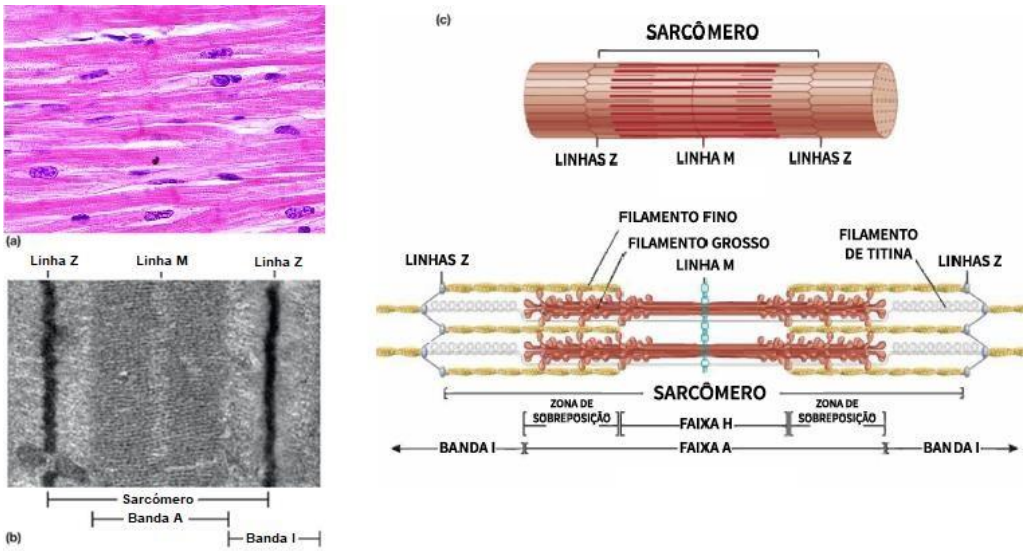

Figura 5. **Representação do músculo estriado cardíaco.** (a) Secções de músculo esquelético cardíaco em parafina coradas com hematoxilina e eosina; (b) Imagem de microscopia

electrónica de um sarcômero; (c) Ilustração de músculo estriado Fonte: (Bassel-Duby and Olson 2013)

1.6 Acoplamento excitação-contração cardíaco

O processo de acoplamento excitação-contração cardíaco (AEC) representa a dinâmica de sinalização que ocorre desde a despolarização da membrana excitável, gerada pelo PA, que culmina com a contração celular (Bers 2002).

O AEC se inicia com a propagação do potencial de ação cardíaco na membrana sarcoplasmática, quando chega aos túbulos transversos (Túbulos T), que são invaginações na membrana onde estão localizados os canais de Ca^{2+} do tipo L (Ca_L) dependentes de voltagem. A despolarização do sarcolema leva ao influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o intracelular por meio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (tipos L e do tipo T), principalmente em um subespaço restrito chamado espaço diádico (ou fenda diádica). A díade é formada pela proximidade do RS e do túbulo T. Na díade, essas duas estruturas estão separadas por apenas 12-15 µm. Isso resulta na justaposição dos canais de cálcio do tipo L que se encontram no túbulo T e os receptores de rianodina do tipo 2 (RYR) que se encontram na membrana do retículo sarcoplasmático formam o elemento funcional da díade, conhecido como “couplon” ou unidade liberadora de cálcio(Bers 2002, Scriven, Asghari et al. 2013). Assim, quando o cálcio entra pelo canal de cálcio tipo L, há uma elevação da concentração de cálcio no espaço diádico e esse aumento localizado aumenta a probabilidade de abertura dos RYR, que inicia iniciam liberação de Ca^{2+} do reticulo sarcoplasmático (RS) em um processo chamado liberação de cálcio induzida por cálcio (LCIC). Essa liberação rápida e sincronizada permite que o Ca^{2+} se difunda rapidamente para a maquinaria contrátil celular. Assim, o Ca^{2+} chega até os miofilamentos onde se liga com a proteína TnC. No momento em que o Ca^{2+} se liga à TnC, os miofilamentos são ativados, processo explicado anteriormente, e de forma cooperativa, realizam a contração dos cardiomiócitos(Bers 2001).

Para que ocorra o relaxamento celular, é necessária a redução da concentração intracelular de Ca^{2+}, para que volte aos níveis basais. Esse processo de declínio ocorre, no miócito cardíaco, através de quatro vias e a participação de cada via é dependente da espécie: 1) a cálcio ATPase do RS (SERCA2a), que é responsável por aproximadamente 92% da recaptação de todo Ca^{2+} para o interior do RS durante a diástole em ratos e em humanos é responsável por 70-80% da receptação(Frank, Bölck et al. 2003). Esse principal mecanismo de remoção tem sua atividade fortemente regulado por um inibidor endógeno fosfolambam (PLB), de forma que quando as concentrações intracelulares de cálcio são baixas, a PLB interage com a SERCA2a e inibe a sua

atividade através da redução da afinidade da SERCA pelo Ca^{+2}. Por outro lado, quando os níveis de Ca^{+2} estão altos, há o desacoplamento PLB-SERCA2a, retirando a inibição e permitindo o funcionamento da bomba(Bers 2008). 2) Trocador sódio/cálcio (NCX), responsável por cerca de 7% de extrusão do Ca^{2+} do citosol em ratos e em cardiomiócitos ventriculares de coelhos e humanos, esse mecanismo representa ~28%; 3) via cálcio ATPase do sarcolema, responsável por ~0,5% em ratos e ~1% em humanos; e 4) via uniporte mitocondrial, com ~0,5% em ratos e ~1% em humanos (Bers 2002, Bers 2008). A figura 6 traz uma representação esquemática desse processo.

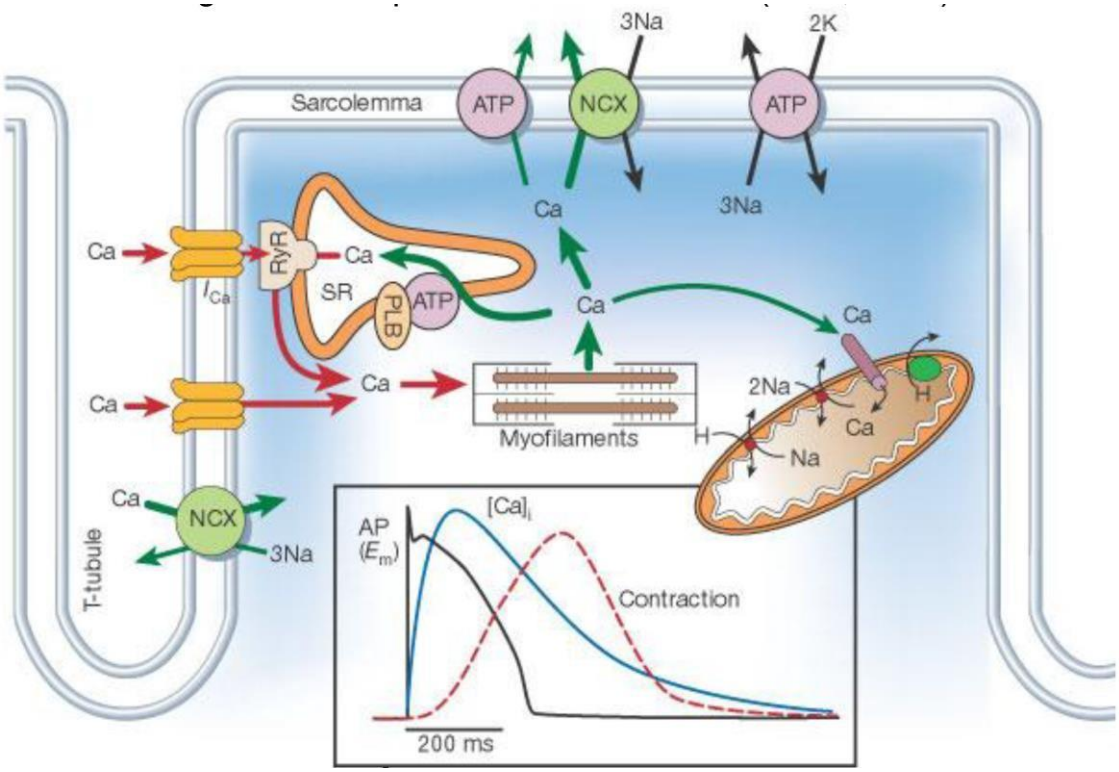

Figura 6. Esquema representativo do processo de acoplamento excitação-contração e as funções principais dos componentes envolvidos, bem como a dinâmica do cálcio e sua importância nesse processo. Na figura, o componente "ATP" transportando cálcio para fora da célula representa a bomba de cálcio do sarcolema; NCX: trocador Na^{+}/Ca^{2+}; ATP/PLB: SERCA associada ao seu inibidor endógeno, fosfolambam (PLB). Fonte: (Bers 2002)

Durante o exercício físico ou em situações de "luta ou fulga", o coração sofre os efeitos das catecolaminas através da ativação dos receptores beta-adrenérgicos (β-ARs) presentes no coração, principalmente os subtipos β_1 e β_2-ARs, ambos acoplados à proteína G estimulatória (Gs) que irá ativar a via de sinalização da adenilato ciclase (AC) (Woo, Song et al. 2015). O AC quando ativo, desencadeia a catálise da adenosina trifosfato (ATP), formando 3'-5' monofosfato

de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc tem o papel de segundo mensageiro e o seu principal mecanismo de ação é a ativação da proteína quinase A (PKA) dependente de AMPc. A PKA é capaz de fosforilar diversas proteínas envolvidas no complexo de acoplamento excitação-contração dos cardiomiócitos (Xiang 2011, Fajardo, Zhao et al. 2013), como representado na figura 7.

A ativação β-adrenérgica e a subsequente fosforilação das proteínas do complexo de AEC mediada por PKA acarreta em um aumento do Ca^{2+} intracelular através da fosforilação dos canais para Ca^{+2} do tipo L (Madamanchi 2007, Fajardo, Zhao et al. 2013); RyR através da dissociação da calstabina (FKBP 12.6); aceleração na recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS), através da FLB e da SERCA2a; diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}, por meio da TnI e da TnC (Bers 2002, Xiang and Kobilka 2003).

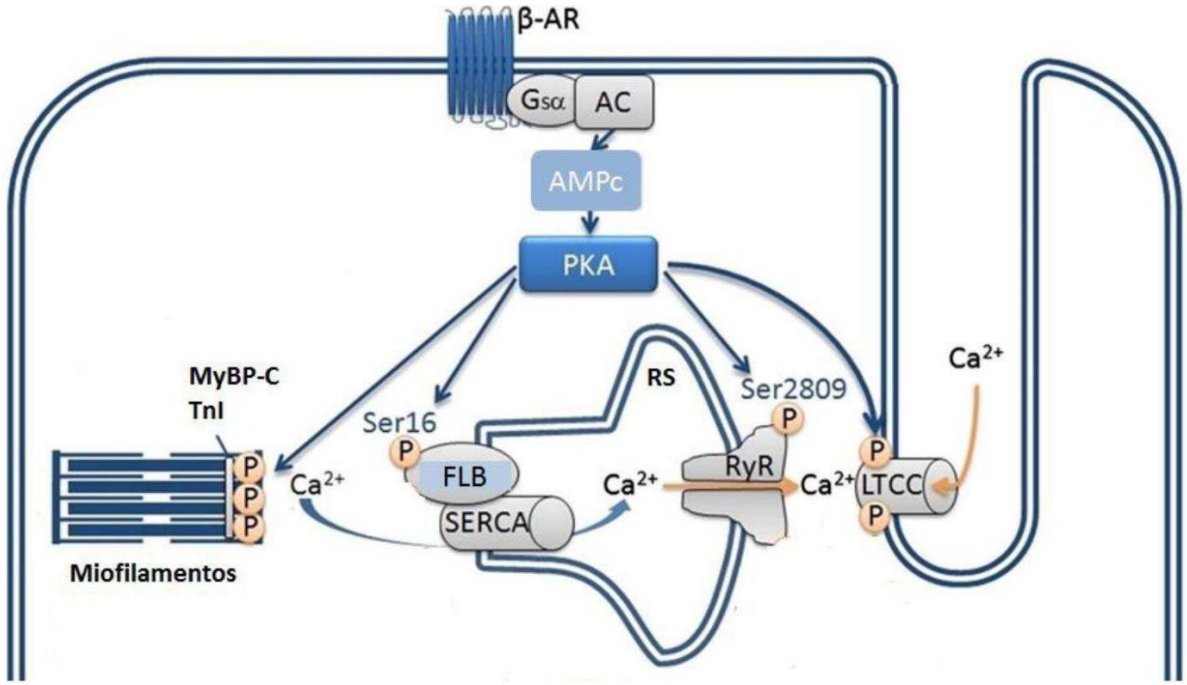

Figura 7. **Via de sinalização β-adrenérgica nos cardiomiócitos**. Receptor β-adrenérgico (β-AR); proteína estimulatória (Gsα); adenilato ciclase (AC); monofosfato de adenosina cíclico (AMPc); proteína quinase A (PKA); canais de Ca^{2+} do tipo L (LTCC); retículo sarcoplasmático (RS); receptor de rianodina (RyR); resíduo serina 2809 (Ser2809); proteína C de ligação à miosina (MyBP-C); troponina I (TnI); resíduo serina 16 (Ser16); fosfolambam (FLB); ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA). Fonte: (Costa 2018)

No processo de acoplamento excitação-contração fisiológico cardíaco, a atividade elétrica é extremamente importante para o funcionamento da atividade contrátil. Caso ocorra alterações

funcionais e/ou estruturais do miocárdio, todo o processo pode ser prejudicado, culminando em alterações na condução e propagação do impulso elétrico cardíaco, ocasionando, por exemplo, a arritmias e falhas cardíacas(Wang, Ziman et al. 2009, Nahar, Imam et al. 2013).

De fato, Estudos nas últimas décadas tem sugerido que modificações do potencial de ação ventricular é um passo inicial crítico na cadeia de eventos ligados ao desenvolvimento de algumas patologias cardíacas como a hipertrofia e a insuficiência cardíaca (Huang, QIN et al. 2000, Rossow, Dilly et al. 2009, Wang, Ziman et al. 2009). Esses estudos tem mostrado que as alterações na forma do PA podem ser observadas anteriores a 48 horas após o insulto miocárdico, mesmo na ausência de hipertrofia cardíaca mensurável. Essas alterações podem incluir reduções no pico de despolarização durante a fase 0, diminuição na repolarização durante a fase 1 (ou mesmo perda completa da repolarização precoce) e um aumento na duração do potencial de ação(Santana, Cheng et al. 2010).

2. Doença de Chagas

2.1 Histórico

A doença de chagas foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas (1879-1934), que por designação de Oswaldo Cruz foi enviado para o combate de uma epidemia de malária que atingia trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil em Lassance, Minas Gerais(CHAGAS 1909, Chagas 1909, Mehlhorn 2016). O seu laboratório era improvisado em um vagão de trem, local onde o chefe da comissão dos engenheiros relatou a existência de um percevejo hematófago muito comum naquela localidade e que vivia nas frestas das casas de pau-a-pique, sendo apelidado de barbeiro, pois picava preferencialmente o rosto das pessoas enquanto dormiam. Ao examinar o percevejo, Carlos Chagas pode observar um protozoário flagelado a qual pensou ser o *Trypanosoma minasense*, que ele mesmo havia identificado como uma espécie não-patogênica. Após algumas análises, constatou-se que não se tratava do *Trypanosoma minasense* e sim de uma nova espécie que foi batizada de *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao seu mentor, Oswaldo Cruz(Chagas 1909, Steverding and vectors 2014).

Ao iniciar seus estudos sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*, Carlos Chagas observou que o parasito era capaz de infectar animais vertebrados, especulando-se que o ser humano poderia ser um desses vertebrados que potencialmente poderiam ser infectado. Para testar sua hipótese, foram realizados exames de sangue nos moradores de Lassance, local onde foi descoberto pela primeira vez, a existência do parasito *Trypanosoma cruzi* no sangue de uma criança que apresentava quadro febril, hepatoesplenomegalia e edema facial. Essa criança se chamava Berenice, reconhecido como o primeiro caso de infecção humana relatado. Berenice

faleceu em 1981 aos 73 anos de idade. Sua morte não foi relacionada com a doença de Chagas e no decorrer dos seus anos de vida, conviveu com a doença sem sintomas(Chagas 1909, Steverding and vectors 2014, Mehlhorn 2016).

Carlos Chagas desenvolveu o primeiro e único trabalho na história da medicina a qual descreve completamente uma nova doença infecciosa desde sua etiologia, ciclo parasitário, identificação do inseto vetor, identificação dos reservatórios domésticos e silvestres, descrição clínica das fases da doença, as manifestações clínicas, bem como a epidemiologia da doença(Chagas 1909, Steverding and vectors 2014, Mehlhorn 2016).

2.2 Epidemiologia

A doença de Chagas (DC), causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*(Chagas 1909) é uma das doenças negligenciadas da América do sul, reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um uma doença que afeta populações com baixa visibilidade e pouca voz política, causa estigma e discriminação, é relativamente negligenciada pelos pesquisas farmacêuticas, tem um impacto considerável na morbilidade e mortalidade e que recebe atenção insuficiente de governos e órgãos de saúde (Organization 2010). Embora a incidência de novas infecções tenha diminuído no Brasil e em outros países devido à urbanização e à melhoria das condições de vida, estima-se que cerca de 6-8 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com *T. cruzi* e mais de 41 mil novos casos surgem por ano, sendo responsável por aproximadamente 12.000 óbitos anuais(Lee, Bacon et al. 2013, Echeverria and Morillo 2019, Lidani, Andrade et al. 2019). No mundo, a DC é a principal causa de miocardite infecciosa(Crespo, Di Angelantonio et al. 2019) e na América do Sul, é uma das principais causas de insuficiência cardíaca e morte súbita(Simões, Romano et al. 2018).

Com o aumento do fluxo migratório, milhões de pessoas estão em risco de infecção. Estima-se que 70-90 milhões de pessoas estão expostas vivendo em áreas com alto risco de transmissão da DC, não apenas na América Latina, México e Estados Unidos, mas também em muitos países da Europa, Japão, Canadá e Austrália(Bern, Kjos et al. 2011, Lee, Bacon et al. 2013, Tanowitz, Machado et al. 2015). Muitos médicos consideram a doença de Chagas restrita ao México e América Latina, e essa suposição faz com que os clínicos gerais dos Estados Unidos e da Europa ignorem a condição ao fazer o diagnóstico diferencial das cardiomiopatias. A doença de Chagas é frequentemente diagnosticada como cardiomiopatia idiopática. Da mesma forma, pacientes com DC não estão cientes de sua infecção e podem potencialmente transmitir o parasito(Bern, Kjos et al. 2011). A DC também tem um impacto na carga econômica, já que a mortalidade precoce e a incapacidade substancial causada pela doença ocorre frequentemente na

população mais produtiva, jovens e adultos e as manifestações clínicas da DC, em especial a cardiomiopatia chagásica crônica resultam em progressiva incapacidade de continuar trabalhando (Chapadeiro 1999, Nunes, Carmo et al. 2012), resultando em perdas econômicas significativas(Franco-Paredes, Von et al. 2007). Os custos da DC na América Latina, uma das doenças negligenciadas tropicais mais caras, são estimados em até 662.000 anos de vida ajustados por incapacidade de produtividade, e o custo econômico global total atribuído à doença a cada ano é estimado em mais de $8 bilhões de dólares, com mais de 10% desse custo sendo incorridos nos Estados Unidos e Canadá, regiões não endêmicas e que a DC não é reconhecida como um problema significante de saúde (Bonney 2014).

No Brasil, há um predomínio de casos crônicos, reflexo da infecção por transmissão vetorial em décadas passadas e estima-se que haja o total seja de 1,3 a 3,2 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* em 2020, resultando em aproximadamente 6.000 óbitos por ano(Dias, Ramos Jr et al. 2016).

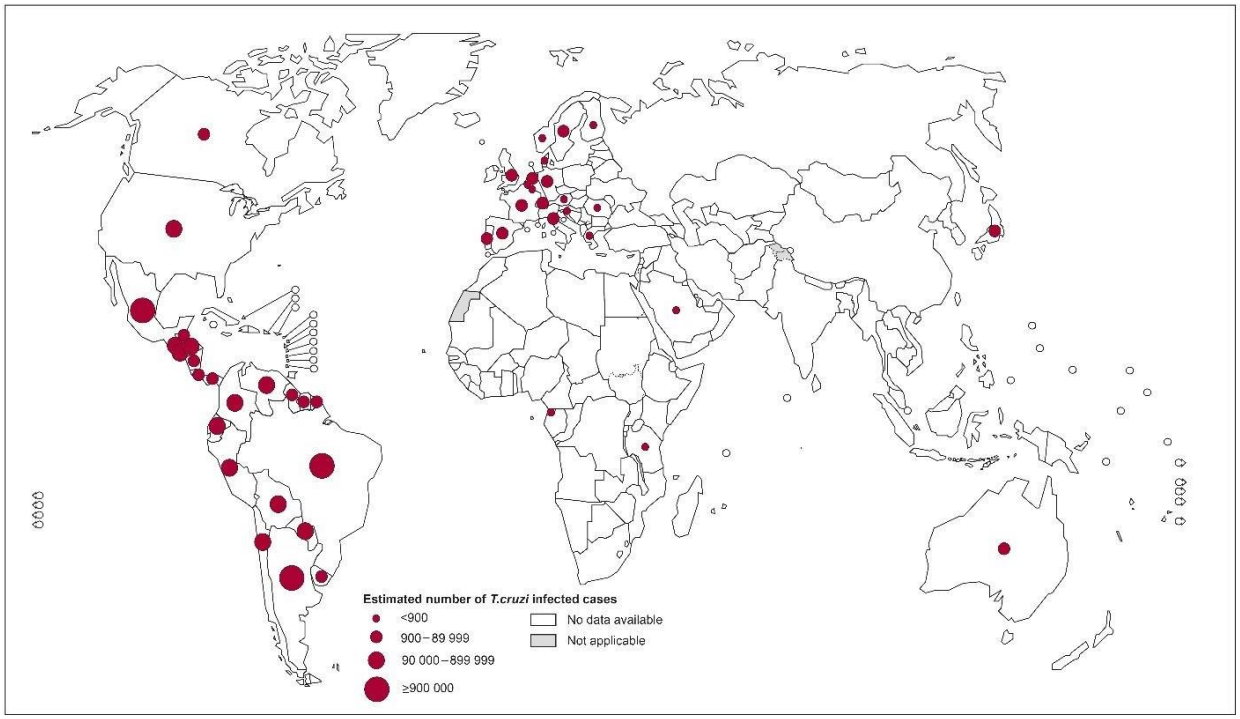

Figura 8. **Distribuição global dos casos de infecção por *Trypanossoma cruzi*.** Mapa elaborado com base em estimativas oficiais 2018 (Fonte: WHO, 2021).

2.3 Etiologia

O agente etiológico da DC é o *Trypanosoma cruzi* (reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastidea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*. A forma clássica de transmissão da doença é através de vetores dos gêneros

Triatoma, *Panstrogylus* e *Rhodinus* (classe Insecta, ordem Hemiptera, família Reduviidae) apesar de terem sido observados transmissão por 12 outros gêneros[19.] A infestação domiciliar por triatomíneos resulta na transmissão endêmica do *T. cruzi* principalmente entre populações rurais empobrecidas em toda a América Latina(Bern, Kjos et al. 2011).

A transmissão vetorial ocorre quando materiais fecais de insetos triatomíneos contaminado entram em contato com a ferida provocada pela picada, sendo possível nesse tipo de transmissão verificar a existência do chagoma de inoculação ou sinal de Romaña(Simões, Romano et al. 2018, Correia, Ribeiro et al. 2021). Porém, os programas de controle de vetores têm sido altamente eficazes na redução da transmissão doméstica e peridoméstica do *T. cruzi*(Moncayo and Silveira 2009). A infestação doméstica por *Triatoma infestans* foi eliminada no Chile, Uruguai, Brasil e algumas áreas do Peru e Paraguai, e o *Rhodnius prolixus* foi eliminado de América Central(Dias 2007). Em 2006, o Brasil recebeu da Organização Mundial de Saúde (OMS) certificado de erradicação da transmissão da doença pelo vetor *Triatoma infestans* (Marin-Neto and Rassi Jr 2009). Porém, isso não indica a erradicação da doença, fato que ainda está muito longe da realidade, já que a infecção ainda continua acontecendo por meio de surtos mediados por outros mecanismos de transmissão. Pode ainda ocorrer a transmissão pela via congênita, transplante de órgãos, transfusão sanguínea (principalmente em países onde não há controle nos bancos de sangue), acidentes laboratoriais ou pelo consumo de alimentos contaminados com componentes de insetos infectados(Nunes, Beaton et al. 2018). Dentre as diversas vias, a transmissão oral por alimentos contaminados acontece em surtos esporádicos de contaminação humana, principalmente na região amazônica e é atualmente a principal fonte de transmissão no Brasil(Shikanai-Yasuda and Carvalho 2012), apresentando curso clínico mais grave e com maior taxa de mortalidade devido a maior incidência de miocardite aguda(Henao-Martínez and hygiene 2016).

Por fim, vale ressaltar que além dos humanos, o *T. cruzi* infecta uma grande variedade de mamíferos domésticos e selvagens, incluindo cães, gatos, morcegos, ratos e tatus. Portanto, o controle da doença de Chagas é difícil porque existem muitos reservatórios de parasitas potenciais em diferentes espécies de vertebrados e configurações ambientais(Echeverria and Morillo 2019).

2.4 Patogênese

A doença de Chagas apresenta-se classicamente em duas fases: uma fase aguda ou inicial, que é seguida por uma fase crônica que pode ser categorizada em formas indeterminadas, cardíacas, digestivas ou cardio-digestiva, com diferentes manifestações clínicas.

A lesão miocárdica na cardiopatia chagásica geralmente é um processo progressivo que pode ser classificado em estágios (A, B, C e D), de acordo com as recomendações internacionais adaptadas à DC (Andrade, Marin Neto et al. 2011). Os individuos infectados que apresentam o ECG normal são considerados na fase indeterminada da doença (estágio A). O aparecimento de anormalidades no ECG implica progressão da doença (estágio B) e precede o aparecimento dos sintomas de insuficiência cardíaca (estágios C e D). A morte súbita pode interromper esse curso a qualquer momento, mesmo antes do desenvolvimento dos sintomas (no estágio A ou B), e a morte pode ocorrer por insuficiência cardíaca progressiva ou acidente vascular cerebral(Nunes, Dones et al. 2013).

Aprofundando um pouco mais nas fases das doenças, temos a fase aguda, com duração de 4-8 semanas e uma fase crônica persistente por toda a vida do hospedeiro. A fase aguda é assintomática ou oligossintomática, em que pacientes e modelos murinos apresentam miocardite aguda(Lidani, Andrade et al. 2019) resultante do processo inflamatório no hospedeiro, desencadeado pela rápida expansão do número de parasitos(Rassi Jr, Rassi et al. 2010, Cunha-Neto and Chevillard 2014), a qual é acompanhada por alterações da função elétrica e contrátil de cardiomiócitos em modelos experimentais da doença (Roman-Campos, Campos et al. 2009, Roman-Campos, Sales-Junior et al. 2013). Além dos sintomas cardíacos, sinais clínicos generalizados, como febre, mal estar, cefaleia, aumento do tamanho do fígado e baço também podem estar presentes(Cruz, Santos-Miranda et al. 2016). Mudanças sutis podem aparecer no eletrocardiograma (ECG), incluindo taquicardia sinusal, intervalos PR e QT prolongados e anormalidades na repolarização(Marques, Mendoza et al. 2013, de Figueiredo Brito 2018) e alterações mais graves como bloqueio de ramo direito, fibrilação atrial ou arritmias ventriculares são indicativos de um pior prognóstico (Prata 2001). As mortes que ocorrem ocasionalmente na fase aguda (<5-10% dos casos sintomáticos) são de correntes de miocardite aguda grave, derrame pericárdio e/ou meningoencefalite e geralmente são mais comuns em casos de infecção oral, que como relatado anteriormente, tem um pior prognóstico da doença. Por serem muito semelhantes aos sintomas que são apresentados durante uma infecção viral, muitos indivíduos acometidos acabam não sendo diagnosticados nessa fase, pois não costumam buscar atendimento. Essas manifestações desaparecem espontaneamente em 90% dos casos e, possivelmente, 60 a 70% dos indivíduos infectados nunca desenvolverão sinais ou sintomas relacionados à DC, caracterizando a forma indeterminada da doença. Pacientes neste estágio apresentam melhor prognóstico e expectativa de vida semelhante à de indivíduos sem a DC(Ribeiro and da Costa Rocha 1998, Marin-Neto, Almeida Filho et al. 2002). Entretanto, após 20 a 30 anos da infecção inicial, cerca de 30-40% dos hospedeiros podem evoluir para fase crônica da doença, sendo essa sintomática

e apresentar forma digestiva (megacólon ou megaesôfago), cardíaca (cardiomiopatia chagásica crônica) ou cardio-digestiva(Vago, Andrade et al. 2000). Vale ressaltar que o acometimento cardíaco é o aspecto clínico mais importante da DC crônica, devido à sua frequência e gravidade.

A transição da fase aguda para crônica é acompanhada por uma diminuição acentuada da parasitemia, com o desenvolvimento progressivo de prejuízos da função cardíaca. A cardiomiopatia dilatada é a manifestação mais grave e importante da doença de Chagas humana crônica e notoriamente se caracteriza pela geração de hipertrofia, comprometimento da função contrátil, danos ao sistema de condução do coração, bloqueios cardíacos, arritmias ventriculares, fenómenos de tromboembolismo, insuficiência cardíaca e morte súbita(Ribeiro, Nunes et al. 2012, Báez, Reynoso et al. 2015).

Como descrito anteriormente, a cardiomiopatia chagásica é considerada uma cardiomiopatia arritmogênica, caracterizada por uma ampla variedade de anormalidades do sistema de condução. De fato, nosso grupo demonstrou um aumento na deposição de colágeno e infiltrado inflamatório, bem como o prolongamento do potencial de ação, redução da corrente transitório de K^+ e a corrente dos canais de Ca^{+2} tipo L, 30 e 90 dias após a infecção em um modelo murino infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi*(Cruz, Santos-Miranda et al. 2016). Esses resultados demonstram que a infecção leva a modificações importantes nas propriedades elétricas associadas ao infiltrado inflamatório e a deposição de colágeno, sugerindo um papel causal nas arritmias, disfunções cardíacas e a predisposição à insuficiência cardíaca observadas na cardiomiopatia chagásica(Jr, Rassi et al. 2000). Em humanos, uma revisão dos ECGs de uma população chagásica crônica, proveniente de uma região endémica demonstrou uma associação entre a soro positividade para a doença e bradicardia, aumento da duração do complexo QRS, aumento do intervalo QT, bloqueio de ramo direito, bloqueio fascicular anterior esquerdo, bloqueio bifascicular, arritmias ventriculares e disfunção sistólica(Williams-Blangero, Magalhaes et al. 2007), demonstrando que os modelo animais utilizados pelo nosso grupo de pesquisa mimetizam os sintomas da DC crônica.

A cardiomiopatia chagásica é caracterizada por uma miocardite crônica que envolve todas as câmaras cardíacas e danos ao sistema de condução. A patogênese da doença envolve a persistência do parasito no tecido cardíaco, parasitemia continua de baixo grau e lesão miocárdica imunomediada levando à fibrose miocárdica intersticial em todo o miocárdio, com a contribuição de danos autonômicos e distúrbios microvasculares(Higuchi, Ries et al. 1997, Benvenuti, Roggério et al. 2008, Nunes, Dones et al. 2013). O mau prognóstico da DC crônica também pode ser atribuído à gravidade das arritmias ventriculares(FILHO, DE SIQUEIRA et al. 2000), à disautonomia(Dávila, Donis et al. 2012) e às anormalidades de perfusão miocárdica(Rossi,

Tanowitz et al. 2010). Uma vez que há o estabelecimento a perda de função do VE, a ativação neuro-humoral por si só pode levar a um ciclo vicioso de progressão da doença semelhante ao que acontece em outras cardiomiopatias não infecciosas. Porém, a patogênese da DC é complexa, e os mecanismos moleculares do mal prognóstico ainda não foram totalmente estabelecidos(Nunes, Dones et al. 2013).

Um outro aspecto que merece atenção na progressão da DC é o estresse oxidativo associado ao processo inflamatório que acontece durante a infecção aguda e crônica. Sabe-se que a inflamação crônica e o estresse oxidativo são características da CCC. Quando ocorre a infecção pelo *T. cruzi*, há uma tentativa de controle da infecção pela elevação na taxa de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*), que tem atividade tóxica para o parasito e assim, limitando a sua multiplicação intracelular(Gupta, Wen et al. 2009, Paiva, Medei et al. 2018, Maldonado, Rojas et al. 2020). Enquanto ROS/NO desempenham um papel importante na sinalização da defesa do hospedeiro, o estresse oxidativo/nitrosativo excessivo pode causar uma ampla gama de processos patológicos levando à lesão celular e tecidual do hospedeiro(Wen, Nagajyothi et al. 2014, Wan and Garg 2021).

No processo de acoplamento excitação-contração, ROS/NO é um importante modulador de várias proteínas-chave envolvidas na manipulação de íons, como os canais iônicos e transportadores, mas também na regulação de proteínas, como as proteínas quinases, como por exemplo proteína quinase A dependente de AMP cíclico (PKA) e proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) regulando a atividade de diversos sistemas da maquinaria celular envolvidas com o controle de suas propriedades elétricas e contráteis(Köhler, Sag et al. 2014, Luczak, Anderson et al. 2014, Sepúlveda, Gonano et al. 2017). De fato, um recente estudo do nosso grupo (Santos-Miranda, Costa et al. 2021) buscou avaliar a associação entre CaMKII na disfunção eletromecânica do coração em um modelo de infecção experimental crónica por *Trypanosoma cruzi*, foi possível observar que a inibição ex vivo e in vitro da CaMKII foi responsável por reverter o perfil arrítmico de corações isolados e cardiomiócitos isolados de ventrículos esquerdos bem como impediu o aparecimento de contrações arrítmicas.

Nas últimas décadas, o uso de modelos animais como estratégia para mimetizar a DC tem contribuído para o avanço do entendimento dos mecanismos celulares e moleculares associados à infecção pelo *T. cruzi*. O camundongo é um modelo animal que reproduz em condições laboratoriais, com confiabilidade e reprodutibilidade, diversos aspectos fisiológicos, bioquímicos, imunológicos e patológicos similares à espécie humana. Outro fator relevante é a possibilidade de análise, em curto período de tempo, o curso de patologias crônicas descritas em

seres humanos, e dessa forma, nos permite explorar novas abordagens terapêuticas que atualmente são muito limitadas, dessa forma, o camundongo se torna um modelo experimental mais adequado para investigações pré-clínicas da cardiomiopatia chagásica crônica.

Os sintomas clínicos observados por humanos na doença de Chagas na fase aguda ou crônica são extremamente variáveis e dependentes de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro(Andrade, Brodskyn et al. 1983, Brener, Gazzinelli et al. 1997, Anez, Carrasco et al. 1999, Zafra, Mantilla et al. 2008). Da mesma forma, a patologia observada em modelos murinos infectados com *T. cruzi* é altamente dependente da cepa do parasito, quantidade de inoculo de parasitos, da genética do hospedeiro bem como as características imunológicas do hospedeiro(Brener, Gazzinelli et al. 1997, Marinho, D'Império Lima et al. 1999, Cerbán, Stempin et al. 2020). Para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença, a escolha do modelo experimental de infecção pode ser definida, entre outros fatores, pela escolha da linhagem do camundongo. De fato, estudos comparando as linhagens BALB/C e C57bl6 como modelo murino para a infecção por *T. cruzi* com diferentes tipos de cepa (Wrightsman, Krassner et al. 1982, Andrade, Barral-Netto et al. 1985, Michailowsky, Silva et al. 2001) tem demonstrado que os camundongos da linhagem BALB/c são mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* quando comparados aos animais da linhagem C57BL/6 e além disso, demonstram uma variedade de arritmias que mimetizam as arritmia complexa induzidos pela DC no homem, sendo assim, um modelo mais adequado para investigar os distúrbios eléctricos associados a CCC. Essa maior suscetibilidade dos camundongos BALB/c à infecção pode ser explicado pelo fato de que camundongos BALB/c apresentam um perfil de resposta imune enriquecido com resposta do eixo Th2, enquanto os camundongos C57BL/6 apresentam uma resposta enriquecida com Th1, com diferentes habilidades para lidar com infecção parasitária intracelular, uma vez que a imunidade dirigida por Th1 está relacionada à resistência ao *T. cruzi*. (Bryan, Guyach et al. 2010)

É importante salientar que a reativação da doença de Chagas também pode ocorrer em pacientes cronicamente infectados que se tornam imunologicamente comprometidos, como hospedeiros acometidos pelo HIV ou aqueles que estão recebendo medicamentos imunossupressores (Rocha, De Meneses et al. 1994, Kaptoge, Pennells et al. 2019).

A Figura 9 apresenta o curso natural da infecção pelo *T. cruzi* e os principais eventos envolvidos.

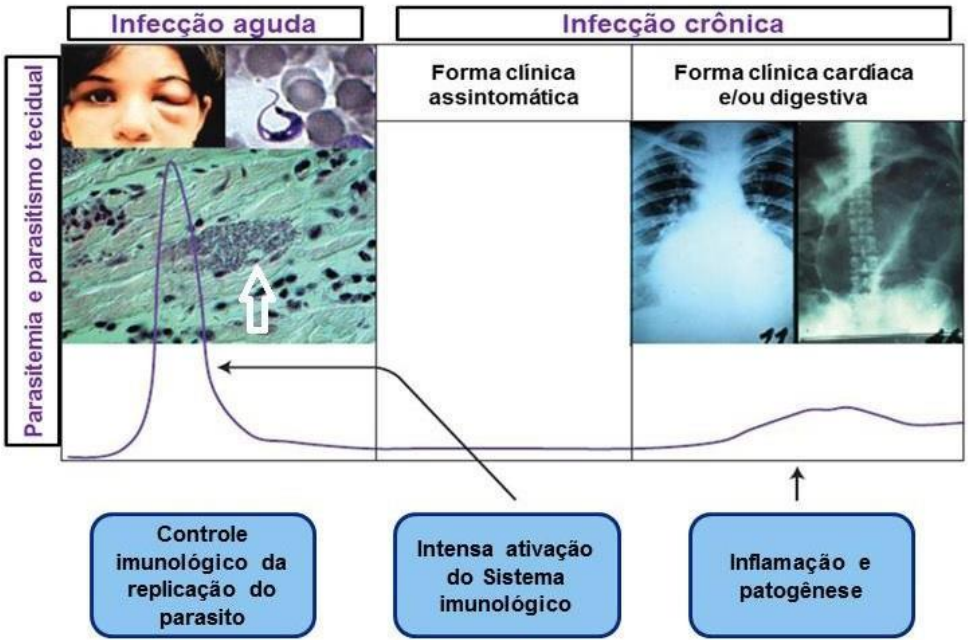

Figura 9. **Curso natural da doença de chagas.** Na infecção aguda, as imagens fotográficas ilustram: uma criança com sinal de Romaña; uma forma tripomastigota na corrente sanguínea; e um ninho de amastigota no tecido cardíaco (seta branca). Na infecção crônica, as imagens fotográficas ilustram: cardiomegalia e megacólon. O gráfico com duas curvas representa a parasitemia na fase aguda e crônica, respectivamente. Fonte: (Rassi Jr, Rassi et al. 2009)

2.5 Resposta imunológica

A defesa eficiente do hospedeiro contra microrganismos patogênicos invasores é alcançada através da coordenação de redes de sinalização complexas que ligam os sistemas imunológicos inato e adaptativo. Após a interação com o antígeno apresentado por células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas, acontece a diferenciação de células CD4 $^{+}$ T *helper* (TH) virgens em linhagens Th_1 e Th_2 com funções efetoras especializadas, permitindo assim, que elas direcionem as respostas imunes apropriadas e eficazes contra diversos patógenos(Glimcher, Murphy et al. 2000, Murphy, Ouyang et al. 2000). As citocinas presentes nos estágios iniciais da ativação de células T CD4 $^{+}$ dirigidas por antígeno ajudam a determinar o padrão específico do fenótipo Th que se desenvolve(Seder and Paul 1994, Boyton and Altmann 2002). A interleucina 12 (IL-12) produzida por células imunes inatas, bem como IFN-γ produzido por células NK polarizam em direção ao eixo Th1. Por outro lado, a diferenciação para as células Th2 requer a presença da interleucina 4 (IL-4) (Glimcher and Murphy 2000). As células Th1 são caracterizadas pela produção principal de IFN-γ, porém também produzem interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 (IL-12) e TNF-α, citocinas que medeiam a ativação de macrófagos e estão envolvidas na imunidade celular. As células Th2 produzem principalmente IL-4, porém também secretam interleucina 5 (IL-5), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10) e IL-13, citocinas

que auxiliam as células B e são necessárias para a imunidade humoral(Glimcher and Murphy 2000).É importante ressaltar que ocorre regulação cruzada entre os eixos, de modo que o desenvolvimento de um tipo celular é inibido por citocinas produzidas pelo outro (Seder and Paul 1994, Szabo, Dighe et al. 1997). Esse mecanismo fornece uma maneira de as respostas se tornarem auto-reforçadoras e ajuda a estabilizar o surgimento de fenótipos polarizados. Por exemplo, as citocinas Th2 IL-4 e IL-10 suprimem o desenvolvimento de Th1 inibindo a produção de IFN-γ e IL-12 (Fiorentino, Zlotnik et al. 1991), enquanto o IFN-γ foi pensado para limitar seletivamente o crescimento de células Th2 (Szabo, Dighe et al. 1997). A função das células T auxiliares pode ser amplamente explicada pelas citocinas que elas secretam. As citocinas são pequenos polipeptídeos semelhantes a hormônios que têm atividades biológicas pleiotróficas em vários tipos de células (Lenschow, Walunas et al. 1996).

As células Th17 foram descritas pela primeira vez no início dos anos 2000, como um subconjunto Th independente e distinto das células Th1 e Th2, produzindo IL-17a, IL-17f, IL-22 e IL-21 como citocinas efetoras (Park, Li et al. 2005). Três grupos descobriram que TGF-β e IL-6 induziam a diferenciação de Th17 (Bettelli, Carrier et al. 2006, Mangan, Harrington et al. 2006, Veldhoen, Hocking et al. 2006). Há evidências de que as células Th17 são responsáveis pelo recrutamento de outros tipos de células inflamatórias, especialmente neutrófilos, para mediar a patologia nos tecidos-alvo (Korn, Bettelli et al. 2009).A regulação rigorosa das respostas das células T efetoras é necessária para o controle eficaz de infecções. As células Treg têm papéis essenciais na manutenção da homeostase imunológica , regulando essas respostas de células T efetoras e, assim, prevenindo seus efeitos potencialmente patogênicos(Vignali, Collison et al. 2008). As células Treg claramente têm funções na supressão das respostas imunes das células Th1 e Th2 porque os camundongos que não as apresentam exibem doença autoimune avassaladora caracterizada pela produção excessiva de citocinas das células Th1 e Th2(Kim, Rasmussen et al. 2007). A figura 10 mostra o modelo de diferenciação de células T *helper*.

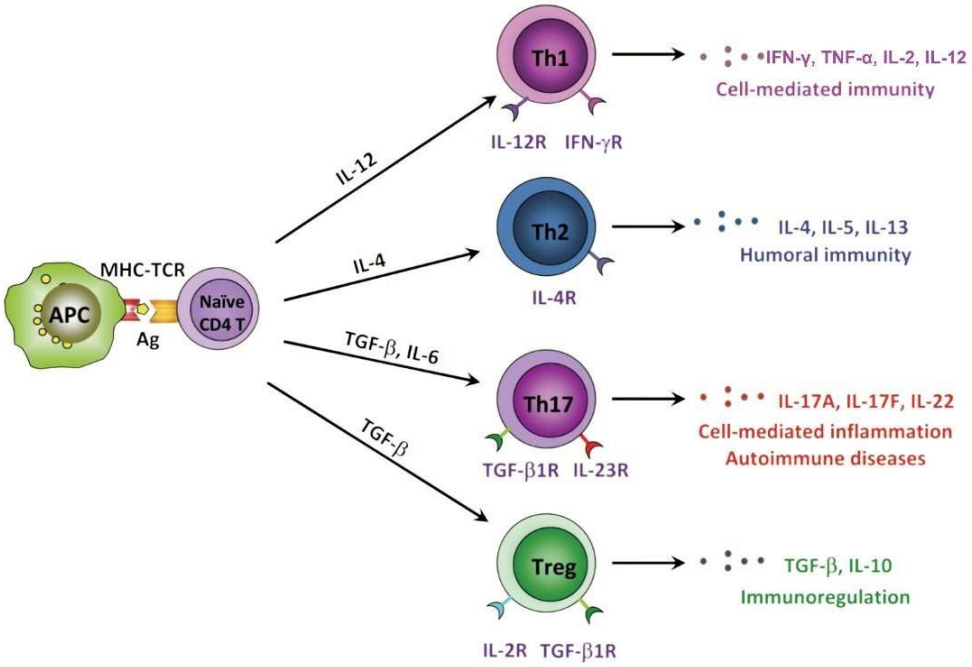

Figura 10. **Modelo para diferenciação das células Th das células T CD4$^+$ *naive*.** Na presença de IL-12, a diferenciação de células T CD4$^+$ *naive* em células Th1. As células Th1 produzem IFN-γ e estão envolvidas na imunidade mediada por células. IL-4 promove a diferenciação em células Th2. As células Th2 são importantes na imunidade humoral contra parasitas, uma ação que é mediada através da sua produção de IL-4, IL-5, IL10 e IL-13. A combinação de citocinas TGF-b e pró-inflamatórias, como a IL-6 e a IL-23, conduz a diferenciação em células Th (Th17) produtoras de IL-17. Além disso, o TGF-b pode induzir a diferenciação em células Treg, que produzem TGF-b e IL-10 e atuam como moduladores de respostas imunitárias. APC, célula que apresenta antígeno; IFN, interferon; MHC-TCR, receptor de células-T de histocompatibilidade; TGF, fator de crescimento transformador; Th, T *helper*; Treg, T. reguladores. Fonte: Adaptado Leung et. al, 2010 (Leung, Liu et al. 2010)

No cenário da DC, a tentativa do hospedeiro de controlar a carga parasitária está associada a uma resposta imune do tipo T *helper* 1 (Th1), tanto no miocárdio quanto na periferia. Esta resposta é caracterizada pela expressão do fator de transcrição T-bet (TBX21), principal fator de transcrição que dirige a diferenciação de Linfócitos T em Th1. Esse subtipo de linfócito T produz altos níveis de citocinas típicas da resposta Th1, importante no controle do parasitismo e que são acompanhadas por níveis suprimidos de fatores de transcrição e citocinas associadas com as respostas Th2 e Th17 (Dutra, Gollob et al. 1997, Cunha-Neto and Kalilf 2001, Paiva, Feijó et al. 2012). A resposta imune Th1 tem papel protetor principalmente por meio da síntese de óxido

nítrico, que mata o *T.*cruzi (Chandra, Tanowitz et al. 2002, Gutierrez, Mineo et al. 2009).

A cardiomiopatia chagásica crônica não é totalmente compreendida. Evidências recentes têm mostrado que o dano tecidual é principalmente causado pela resposta inflamatória crônica que o *T. cruzi* desencadeia (Burgos, Diez et al. 2010). Há um consenso de que o equilíbrio entre a persistência da infecção e a resposta imune do hospedeiro é crucial para o estabelecimento e progressão da cardiomiopatia. Sabe-se que durante a fase crônica, a inflamação é o principal determinante da progressão da cardiomiopatia chagásica. Outros fatores que podem contribuir para a progressão são a virulência da cepa de *T. cruzi* e o tropismo do tecido(Dutra, Menezes et al. 2014, Poveda, Fresno et al. 2014). Assim, um ambiente inflamatório predomina na fase crônica, com produção de citocinas como IFN-γ e TNF-α e outros mecanismos citotóxicos, que levam a dano tecidual e, em última instância, a cardiomiopatia grave. Desta forma, se a resposta imunológica for ineficiente ou, paradoxalmente, levar ao dano tecidual, tanto a carga parasitária quanto a inflamação imunomediada aumentam. Em contraste, uma resposta imune melhorada, na qual a carga do parasita é reduzida e as consequências inflamatórias são mantidas em um nível mínimo, resulta em danos aos tecidos reduzidos(Tarleton 2003).

2.6 Tratamento

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o objetivo do tratamento para a DC é eliminar o parasito dos indivíduos infectados, diminuindo assim a probabilidade de desenvolver DC sintomática e também dificultar a transmissão do parasita (OMS,2012). Na ausência de vacinas contra a DC(Tarleton 2003), o tratamento com antiparasitário desempenha um papel essencial. Apenas dois medicamentos estão disponíveis há mais de quatro décadas: benzonidazol (BZN) e nifurtimox (NFX), sendo recomendado para infecção na fase aguda, casos de reativação durante a fase crônica e para forma congênita. Durante a fase aguda, os antiparasitários podem curar a infecção em 80-90% dos casos(Morillo, Marin-Neto et al. 2015, Müller Kratz, Garcia Bournissen et al. 2018, Dawidowski, Kalel et al. 2019). A eficácia do BZN na população adulta crônica indeterminada e seu potencial para impedir o desenvolvimento de cardiomiopatias ou patologias gastrointestinais ainda são uma questão de intenso debate(Chatelain and journal 2017, Cardoso, Ribeiro et al. 2018).

Em casos de intolerância ao BZN, tem-se como opção o NFX. O uso deste fármaco foi suspenso em muitos países devido à sua menor eficácia quando comparado ao BZN e também aos graves eventos adversos, mas é ofertado em casos específicos de resistência parasitária ou graves efeitos colaterais associados ao BZN(Le Loup, Pialoux et al. 2011, Kawaguchi, Leonart et al. 2019, Lascano, García Bournissen et al. 2020, Brito, Falcão et al. 2021).

Várias abordagens de tratamento da CCC com drogas tripanocidas produziram resultados inconsistentes, apesar da redução da carga parasitária. Camundongos infectados foram observados pré e pós-tratamento com benznidazol (Zaidenberg, Luong et al. 2006) e o tratamento foi capaz de eliminar o parasita e impedir em partes o prolongamento do intervalo PR ao longo do tempo, porém, ao final do estudo, os camundongos tratados com benznidazol não apresentaram melhorias em relação aos controles. Um outro estudo avaliou ratos infectados tratados com benzonidazol e não encontrou melhora da função cardíaca desses animais (Wen, Gupta et al. 2010). Em humanos, a prescrição de benzonidazol melhorou o prognóstico da doença cardíaca em alguns casos (Viotti, Vigliano et al. 2006), mas não em outro estudo (Molina, Gómez i Prat et al. 2014). Vale frisar os achados do estudo BENEFIT, onde foi observado que pacientes clinicamente assintomáticos com cardiomiopatia chagásica estabelecida, a terapia com BZN não reduziu significativamente a deterioração clínica cardíaca, no entanto, reduziu significativamente a detecção de parasitas no soro(Kawaguchi, Leonart et al. 2019).

A insuficiência cardíaca na doença de Chagas é associada à ativação neuro-humoral, semelhante a outras etiologias de cardiomiopatia dilatada, e a base da terapia está de acordo com as diretrizes do *American College of Cardiology/American Heart Association* para o manejo de pacientes com insuficiência cardíaca sistólica(Yancy, Jessup et al. 2013).

A morte súbita tem sido relatada como a principal causa de mortalidade nos pacientes chagásicos, e nesses casos, o cardioversor-desfibrilador implantável tem sido utilizado para prevenir a morte súbita cardíaca(Rassi Jr, Rassi et al. 2001, Pereira, Rocha et al. 2014). Alguns dados também sugerem que a amiodarona pode melhorar a sobrevida em pacientes com alto risco de morte arrítmica. Desta forma, a amiodarona tem sido recomendada como tratamento de pacientes com taquicardia ventricular sustentada e também para aqueles com taquicardia ventricular não sustentada e disfunção miocárdica. Além disso, a terapia com cardiodesfibrilador implantável mais amiodarona tem se mostrado superior do que a amiodarona isolada para prevenção secundária de morte súbita em pacientes com cardiomiopatia chagásica(Malik, Singh et al. 2015). Pacientes com bloqueio atrioventricular de alto grau ou com bradicardia sintomática necessitam de tratamento com estimulação cardíaca permanente(Epstein, DiMarco et al. 2008).

As terapias atualmente disponíveis estão longe do ideal, principalmente pelos seus efeitos colaterais, que podem interromper o protocolo terapêutico e afetar a adesão ao tratamento. Outros fatores que podem influenciar a eficácia incluem idade do paciente, sistema imunológico e origem geográfica, que pode aumentar o risco de infecção por uma determinada cepa de *T. cruzi* com resistência natural a ambas as drogas(Junior, Molina et al. 2017). Assim, no contexto atual da DC, a intervenção farmacológica tem várias desvantagens. Por esta razão, um tratamento

melhor, mais seguro e mais acessível do que os tratamentos de referência com BZ e NFX é urgentemente necessário.

2.7 Treinamento Físico

O treinamento físico (TF) emergiu nas últimas décadas como um promotor crítico da saúde humana, especialmente na presença de patologias crônicas como por exemplo, a insuficiência cardíaca e a hipertensão arterial. O *American College of Sports Medicine* apresentou diretrizes e recomendações para direcionar uma prática correta de TF e a presença de complicações cardíacas (Schmitz, Courneya et al. 2010, Garber, Blissmer et al. 2011). Dessa forma, um plano estruturado de treinamento físico é agora considerado parte integrante da prescrição médica para fins preventivos e terapêuticos de algumas doenças cardiovasculares. Com base no estado de saúde e na capacidade física do paciente, pode ser prescrito um plano estruturado e personalizado de treinamento físico, incluindo tipo e intensidade dos exercícios, duração, frequência, progressão e métodos de execução. A prescrição de um bom programa de condicionamento físico é fundamental para evitar maiores complicações em relação à doença. Dessa forma, o TF surgiu como uma estratégia complementar no tratamento do paciente chagásico com o objetivo de melhorar a resistência do hospedeiro contra a infecção por T. cruzi (Schebeleski-Soares, Occhi-Soares et al. 2009, Lima, Rocha et al. 2010, Novaes, Gonçalves et al. 2017).

A infecção por T. cruzi afeta a capacidade funcional e a tolerância ao exercício físico dos indivíduos acometidos e pouco é entendido sobre como o processo infeccioso altera a tolerância ao exercício físico em modelos experimentais e na clínica (Novaes, Penitente et al. 2011) . A redução da capacidade funcional em indivíduos com DC é multifatorial e como citado anteriormente, envolve alterações patológicas graves em órgãos e tecidos como o SNA (condução átrio-ventricular), músculo cardíaco (contratilidade) entre outros. Apesar dos prejuízos na capacidade funcional, a DC pode ter sua sintomatologia e ter a sua progressão atenuada pelas alterações morfofisiológicas já conhecidas que são promovidas pelo treinamento físico, tais como: redução dos níveis pressóricos e da frequência cardíaca, remodelamento estrutural cardiovascular e melhora da função cardíaca (Morvan, Lima et al. 2013). Também é bem estabelecido que o TF promove vários estímulos capazes de alterar o metabolismo do organismo em períodos relativamente curtos de treinamento, sendo capaz de mudar a expressão de genes envolvidos no aprimoramento da capacidade funcional. Por exemplo, o TF regular é capaz de estimular a de biogênese mitocondrial no músculo esquelético, sendo o processo que

regula a síntese de novas mitocôndrias permitindo o resgate da massa mitocondrial para sustentar os suprimentos de energia cardíacos (Scarpulla 2011).

Embora as investigações nesta área ainda sejam escassas, um estudo indicou que um período de 12 semanas o treinamento aeróbico melhora o consumo máximo de oxigênio, frequência cardíaca, a resposta cronotrópica e a tolerância ao exercício em pacientes chagásicos(Alves, Cardoso et al. 2019). Estudo clínicos em pacientes com CCC, o treinamento físico é capaz de melhorar a função da microvasculatura cutânea, hemodinâmica, parâmetros ecocardiográficos e sintomas clínicos da doença (Nascimento, Lima et al. 2014, Mediano, Mendes Fde et al. 2016, de Souza Nogueira Sardinha Mendes, Mediano et al. 2020). Além disso, um programa de treinamento em esteira de 8 semanas pré-infecção provou ser eficaz na redução da parasitemia e perda de peso induzida pela infecção em camundongos(Schebeleski-Soares, Occhi-Soares et al. 2009). Em modelos experimentais de CCC, o treinamento físicos melhoram parâmetros morfológicos e morfométricos do tecido cardíaco(Preto, Lima et al. 2015, Ferraboli, Ornelas et al. 2018). Apesar das evidências para esta intervenção serem limitadas, os efeitos imuno-moduladores e melhorias no controle da parasitemia (ou do parasito), equilíbrio redox e função cardiorrespiratória estão entre os benefícios cardioprotetores induzidos pelo exercício observados em animais infectados com *T. cruzi*, mas também em humanos(Preto, Lima et al. 2015, Novaes, Gonçalves et al. 2016, Alves, Cardoso et al. 2019). Considerando que o sistema imunológico é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi* e que processos inflamatórios exacerbados levam ao estresse oxidativo intenso e a danos graves ao coração, as adaptações metabólicas, bem como um melhor balanço imunológico das respostas Th1 / Th2 promovidas pelo treinamento físico apoiam a indicação desta intervenção para uma possível estratégia terapêutica da doença de Chagas(Novaes, Gonçalves et al. 2016, Lucchetti, Zanluqui et al. 2017, Mendonça, Gonçalves et al. 2019, Santos, Gonçalves et al. 2019).

A doença de Chagas atualmente representa um dos maiores desafios terapêuticos da medicina tropical, pois o *T. cruzi* tem um ciclo de vida complexo em ambientes silvestres, rurais e urbanos, e os fatores de suscetibilidade tanto em hospedeiros quanto em parasitas têm diferentes influências no desfecho da doença. Essa complexidade também tem dificultado o desenvolvimento de uma vacina contra o *T. cruzi* mesmo usando metodologias tão diferentes quanto projetar antígenos protetores específicos ou gerar parasitas atenuados. Há décadas a cura para a doença de Chagas tem sido buscada, mas não houve melhorias na quimioterapia quanto à segurança ou eficácia, apesar de meio século de intensa pesquisa(Gaspar, B Moraes et al. 2015) Assim, a partir de um melhor entendimento dos mecanismos de ação do exercício físico no perfil eletromecânico cardíaco durante a DC irá contribuir para o melhor entendimento da

fisiopatologia da doença, podendo auxiliar na proposta de um tratamento que seja mais eficaz para a DC. Nesse cenário, hipotetizamos que o treinamento físico poderia promover alterações benéficas no tecido cardíaco, minimizando a possível evolução da DC.

3. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é explorar o potencial do treinamento físico aeróbico como terapêutica na cardiopatia chagásica, investigando as bases celulares e sistêmicas associadas na modulação da progressão da infecção experimental com *T. cruzi* pelo treinamento físico aeróbico de intensidade moderada.

3.1- Objetivos Específicos

1- Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada na curva de parasitemia, mortalidade e peso corporal na progressão da Doença de Chagas;

2- Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada na tolerância ao esforço físico e na capacidade aeróbica durante a progressão da Doença de Chagas;

3- Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada na estrutura do tecido cardíaco durante a fase crônica da Doença de Chagas;

4- Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada no perfil eletrocardiográfico dos camundongos durante a fase crônica da Doença de Chagas;

5- Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada no PA cardíaco durante a fase crônica da Doença de Chagas;

6- Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada nas propriedades do transiente de cálcio dos cardiomiócitos durante a fase crônica da Doença de Chagas;

7- Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada na contratilidade celular do miócito cardíaco durante a fase crônica da Doença de Chagas.

4.Material e Métodos

4.1. Animais de experimentação

Para a execução deste projeto, foram utilizados camundongos machos BALB/c adultos, com idade de 7 semanas, obtidos no CEBIO (ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil). Foi escolhido o camundongo Balb/C. Este modelo foi escolhido porque quando infectado pelo *T. cruzi*, apresenta maior suscetibilidade à infecção, e desenvolve sintomatologia na fase crônica que mimetiza a arritmogênese chagásica e disfunção cardíaca em humanos. Os animais foram

distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Controle sedentário, Controle treinado, Chagas sedentário e Chagas treinado. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Fisiologia e Biofísica na Universidade Federal de Minas Gerais, respeitando-se o ciclo diário de 12 h de iluminação. Água e ração específica para roedores foi fornecido *ad libitum*. Os procedimentos relacionados ao manejo dos animais e a execução experimental foram aprovados e realizados em concordância com as normas estabelecidas pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA-UFMG), aprovados segundo o protocolo n° 123/2020.

4.2 Infecção:

Os camundongos dos grupos Chagas sedentário e Chagas treinado foram infectados com 100 parasitos da forma tripomastigota de *Tripanossoma cruzi* da cepa Colombiana, de forma intraperitoneal 48 horas após a última sessão de treino em que completaram 8 semanas do protocolo de treinamento. A parasitemia foi monitorada conforme descrito por Brener (1962)(Brener 1962), pela contagem de tripomastigotas em 5µL de sangue da veia da cauda todos os dias desde o quinto dia pós-infecção. A mortalidade dos camundongos infectados também foi monitorada diariamente. Todos os outros procedimentos experimentais foram realizados entre 60/70 dias após a infecção (dpi), correspondendo a fase crônica da doença.

4.3 Familiarização à corrida em esteira rolante

Este procedimento foi realizado em uma esteira rolante motorizada (Gaustec Magnetismo, Nova Lima, MG, Brazil). Todos os camundongos, de todos os grupos experimentais foram familiarizados por cinco dias consecutivos a um exercício de corrida em esteira rolante para pequenos animais. Esta familiarização consistiu de 5 minutos de repouso na esteira seguidos por 5 minutos de corrida a velocidade de 10 $m.min^{-1}$, sem inclinação. A familiarização teve a finalidade de reduzir o estresse do animal diante de uma nova condição habitual (Lacerda, Marubayashi et al. 2005, Prímola-Gomes, Pires et al. 2007).

4.4 Teste de corrida com velocidade incremental até a fadiga (TVI)

Este procedimento foi realizado em esteira rolante motorizada individual (LE400, Panlab, Harvard Apparatus, Cornella, Spain). O TVI era iniciado a uma velocidade de 6 $m.min^{-1}$, com acréscimos de 3 $m.min^{-1}$ a cada 3 minutos até a interrupção. A inclinação da esteira foi mantida em 0°, como previamente descrito (Ferreira, Rolim et al. 2007). Nesse procedimento foi utilizado o estímulo elétrico (0,2 mA) com o objetivo de manter o animal no tapete de corrida da esteira. O critério adotado para interrupção do TVI foi definido como o momento no qual os

camundongos eram incapazes de manterem o padrão de corrida na velocidade determinada pela esteira por pelo menos 10s, mesmo quando expostos ao estímulo elétrico. O TVI foi realizado antes do início do protocolo do treinamento em todos os grupos experimentais e repetido nos animais dos grupos treinados na 4ª, 8ª, 12ª para ajuste da intensidade da corrida. Já ao final da última semana de treinamento (16ª semana) o TVI foi realizado em todos os grupos experimentais.

4.5 Medida do Consumo de Oxigênio

O VO_2 foi mensurado via calorimetria indireta de circuito aberto (LE400, Panlab, Harvard Apparatus, Cornella, Spain), calibrado previamente calibrado com uma mistura de gases conhecida (*high* O_2= 50,05%, *high* CO_2= 1,51%, *low* O_2= 20,02% e *low* CO_2= 0,00%). A taxa de fluxo de ar estabelecida foi equivalente 0,5 $L.min^{-1}$ durante todo os procedimentos. O VO_{2pico} avaliado durante o TVI consistiu no maior valor de VO_2 mensurado no último estágio de corrida atingido pelo camundongo. Os dados de VO_2 foram analisados utilizando um sistema computadorizado (Metabolism software versão 2.2.01 Panlab, Harvard Apparatus) e transformado para mililitros por minutos e relativizado pela massa corporal dos camundongos ($mLO_2.kg^{-0.75}.min^{-1}$). Em todas as situações, após o animal ter sido colocado na esteira, foram aguardados 30 minutos para estabilização dos parâmetros do analisador de gases antes de serem iniciadas as medidas de VO_2.

4.6. Protocolo de treinamento físico

O protocolo de treinamento de corrida em esteira rolante motorizada (Gaustec Magnetismo, Nova Lima, MG, Brazil) foi realizado cinco dias por semana, por 60 minutos e a inclinação da esteira foi mantida em 0° ao longo de todo treinamento físico. A intensidade relativa do treinamento foi dada pela velocidade de corrida correspondente a 60% da Velocidade máxima (V_{max}) alcançada no TVI para avaliação do VO_2. Durante a primeira semana de treinamento, a velocidade e o tempo do exercício foram progressivamente aumentados até alcançar 60% da velocidade máxima e 60 minutos ao final da primeira semana e mantendo a mesma intensidade e tempo de exercício a partir da segunda semana. O protocolo de treinamento está representado na tabela 1. O tempo total do protocolo de treinamento físico foi de dezesseis semanas. É importante frisar que para garantir o mesmo estresse de manuseio e exposição à esteira motorizada, os camundongos de todos os grupos não treinados foram submetidos a uma caminhada de 6m. min^{-1} com duração de cinco minutos durante 3 dias/semana. Antes de cada sessão de treinamento os camundongos eram pesados em uma balança de precisão.

Tabela 1. Protocolo treinamento

Primeira Semana				
2ª feira	3º feira	4ª feira	5ª feira	6ª feira
10% da VM 10 min	20% da VM 20 min	30% da VM 30 min	40% da VM 40 min	50% da VM 50 min
Segunda Semana				
60% da VM 60 min	60% da VM 60 min	60% da VM 60 min	60% da VM 60 min	60% da VM 60 min
Terceira Semana- Quarta Semana (2ª feira a 4ª feira)				**6ª feira**
60% da VM 60 min				AJUSTE DE INTENSIDADE
Quinta Semana- Oitava Semana (2ª feira a 4ª feira)				**6ª feira**
60% da VM 60 min				AJUSTE DE INTENSIDADE
Nona Semana- Décima segunda Semana				**6ª feira**
60% da VM 60 min				AJUSTE DE INTENSIDADE
Décima terceira Semana- Décima sexta Semana				
60% da VM 60 min	60% da VM 60 min	60% da VM 60 min	60% da VM 60 min	60% da VM 60 min

VM = velocidade máxima

4.7 Isolamento dos Cardiomiócitos

Os experimentos apresentados neste projeto foram realizados a partir de cardiomiócitos oriundos do ventrículo esquerdo, isolados de acordo com o método descrito por Shioya (2007) (Shioya 2007), com pequenas modificações. Após 48 horas da última sessão de treinamento, os animais foram sacrificados. Nesse processo, os camundongos foram eutanaziados por decapitação 10 min após serem heparinizados (50u, i.p.) e em seguida, para a rápida remoção cirúrgica do coração, os pelos da região torácica foram removidos e o esterno foi pinçado, abaixo foi realizado o corte sentido a axila, e então o esterno foi rebatido para cima. Após a exposição da cavidade torácica, o timo foi deslocado da caixa torácica e retirado juntamente com os pulmões e coração. Os corações removidos foram então mantidos em solução de CIB (do inglês, *cell isolation buffer*, contendo, em mM: 130 NaCl; 5,4 KCl, 0,5 $MgCl_2$; 0,33 NaH_2PO_4; 22 glicoses; 25 HEPES) isenta de cálcio, onde foi adicionado EGTA (0,4 mM). Os corações foram limpos dos fragmentos pulmonares, tecido vascular e adiposo adjacente, deixando intacto apenas o tronco aórtico, através do qual os corações foram canulados e montados em um sistema de perfusão do tipo Langendorff de pressão constante (~73 mmHg), mantidos à temperatura de 37

± 0,5 °C. Os corações foram então perfundidos de maneira retrógrada com CIB+EGTA por 2-5 min para a que o sangue presente no sistema das coronárias e câmaras cardíacas fosse eliminado. Após isso, o coração foi perfundido por 4-5 min com a solução CIB (sem EGTA) acrescida dos seguintes componentes: 0,3 mM de $CaCl_2$; 0,8 mg/mL de colagenase do tipo II; 0,06 mg/mL de proteinase tipo XXIII e 0,06 mg/mL de tripsina. Após essa etapa inicial de digestão enzimática, os corações foram seccionados, separando-se apenas o ventrículo esquerdo, que foi transferido para uma segunda solução de CIB (sem EGTA), com a mesma quantidade de enzimas citadas acima, porém contendo 0,7 mM de $CaCl_2$, durante 7 min, mantida aquecida à 37 °C. Após leve agitação mecânica utilizando-se pipeta de transferência, o sobrenadante foi filtrado em malha de 200 μm e centrifugado a 1000 rpm por 20 segundos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspendido em solução CIB contendo 1,3 mM de $CaCl_2$ e 2 mg/mL de albumina sérica bovina. Após 10 min em repouso a solução foi novamente centrifugada e o pellet foi ressuspendido em solução de Tyrode (contendo, em mM: 140 NaCl; 5,4 KCl; 0,5 MgCl2; 0,33 NaH_2PO_4; 11 glicose; 5 HEPES e 1,8 $CaCl_2$), onde as células foram mantidas por até 4h a temperatura ambiente, para realização dos experimentos.

4.8 Experimentos de contratilidade celular

Miócitos cardíacos provenientes do ventrículo esquerdo recém-isolados foram utilizados nos ensaios de contratilidade celular através da medida da alteração do comprimento dos cardiomiócitos utilizando o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA). Para a análise da contratilidade celular (figura 11), as células foram plaqueadas em uma lamínula acoplada à uma câmara contendo um par de eletrodos paralelos, por meio dos quais foi feita a estimulação de campo para evocar a contração celular. A estimulação foi feita utilizando-se um estimulador elétrico, através de pulsos com duração de 4 ms e intensidade de 80 V bifásico com frequência de estimulação de 1Hz. Durante os experimentos de contratilidade, as células foram mantidas em uma solução de Tyrode e em temperatura ambiente (25-30 ºC). A câmara contendo as células plaqueadas foi montada em um microscópio invertido (Eclipse, TS 100, Nikon, Japão), e as imagens foram visualizadas em um computador utilizando uma câmera NTSC (MyoCamCCD100V, Ionoptix, Milton, MA, USA). Estas imagens foram utilizadas para mensurar o encurtamento celular em resposta a um estímulo elétrico usando um sistema de vídeo detector de bordas (Ionoptix, Milton, MA, USA) previamente calibrado para a objetiva utilizada. As variáveis envolvendo a contração e relaxamento da célula foram calculados baseando-se no sinal digitalizado obtido pelo sistema de detecção de bordas do conversor analógico-digital IonWizard A/D (Ionoptix, Milton, MA, USA). A partir dos registros obtidos, foram analisadas a

amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso, %), tempo para 50% do pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento. Somente foram utilizados para os experimentos, os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias.

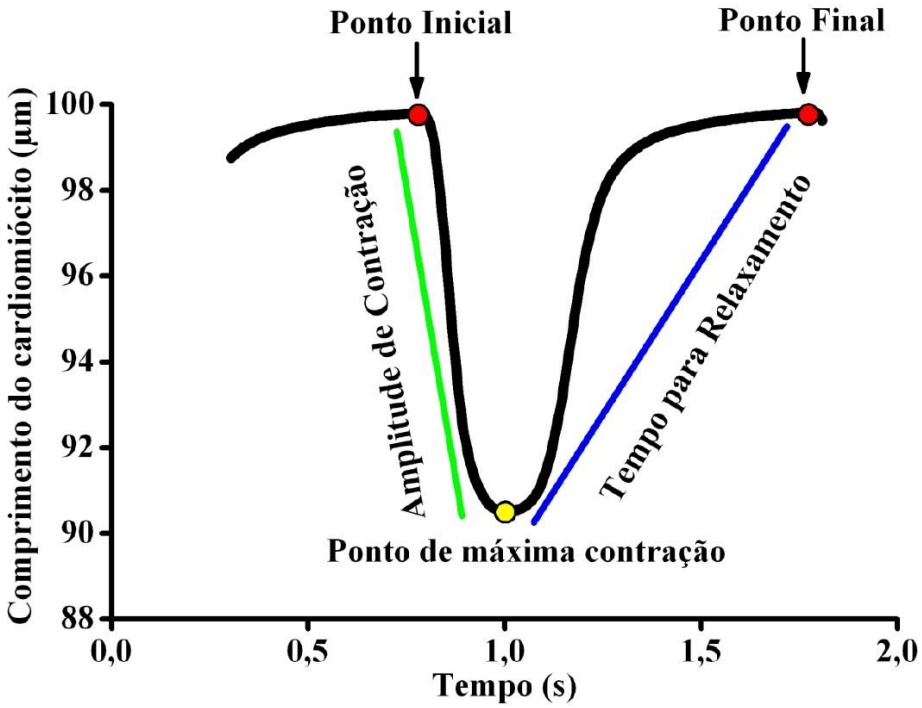

Figura 11. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros analisados. Fonte: (Júnior).

4.9 Microscopia confocal

Os miócitos cardíacos provenientes do ventrículo esquerdo recém-isolados foram marcadas pela adição do indicador fluorescente de cálcio Fluo-4 em sua forma acetoximetil éster (AM), na solução de Tyrode, respeitando uma concentração final de 5 µM do marcador.

As células foram mantidas em leve agitação por 30 min à temperatura ambiente, e após esse tempo, foram centrifugadas e ressuspendidas em solução de Tyrode, onde permaneceram por mais 10 min para desesterificação. As mudanças transitórias na $[Ca^{2+}]_i$ evocadas através dos transientes de cálcio foram medidas através do método de microscopia confocal, por meio do sistema de microscopia confocal Zeiss LSM 880 (Zeiss, Alemanha), localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB). Durante esse procedimento as células, após a marcação com o fluoróforo indicador de cálcio, foram depositadas em uma lamínula acoplada a uma câmara que continha um par de eletrodos paralelos através dos quais foi feita a estimulação

de campo para ativação dos transientes de cálcio, por meio de pulsos com duração de 4 ms e amplitude de 80 V, bifásicos, com frequência de estimulação de 1 Hz. Para aquisição dos transientes de cálcio (figura 12) foi realizada a excitação utilizando laser de luz monocromática com comprimento de onda de 488nm. A luz emitida pelo processo de fluorescência após a excitação do fluoróforo associado ao Ca^{2+} foi transmitida para um fotomultiplicador, após passar por um filtro passa-alta de 505nm. A linha de varredura (fixada em 512 pixels) foi posicionada ao longo do eixo longitudinal dos cardiomiócitos, evitando-se as regiões dos núcleos. As mudanças na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência basal (F0) antes do primeiro transiente registrado, de tal modo que alterações na $[Ca^{2+}]_i$ estão expressas como F/F0, valor que representa a média da amplitude dos 10 transientes obtidos. A média dos desvios padrões obtidos para cada conjunto de 10 transientes foi utilizada como medida da variação na amplitude entre os transientes. As análises da intensidade do sinal de florescência foram feitas utilizando o software Image-J. A figura x mostra um traçado representativo do transiente de cálcio. A linha de varredura (512 pixels) foi posicionada ao longo do eixo longitudinal dos cardiomiócitos, evitando-se as regiões dos núcleos e a resolução temporal utilizada foi de 1,6ms/linha. O pinhole foi ajustado para 2.0µm de fatia óptica.

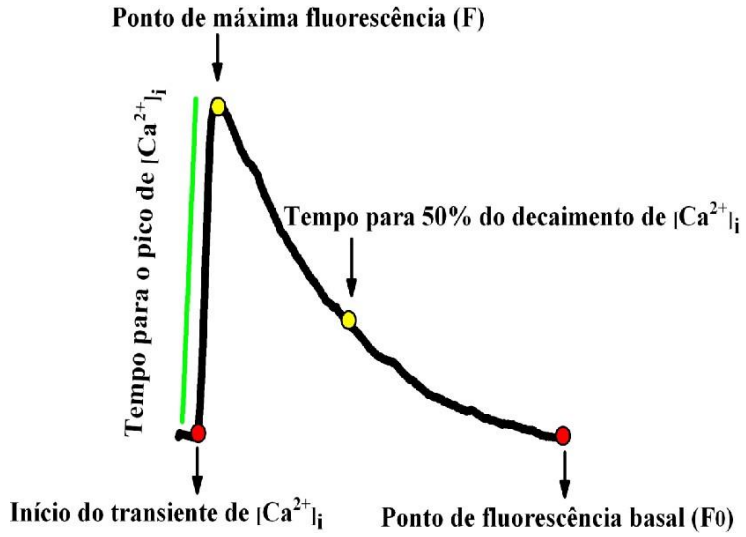

Figura 12. Traçados representativos das imagens de fluorescência para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados (Júnior).

4.10 Histologia

Para a análise histológica, camundongos (n = 6 animais por grupo) foram eutanasiados e os corações foram coletados. Os tecidos cardíacos foram fixados em paraformaldeído (PFA 4%) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, durante 24 horas a 4 °C. Os tecidos foram então processados por lavagens sequenciais com etanol 70%, 80%, 90% e 100%, clarificados com xilol, e

finalmente incluídos em parafina. Cortes transversais (5 μm) foram coletados em micrótomo (modelo HM335E; Microm, Inc., Minneapolis, MN, EUA), partindo da área basal do coração e, a seguir, corados com Hematoxilina-eosina para a análise morfométrica. Cortes dos tecidos (3 para cada animal) foram examinados com um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 100M) e analisados usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, EUA) usando método semelhante ao publicado anteriormente (Santos-Miranda A. et al 2019). A análise morfométrica foi feita com o auxílio de uma grade pré-definida e uma ferramenta de contagem de células para a quantificação dos parâmetros pré-estabelecidos. A quantificação por animal foi definida a partir de 1.000 pontos de interseção da grade, usando 10 imagens diferentes. Os parâmetros quantificados foram: núcleos de cardiomiócitos, fibras de cardiomiócitos, infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, núcleos de outras células, estroma e artefatos. A ocupância dos cardiomiócitos foi calculada pela soma entre o número de núcleos e fibras cardíacas. Os valores finais foram expressos em porcentagem.

4.11 Eletrocardiograma

Os registros eletrocardiográficos (ECG) in vivo foram realizados com um eletrocardiógrafo não invasivo (ECG-PC versão 2.07, TEB, Brasil), por 5 min. Durante o procedimento, apenas as derivações periféricas foram registradas devido às limitações experimentais no posicionamento dos eletrodos de tórax. Os camundongos foram sedados com 1,5% de isoflurano saturado com oxigênio. Todas as leituras foram realizadas em DII, a 50 mm / s e amplificação 2 N, após a fixação dos eletrodos na pele de cada membro do camundongo.

4.12 Experimentos de patch-clamp

Cardiomiócitos provenientes do ventrículo esquerdo recém isolados também foram plaqueadas e banhadas com solução de Tyrode. A placa contendo as células foi acoplada a um microscópio invertido (Axiovert 25, Zeiss, Alemanha). Foi utilizado um amplificador EPC 10 (HEKA, Hamburgo, Alemanha) para as medidas dos potenciais transmembrana nos cardiomiócitos isolados, tendo como referência (fio terra) um eletrodo imerso na placa contendo as células isoladas, o qual foi conectado ao amplificador via *headstage*. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se a configuração *whole-cell current-clamp* para medir potenciais de ação. As pipetas utilizadas nos experimentos possuíam resistência entre 1-2 MΩ. Todas as correntes foram filtradas por meio de um filtro Bessel, passa-baixa com frequência de corte de 2.9 kHz. Após o estabelecimento da configuração *Whole-cell*, as células foram mantidas em repouso por um intervalo de 2-3min, de modo a permitir com que o meio intracelular se equilibrasse com a

solução de pipeta. Os transientes capacitivos foram neutralizados em todos os experimentos. Células com resistência em série superiores a 8 MΩ não foram utilizadas durante as análises. A frequência de aquisição do sinal digital foi de 10 kHz e de estimulo de 1Hz. Os registros adquiridos foram digitalizados por meio de um conversor de sinal analógico-digital e armazenadas em computador. Durante a análise dos experimentos, os registros foram exportados em formato de texto (Igor) e convertidos para a extensão ".abf" (abf utility Software), para então serem analisados usando-se o software Clampfit 10 (Molecular Devices, EUA).

Nos registros do PA, o amplificador foi imediatamente colocado no modo *current-clamp* e o potencial da membrana de repouso foi medido. As pipetas foram preenchidas com uma solução interna composta por, em mM: 20 KCl; 130 K-aspartate; 130 KOH; 10 HEPES; 2 $MgCl_2$; 5 NaCl, ajustado para pH 7.2 com KOH. A solução externa utilizada foi a Tyrode. Foi utilizado um pulso de corrente de curta duração (3-5ms) e amplitude de 1nA para desencadear o potencial de ação de cardiomiócitos recém isolados do ventrículo esquerdo de todos os grupos. Para o protocolo de pausa após taquicardia em modo *current-clamp,* cardiomiócitos recém isolados do ventrículo esquerdo foram expostos a uma sequência de pulsos (100x, pulso com duração de 5ms e 1nA de amplitude) com alta frequência (10Hz), seguido de uma pausa de 10s. A partir desse protocolo foi analisado a presença de células com despolarizações pós potenciais (DADs), e/ou a presença de PAs espontâneos, como forma de se avaliar o perfil de distúrbios elétricos de membrana que refletem em um potencial arritmogênico celular, nos grupos experimentais.

4.13. Análise Estatística

A normalidade dos dados foi testada usando-se o teste Kolmogorov-Smirnov. A escolha dos testes estatísticos foi feita conforme normalidade de distribuição dos dados de cada variável medida. Os testes utilizados para cada variável estão especificados nas figuras, bem como o número de animais (N) e o número de células (n). Os dados são apresentados como média ± EPM. $P<0,05$ foi considerado para diferenças estatisticamente significantes. Foram usados os softwares ImageJ para análise das imagens, Clampfit para a análise eletrofisiológica, Graph Pad Prism 5.0 para confecção dos gráficos.

5. Resultados

5.1. Efeito do Treinamento físico na Parasitemia e Mortalidade durante a fase crônica da Doença de Chagas

Como descrito anteriormente, a doença de Chagas apresenta típico curso temporal para replicação do parasito e para ativação do sistema imune do hospedeiro vertebrado. Neste sentido,

caracterizamos a curva de parasitemia e a taxa de mortalidade ao longo da infecção. Como pode ser observado na figura 13A, nos animais do grupo Chagas sedentário, o número de parasitas no sangue entre 0-15 dias pós-infecção (dpi) é baixo, sendo que após 15 dpi, a curva de crescimento do parasito entra em uma fase de rápida expansão, atingindo o pico da parasitemia com 30 dpi. Em seguida, ocorre um declínio da parasitemia até os 60 dpi. Já os animais do grupo Chagas treinado, o exercício físico não altera o curso da doença, porém, de forma interessante, apresenta uma menor parasitemia 30 dpi. Nota-se, na figura 13B, que ocorre uma acentuada mortalidade no grupo Chagas Sedentário, principalmente após 30 dpi, e o exercício físico foi capaz de reduzir a mortalidade.

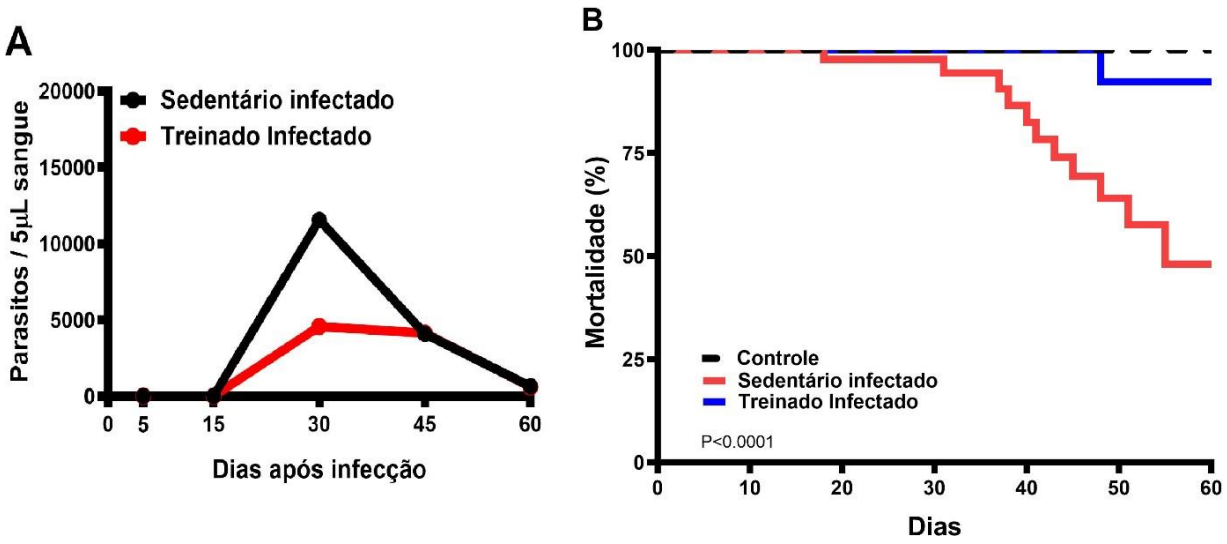

Figura 13. **Efeito do Treinamento físico na Parasitemia e Mortalidade durante a fase crônica da Doença de Chagas:** (A) Curva de parasitemia ao longo da infecção por *T. cruzi*; One-way ANOVA (B) Curva de mortalidade dos animais ao longo da infecção por *T. cruzi*; Teste Long Rank. Dados expressos em Média ± EPM. Sedentário infectado (N=40) e treinado infectado (N=40)

5.2. Efeito do Treinamento físico no peso corporal durante a fase crônica da doença de Chagas

Um dos eventos comuns observados com a progressão da doença de Chagas é a perda de peso. Neste estudo buscamos avaliar o efeito do protocolo de treinamento aeróbico moderado e a doença de Chagas sobre o peso corporal. Os dados estão representados na figura 10. Não houve diferença no peso corporal inicial (Figura 14A) entre os grupos, sedentário controle (20.16 ± 0.60 g), Chagas sedentárias (18.50 ± 0.72 g), treinado sedentário (18.80 ± 0.41 g) e Chagas treinado (19.25 ± 0.57). O peso corporal ao final (figura 10B) do período experimental foi menor nos

animais Chagas sedentário (26.16 ± 0.47 g) quando comparado ao grupo controle sedentário (33.83 ± 0.60 g) e ao grupo Chagas treinado (32.50 ± 0.80 g).

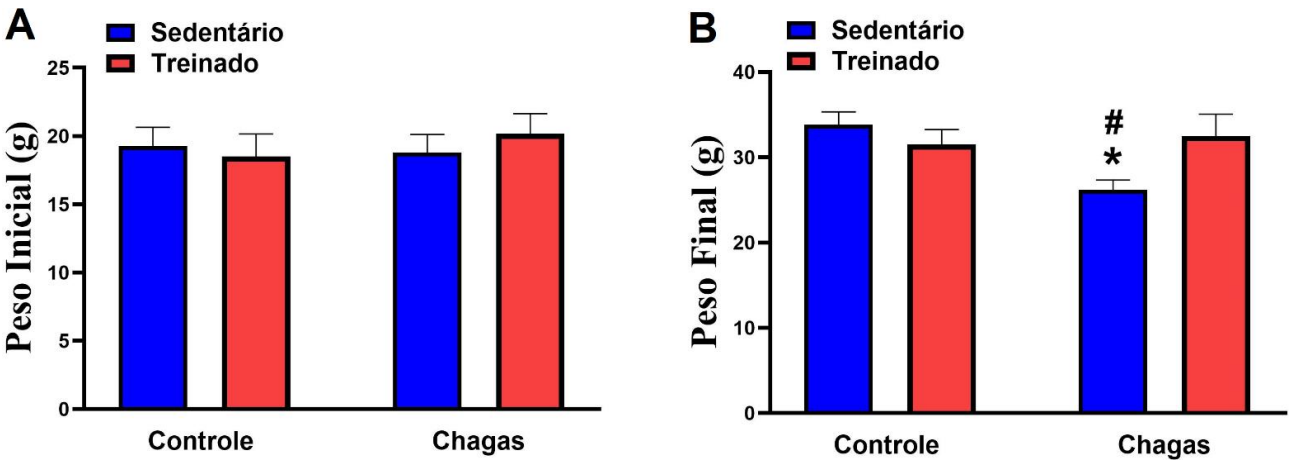

Figura 14**. Efeito do Treinamento físico no peso corporal durante a fase crônica da doença de Chagas.** (A)Peso corporal inicial e (B) peso corporal final. Grupos controle sedentário (N=10), controle treinado(N=10), Chagas sedentário(N=10) e Chagas treinado(N=10). * p< 0.05 em comparação com controle sedentário. # p< 0.05 em comparação com Chagas treinado. ANOVA *two-way* com post-test de Holm-Sidak para comparações múltiplas.

5.3. Papel do exercício físico na capacidade aeróbica durante a fase crônica da doença de Chagas.

A Doença de Chagas tem como um de seus principais sintomas a perda de capacidade aeróbica e incapacidade física, principalmente nos estágios mais avançados da doença. Ao analisar o pico da taxa de consumo de oxigênio inicial (Figura 15A) não foi observado diferença entre os grupos, controle sedentário (39.52 ± 1.35 mL. $Kg^{0,75}.min^{-1}$), controle treinado (41.23 ± 0.41 mL. $Kg^{0,75}.min^{-1}$), Chagas sedentário (40.18 ± 1.43 mL. $Kg^{0,75}.min^{-1}$) e Chagas treinado (38.93 ± 0.57 mL. $Kg^{0,75}.min^{-1}$) bem como não foi possível observar nenhuma diferença na velocidade máxima inicial entre os grupos analisados (Figura 11B), controle sedentário (21.00 ± 0.949 m/min), controle treinado (24.60 ± 2.20 m/min), Chagas sedentárias (23.00 ± 1.64 m/min) e Chagas treinado (22.20 ± 1.53 m/min). Quando consideramos o pico da taxa de consumo de oxigênio final (Figura 15C) e a velocidade máxima final (Figura 15D) observou-se que os animais Chagas sedentário apresentam menor VO_2pico (27.02 ± 0.55 mL. $Kg^{0,75}.min^{-1}$) e menor velocidade de corrida (17.14 ± 1.26 m/min) comparado ao grupo Chagas treinado (39.04 ± 0.65 mL. $Kg^{0,75}.min^{-1}$) (29.33 ± 1.20m/min) e ao grupo controle sedentário (38.75 ± 0.92 mL. $Kg^{0,}$

$^{75.}$min^{-1}) (28.50 ± 1.02 m/min), respectivamente. O treinamento físico aumentou o VO_2pico e a velocidade máxima dos animais controle treinado (52.75 ± 1.95 mL. Kg$^{0,\ 75.}$min^{-1}) (44.12 ±2.00 m/min) em relação ao grupo controle sedentário (38.75 ± 0.92 mL. Kg$^{0,\ 75.}$min^{-1}) (28.50 ± 1.02 m/min).

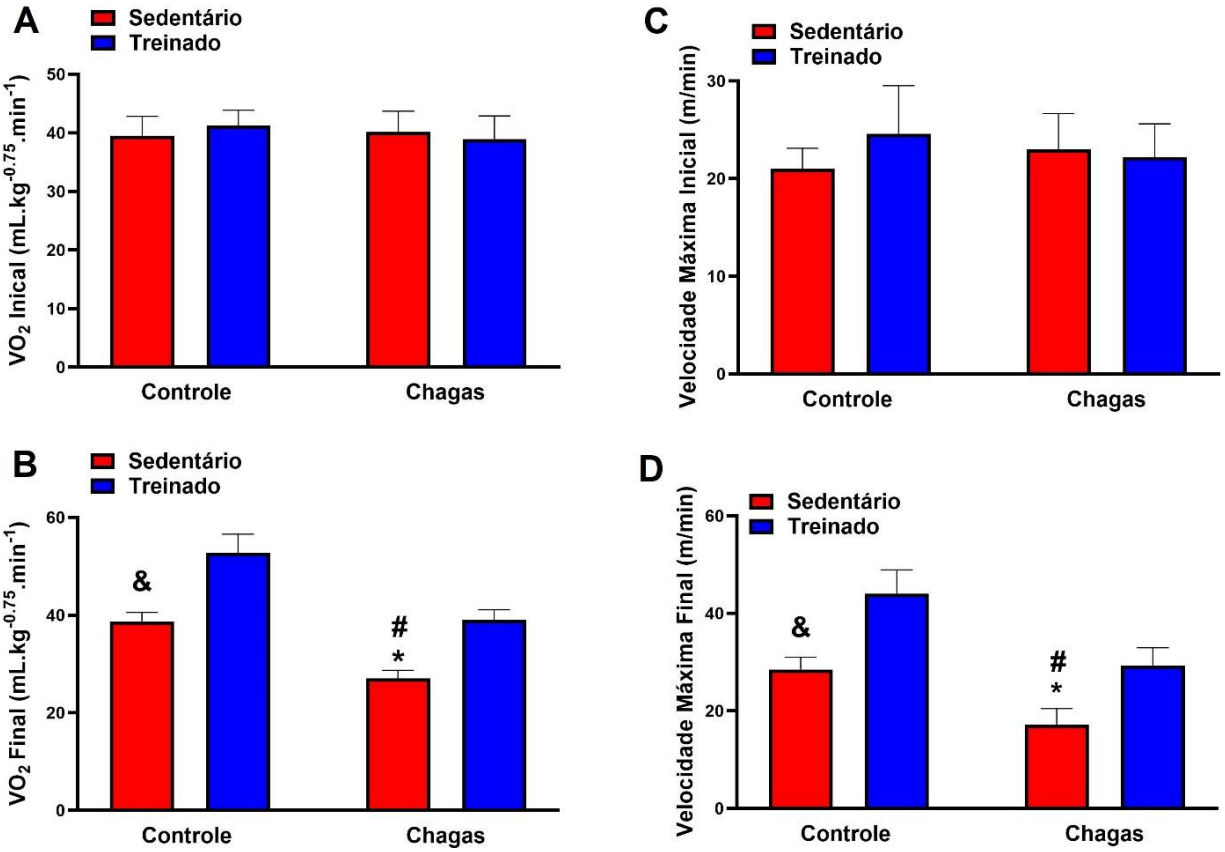

Figura 15**. Papel do exercício físico na capacidade aeróbica durante a fase crônica da doença de Chagas:** A doença de Chagas na fase crônica causa uma redução na capacidade aeróbica dos animais, porém, o treinamento físico previne essa perda. (A) Gráfico do Consumo de Oxigênio de Pico (VO_2Pico); (B) Gráfico da velocidade máxima. Grupos controle sedentário (N=10), controle treinado(N=10), Chagas sedentário (N=10) e Chagas treinado(N=10). * p< 0.05 em comparação com controle sedentário. # p< 0.05 em comparação com Chagas treinado; & p< 0.05 em comparação com controle treinado. Os dados foram analisados usando ANOVA *two-way* com post-test de Holm-Sidak para comparações múltiplas.

5.4. Efeito do Treinamento físico na histopatologia durante a fase crônica da doença de Chagas

Como apresentado na Figura 16A e em trabalhos anteriores do nosso grupo utilizando o mesmo modelo de infecção e modelos similares (Santos-Miranda, Joviano-Santos et al. 2020, Santos-

Miranda, Costa et al. 2021) a infecção experimental com *T. cruzi* em murinos apresenta um intenso infiltrado inflamatório (setas vermelhas) no grupo Chagas sedentário (45.28 ±1.05 %) quando comparado ao grupo controle sedentário (0.25 ± 12 %). Além disso, o exercício físico tem um efeito significativo na redução da inflamação nos animais do grupo Chagas treinado (8.41 ± 0.84 %). A análise histopatológica do tecido cardíaco demonstrou que os animais controle sedentário, controle treinado e Chagas treinado apresentaram morfologia normal do miocárdio, com cardiomiócitos organizados paralelamente, caracterizados pela ocupância de cardiomiócitos (Figura 16B) (94.81 ± 0.44 %, 94.49 ± 1.16%, 85.47 ± 0.53%, respectivamente). A doença de Chagas é responsável pela diminuição da ocupância de cardiomiócitos do grupo Chagas sedentário (50.05 ± 1.46 %) quando comparado ao controle sedentário (94.81 ± 0.44%). Já o exercício físico foi capaz de restaurar a ocupância de cardiomiócitos nos animais do grupo Chagas treinado (85.47 ±0.53%).

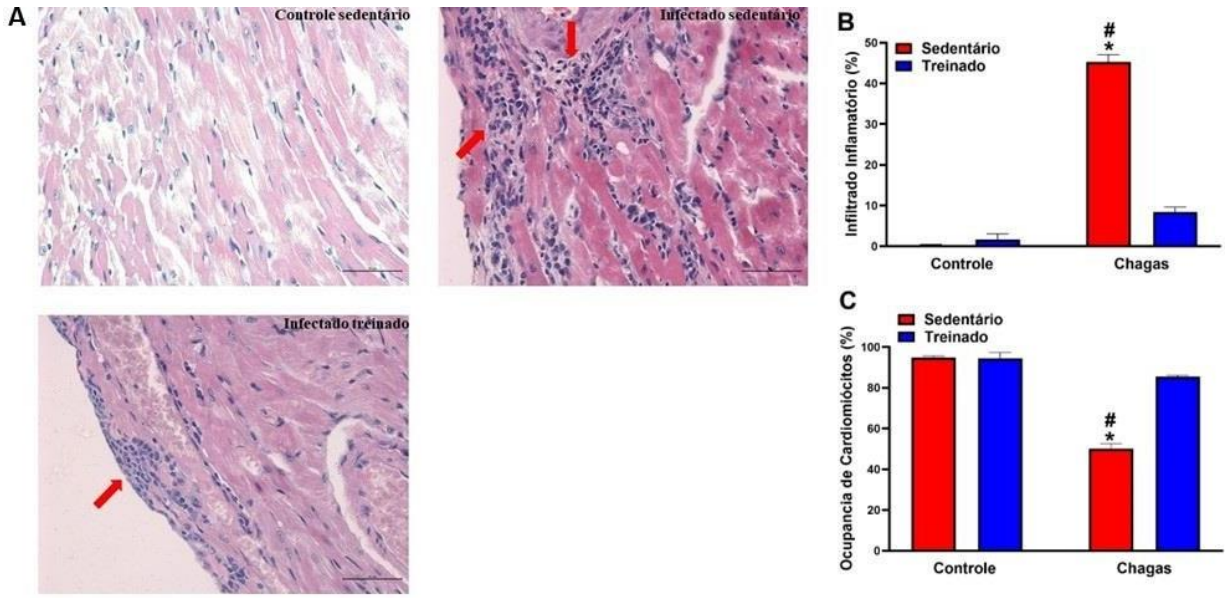

Figura 16**. Efeito do Treinamento físico na histopatologia durante a fase crônica da doença de Chagas:** Os animais infectados apresentam elevado infiltrado inflamatório com perda de cardiomiócitos e o treinamento físico preserva a estrutura tecidual. (A) Exemplos ilustrativos de cortes histopatológicos do coração corados com Hematoxilina-eosina; (B) Infiltrado inflamatório; (C) Ocupância de cardiomiócitos. Grupos controle sedentário (N=7), controle treinado(N=7), Chagas sedentárias(N=7) e Chagas treinado(N=7). * p< 0.05 em comparação com controle sedentário. # p< 0.05 em comparação com Chagas treinado; & p< 0.05 em comparação com controle treinado. ANOVA *two-way* com post-test de Holm-Sidak para comparações múltiplas.

5.5. Efeito do treinamento físico no eletrocardiograma (ECG) durante a fase crônica da doença de Chagas

A Doença de Chagas é uma cardiomiopatia inflamatória e fibrosante que pode levar ao prejuízo de condução do impulso elétrico cardíaco e geração de arritmias cardíacas. Com o intuito de caracterizar os efeitos do treinamento físico nas propriedades elétrica do coração, realizamos as medidas de eletrocardiograma (ECG). Não foram observadas alterações significativas na duração da onda P (Figura 17A) para os respectivos grupos, controle sedentário (28.55 ± 0.96 ms), controle treinado (26.98 ± 0.55 ms), Chagas sedentário (33.15 ±0.96 ms), Chagas treinado (30.96 ± 1.58 ms). Os resultados mostraram que há um aumento significativo no grupo Chagas sedentário na duração do intervalo do intervalo PR (40.29 ± 1.99 ms) (Figura 17B), do intervalo QRS (70,31 ± 4.15 ms) (Figura 17C) e do intervalo QTc (303.46 ± 8.25 ms) (Figura 13C) quando comparado ao grupo controle sedentário, intervalo PR (32.99 ± 1.21 ms), intervalo QRS (39.83 ± 1.10 ms), intervalo QTc (251.94 ± 10.21 ms). O treinamento físico foi capaz de prevenir o aumento na duração do intervalo QRS (40.28 ± 1.87 ms), intervalo QTc (229.40 ± 7.27 ms) nos animais Chagas treinado, ainda que o intervalo PR permaneceu aumentado comparado ao Chagas sedentário, respectivamente (39.56 ± 1.45 ms vs. 40.29 ± 1.87 ms).

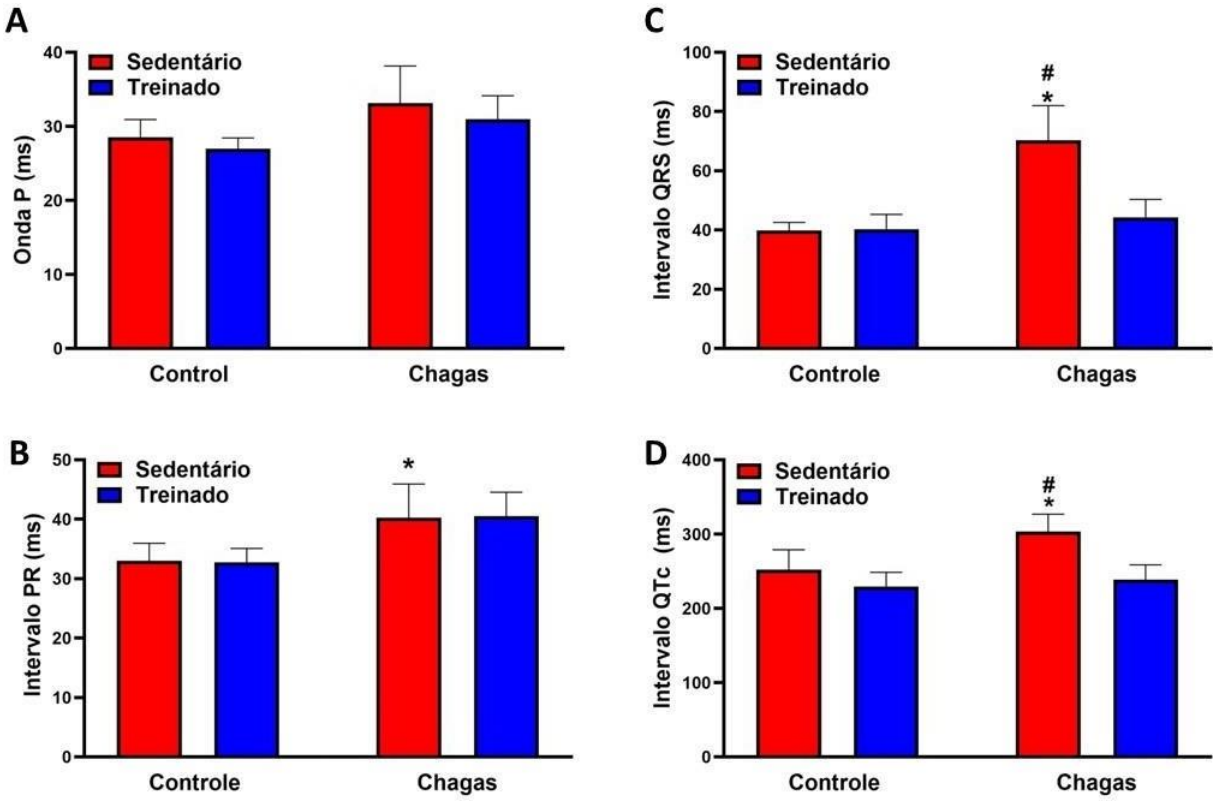

Figura 17. **Efeito do treinamento físico no eletrocardiograma (ECG) durante a fase crônica da doença de Chagas:** A infecção crônica por *Trypanosoma cruzi* está associada ao ECG anormal e o treinamento físico é capaz de reverter este perfil. (A) Complexo QRS; (B) Intervalo PR; (C) Intervalo QTc; (D) Onda P. Grupos controle sedentário (n=6), controle treinado(N=6), Chagas sedentário(N=8) e Chagas treinado(N=5). * $p < 0.05$ em comparação com controle sedentário. # $p < 0.05$ em comparação com Chagas treinado. ANOVA *two-way* com post-test de Holm-Sidak para comparações múltiplas.

5.6 Papel do treinamento físico nas propriedades do PA dos cardiomiócitos durante a fase crônica da Doença de Chagas

Ao analisar o PA em células isoladas do ventrículo esquerdo, observamos que os cardiomiócitos provenientes de animais do grupo Chagas sedentário possuem a fase de repolarização (APR, do inglês, *Action Potential Repolarization*) mais prolongada quando comparados aos animais controle sedentário em todas as frequências analisada, 0.2Hz (184.40±17.48ms vs. 47.25 ±7.02ms a 90% da repolarização), 1 Hz(142,5±27.25ms vs. 31.88±3.34ms a 90% da repolarização) e 2 Hz (100.40±16.14ms vs. 29.56±3.48ms a 90% da repolarização). Apesar de ter uma tendencia de diminuição, o aumento na duração da fase de repolarização não foi revertido pelo treinamento físico nos animais do grupo Chagas treinado, em todas as frequências avaliadas, 0.2Hz (125.4 ±19.83 ms a 90% da repolarização), 1 Hz (79.93±16.14 ms a 90% da repolarização) e 2 Hz (vs. 80.98±17.55 ms a 90% da repolarização). Foi observado nos cardiomiócitos provenientes de animais controle treinado apresentaram prolongamento do PA quando comparados aos animais controle sedentário para todas as frequências 0.2Hz (184.2 ±22.08 ms vs. 47.25 ±7.02ms a 90% da repolarização), 1 Hz (140.8±18.58 vs. 31.88±3.34 ms a 90% da repolarização) e 2 Hz (122.0 ±19.45 ms vs. 29.56±3.48 ms a 90% da repolarização).

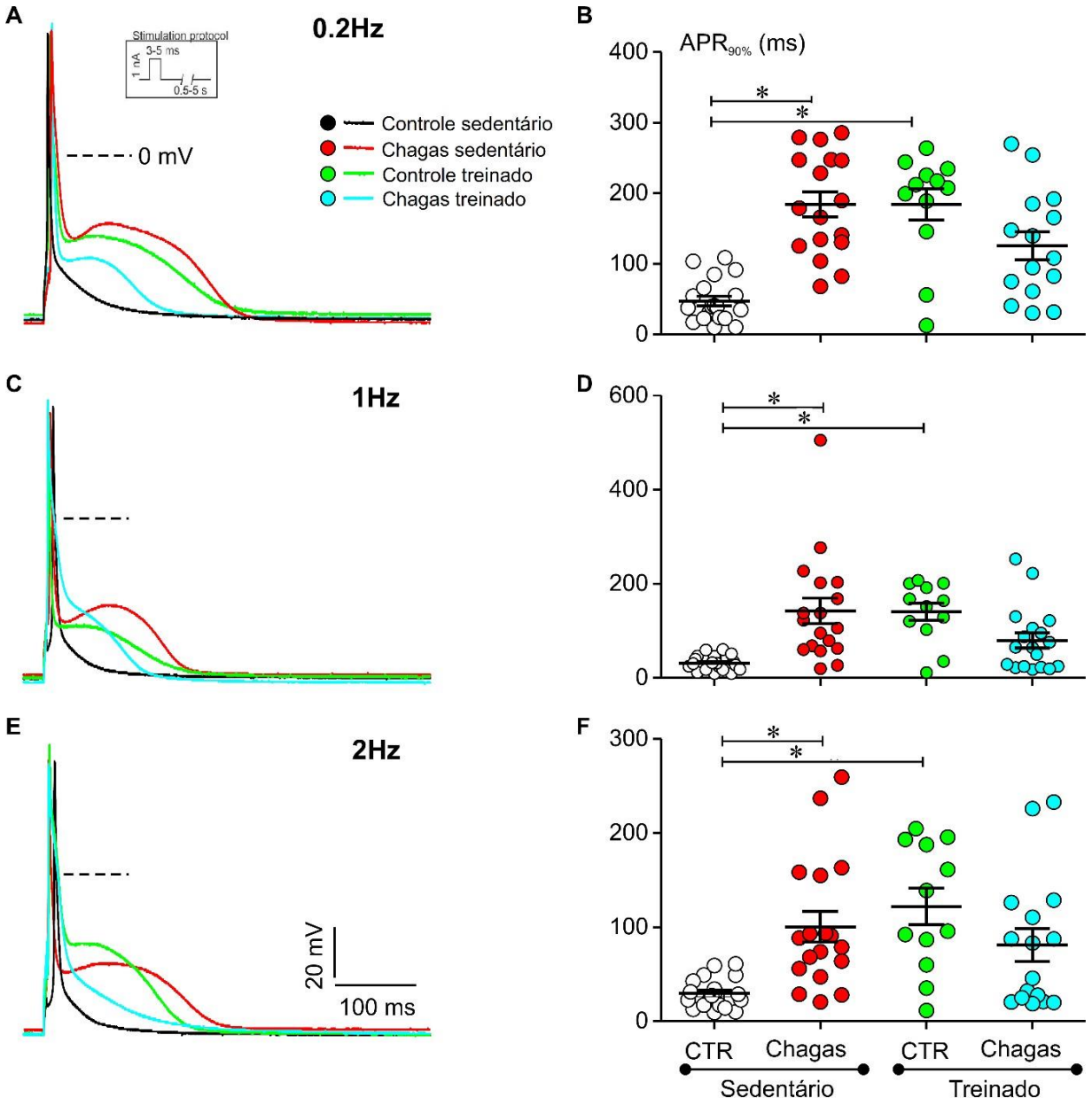

Figura 18**. Efeito do treinamento físico nas propriedades do PA em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas.** O treinamento físico previne os distúrbios na duração do potencial de ação na doença de Chagas. (A, C, E) Traçados representativos dos potenciais de ação (PA) registados a 0,2, 1, e 2 Hz, respectivamente, de todos os grupos experimentais. O protocolo de estimulação é apresentado na inserção em (A). O Plot do tempo necessário para atingir 90% de repolarização completa da membrana (APR90%) para frequências testadas, 0,2 Hz (B), 1 Hz (D), e 2 Hz (F) para todos os grupos**.** *p <0.05 em comparação com o controle sedentário. Controle sedentário 2 Hz (n = 20), 1 Hz (n = 21), 0,2 Hz (n = 19); Chagas sedentário 2 Hz (n = 18), 1 Hz (n = 18), 0,2 Hz (n = 17); controle treinado 2 Hz (n = 12), 1 Hz (n = 12), 0,2 Hz (n = 12); Chagas treinado 2 Hz (n = 16), 1 Hz (n = 18), 0,2 Hz (n

= 15). Os dados foram analisados usando *one-way ANOVA* com post hoc de Tukey para comparações múltiplas.

5.7 Papel do treinamento físico na alternância da duração do PA em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da Doença de Chagas.

Um fator importante na geração e propagação de arritmias cardíacas é a flutuação da duração do PA em torno de sua média, denominado alternância do PA (Bers and Guo 2005). Assim, investigamos o desvio padrão da média do tempo necessário para que ocorra 90% da repolarização, em uma sequência de 10 PAs estáveis. A figura 19B mostra que a média do desvio padrão para os PAs provenientes de animais do grupo Chagas sedentário é significativamente aumentada quando comparada aos animais controle sedentário, independente das frequências avaliadas, 0.2Hz (41.39 ±8.01 ms vs. 8.8±1.51 ms), 1 Hz (14.65 ±4.5 ms vs. 2.37±0.77 ms) e 2 Hz (9.8 ±3.53 ms vs. 1.6±0.38 ms). Esse aumento na variação da duração do PA nos cardiomiócitos dos animais Chagas sedentário foi revertido pelo treinamento físico para todas as frequências no grupo Chagas treinado, 0.2Hz (18.11±4.39 ms), 1 Hz (5.16±1.61 ms) e 2 Hz (2.64±0.84 ms).

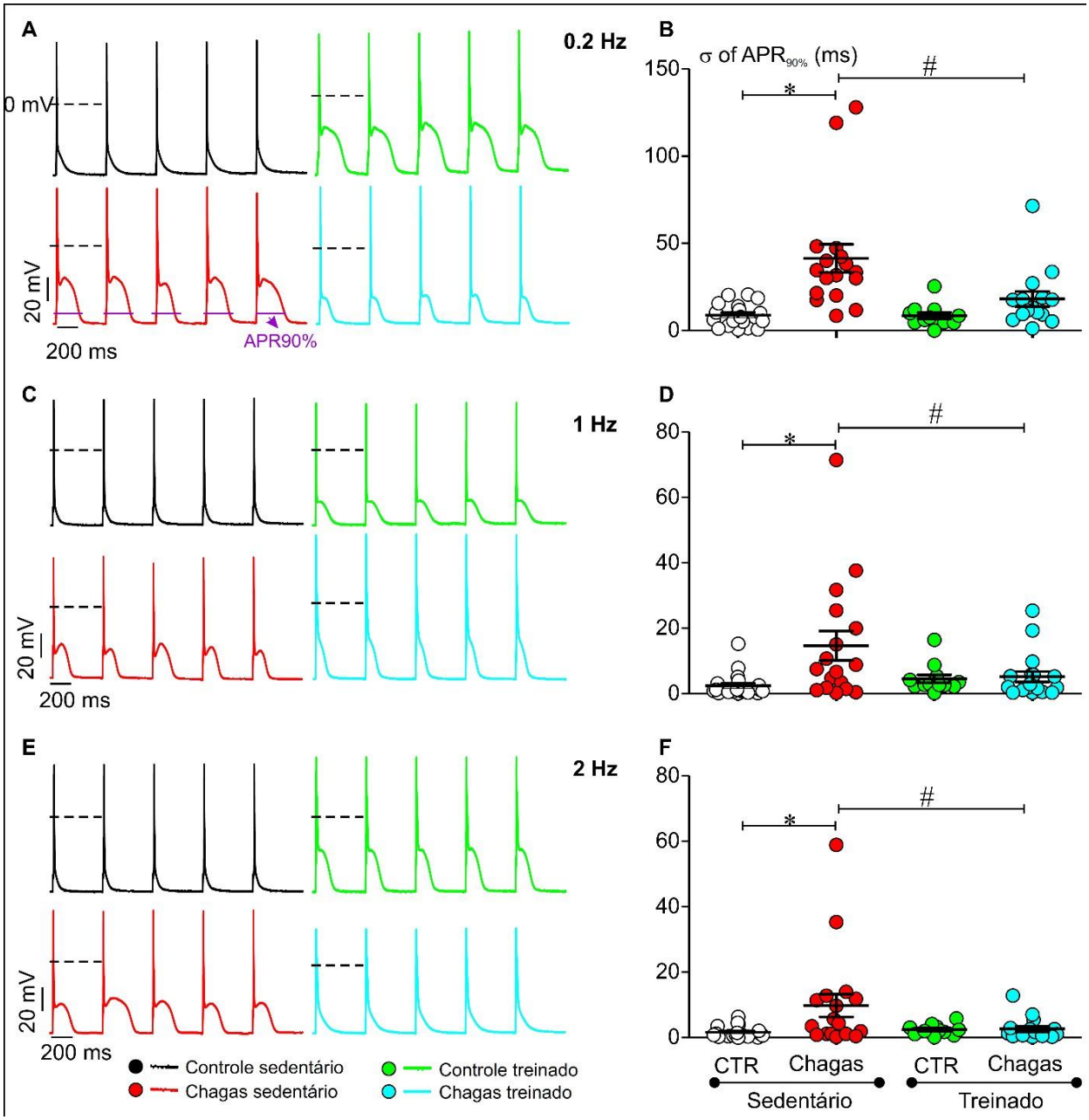

Figura 19. **Papel do treinamento físico na alternância da duração do PA em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da Doença de Chagas**. O treinamento físico previne a alternância de duração do potencial de ação na doença de Chagas. O desvio padrão da média APR90% de 10 pulsos consecutivos foi utilizado para analisar a alternância do PA. (A, C, E) são traços representativos de 5 AP consecutivos registados a 0,2, 1 e 2 Hz, respectivamente, de todos os grupos experimentais. Note-se a elevada dispersão de APR90% no grupo chagásico (traços vermelhos). Os dados resumidos do desvio padrão de APR90% são traçados nas frequências testadas, 0,2 Hz (B), 1 Hz (D), e 2 Hz (F). *p <0.05 em comparação com o controlo. # p < 0.05 em comparação com o grupo Chagas treinado. Controle sedentário 2 Hz (n = 20), 1 Hz (n = 21), 0,2 Hz (n = 19); Chagas sedentário 2 Hz (n = 18), 1 Hz (n = 18), 0,2 Hz (n = 17);

controle treinado 2 Hz (n = 12), 1 Hz (n = 12), 0,2 Hz (n = 12); Chagas treinado 2 Hz (n = 16), 1 Hz (n = 18), 0,2 Hz (n = 15). Os dados foram analisados usando *one-way ANOVA* com post hoc de Tukey para comparações múltiplas

5.8 Papel do treinamento físico na atividade espontânea do PA em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da Doença de Chagas

Realizamos um protocolo que mimetiza pausa após taquicardia, nos cardiomiócitos, para investigar os efeitos do treinamento físico sobre potencial arritmogênico celular que se encontra aumentado no grupo chagásico. Os registros representativos do último PA estimulado, seguidos de pausa (10s), são mostrados na Figura 20A.

O grupo chagas sedentário apresentou vários PA espontâneos, não estimulados, durante a pausa, representado pelas setas vermelhas (figura 20A). Além disso, ~80% dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais do grupo chacha sedentário apresentavam pelo menos um PA espontâneo, que era significativamente mais elevada quando comparada com o controlo sedentário (Figura 20B). Por outro lado, o treinamento físico impediu fortemente o aparecimento destes eventos espontâneos (redução de ~40%) (Figura 19B).

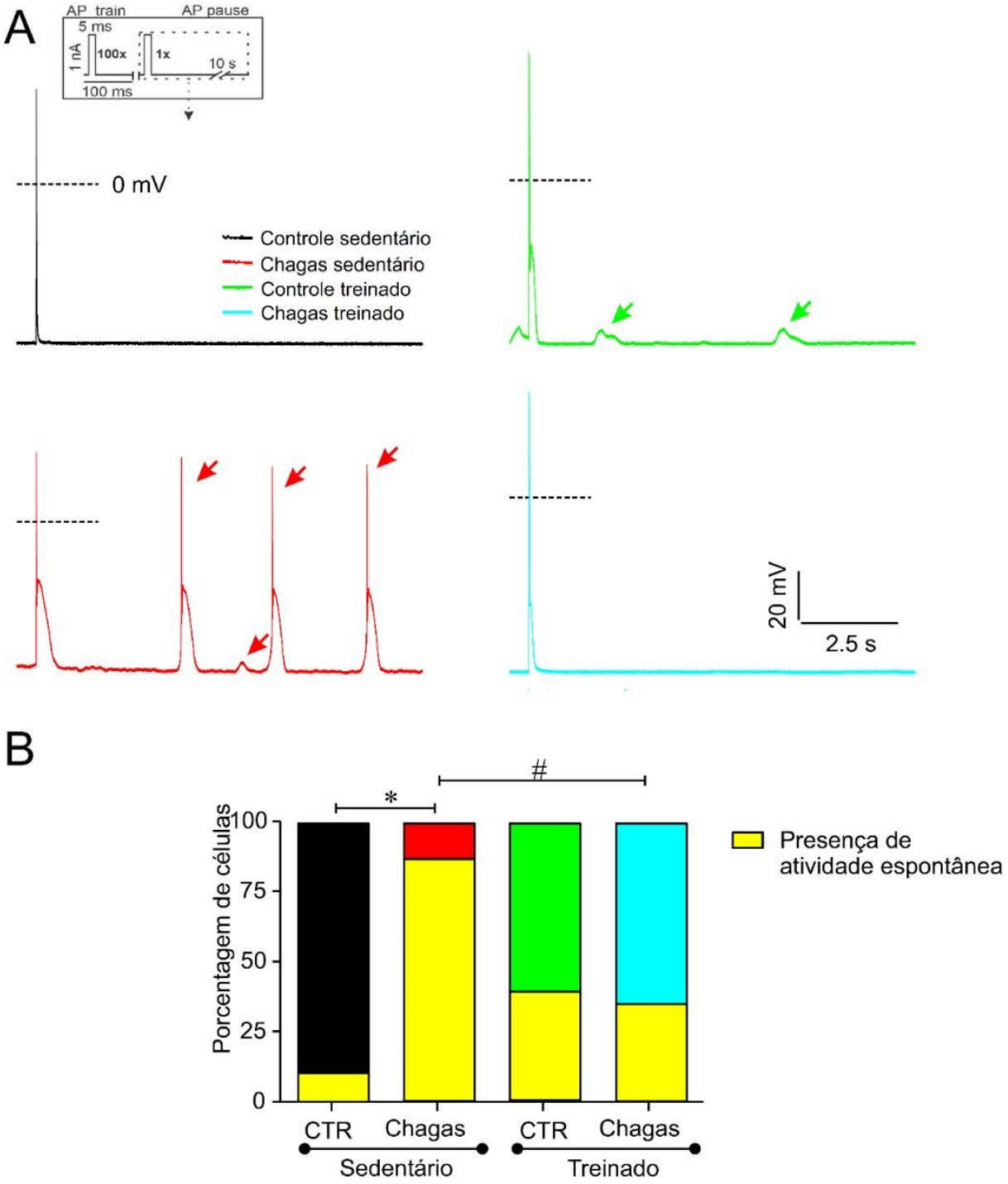

Figura 20. **Papel do treinamento físico na atividade espontânea do PA em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase crônica da doença de Chagas**. O treinamento físico diminui a atividade espontaneamente dos potenciais de ação que são aumentados após a infecção por Trypanosoma *cruzi*. Os PA espontâneos foram monitorados numa longa pausa após uma estimulação de alta frequência (10 Hz) de APs. (A) Registos representativos da longa pausa para todos os grupos, destacando o desencadeamento de APs espontâneos nos animais do grupo Chagas sedentário (seta vermelha). O protocolo de estimulação é apresentado na inserção da

figura. (B) Percentagem de células com APs espontâneas. *p < 0.05 em comparação com controle sedentário. #p < 0.05 em comparação com chagásico treinado. (A, B) controle sedentário (n = 11), Chagas sedentário (n = 11), controle treinado (n = 5), Chagas treinado (n = 6). Os dados foram comparados utilizando o teste exato de Fisher.

5.9 Efeitos do treinamento físico no manejo intracelular de cálcio dos cardiomiócitos durante a fase crônica da Doença de Chagas

O manejo intracelular de cálcio é de extrema importância para o bom funcionamento da função contrátil do coração, uma vez que esse íon participa do acoplamento entre a excitação celular e sua contração (ECC). Dessa forma, considerando as alterações observadas na contratilidade dos cardiomiócitos, agregada ao aumento de eventos pró-arritmicos no PA ventricular nos cardiomiócitos infectados, nós decidimos investigar a influência do treinamento físico no manejo intracelular de cálcio durante a doença de Chagas.

Ao avaliarmos a amplitude do transiente (Figura 21A), observamos que o grupo Chagas sedentário (5.25 ± 0.53) apresenta maior amplitude do transiente de cálcio que o grupo controle sedentário (3.45 ± 0.18). Por outro lado, o exercício físico causou uma redução na amplitude do transiente de cálcio do grupo Chagas treinado (4.25 ± 0.26). Já os animais do grupo controle treinado (4.31 ± 0.16) apresentaram aumento na amplitude do transiente de cálcio quando comparado ao seu respectivo controle (3.45 ± 0.18).

Quando avaliamos o processo de decaimento do transiente de cálcio, que está diretamente ligado com o processo de decaimento da fluorescência relacionado com o transiente de cálcio, podendo ser considerada uma medida indireta do funcionamento da SERCA (Figura 21B), o grupo chagas sedentário apresenta um menor tempo para decaimento do trasiente de cálcio (160.56 ± 4.05) em relação ao ao grupo controle sedentário (193.58 ± 5.30 ms). Também foi observado uma diferença significativa entre o grupo controle treinado (146.71 ± 5.93 ms) quando comparado ao grupo controle sedentário (193.58 ± 5.30 ms).

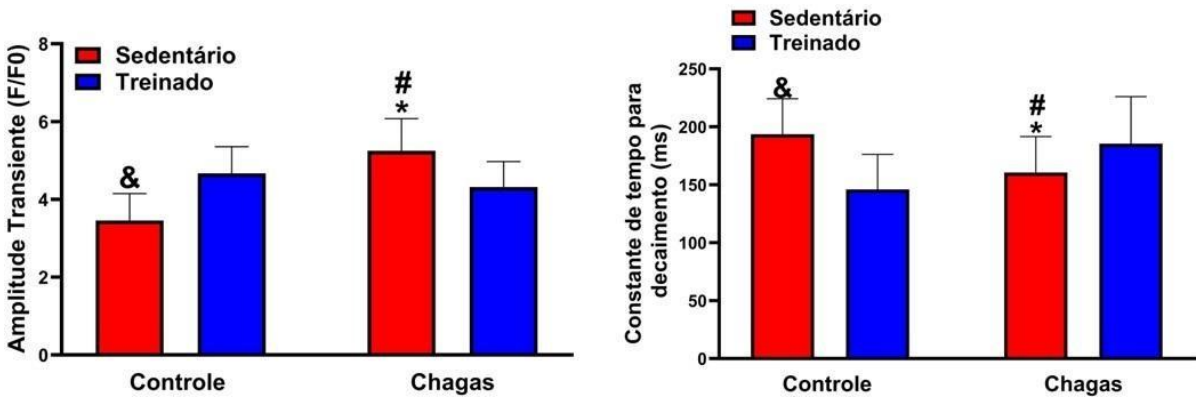

Figura 21**. Efeito do treinamento físico na dinâmica de cálcio dos cardiomiócitos durante a fase crônica da doença de Chagas:** A dinâmica de cálcio é alterada devido à doença de Chagas e o treinamento físico impede essas alterações. (B) Amplitude do transiente; (C) Tempo para 50% do decaimento do transiente de cálcio. Grupos controle sedentário (n=6; células=65), controle treinado (N=6; n=63), Chagas sedentário (N=6; n=60) e Chagas treinado (N=6; n=58). * p< 0.05 em comparação com controle sedentário. # p< 0.05 em comparação com Chagas treinado; & p< 0.05 em comparação com controle treinado. ANOVA *two-way* com post-test de Holm-Sidak para comparações múltiplas.

5.10 Efeitos do exercício físico na contratilidade dos cardiomiócitos durante a fase crônica da doença de Chagas

A Doença de Chagas em humanos tem como uma de suass principais complicações a insuficiência cardíaca, principalmente nos estágios mais avançados da doença, a qual está intimamente relacionada com as propriedades mecânicas do coração e consequentemente dos cardiomiócitos. Nos camundongos, isso se reflete e alterações da contratilidade celular, como é observado em diversos modelos de infeção experimental(Roman-Campos, Campos et al. 2009, Roman-Campos, Sales-Júnior et al. 2013). Ao analisar a contratilidade celular (Figura 21), observamos uma redução no encurtamento celular (Figura 22A) das células dos animais do grupo Chagas sedentário (3.99 ± 0.38 µm) em relação aos controles sedentário (5.87 ± 0.18 µm) e o treinamento físico se mostrou efetivo em prevenir a redução do encurtamento celular no grupo Chagas treinado (6.96 ± 0,34 µm). Além disso, o treinamento físico foi capaz de aumentar o encurtamento nas células dos animais controle treinado (8.34 ± 0.55 µm) em relação ao controle sedentário (5.87 ± 0.18 µm).

Quando consideramos o tempo para atingir 50% pico da contração (Figura 22B), a doença de Chagas causa um aumento no tempo, Chagas sedentário (46.75 ±1.90 ms) quando comparado ao controle sedentário (40.33 ± 1.14 ms). Foi possível constatar que os grupos treinados, Chagas (30.52 ± 1.2 ms) e controle (35.88 ± 0.96 ms) apresentam um menor tempo em comparação com seus respectivos controles, Chagas sedentário (46.75 ±1.90 ms) e controle sedentário (40.33 ± 1.14 ms).

Ao avaliarmos o tempo para 50% do relaxamento (figura 22C) foi possível observar que a doença de Chagas causa um aumento no tempo (179.47 ± 5.01 ms) quando comparado ao controle sedentário (157.67 ± 3.80 ms) e o treinamento físico nos animais chagásicos foi capaz de prevenir o aumento do tempo para relaxamento (150.08 ± 3.30 ms).

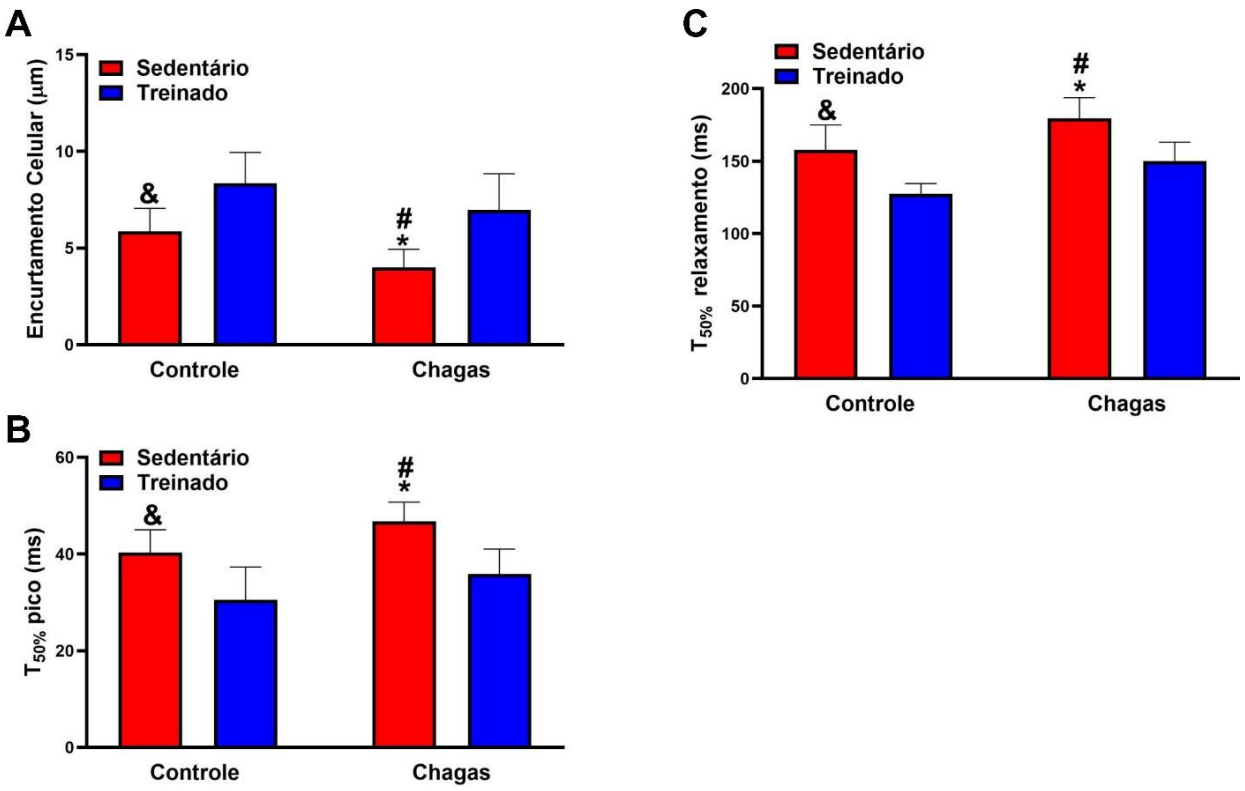

Figura 22. **Efeito do treinamento físico na contratilidade celular dos cardiomiócitos durante a fase crônica da doença de Chagas:** Os parâmetros contráteis sofrem alterações devido à doença de Chagas e o treinamento físico impede essas mudanças. (A) Encurtamento celular; (B) Tempo para 50% do pico de contração celular; (C) Tempo para 50% do relaxamento celular. Grupos controle sedentário (N=6; n=68), controle treinado (N=6; n=82), Chagas sedentário (N=6; n=75) e Chagas treinado (N=6; n= 67). * p< 0.05 em comparação com controle sedentário. # p< 0.05 em comparação com Chagas treinado; & p< 0.05 em comparação com controle treinado. ANOVA *two-way* com post-test de Holm-Sidak para comparações múltiplas.

6. Discussão

No nosso estudo estabelecemos um modelo experimental de infecção crônica por *T. cruzi* que reproduz aspectos clínicos da DC. Em seguida, utilizamos este modelo para avaliar os efeitos do exercício físico na progressão da DC, analisando parâmetros parasitológicos, mortalidade, analise histopatológica cardíaca, bem como os perfis elétrico e contráteis do coração. Modelos experimentais que reproduzem as formas clínicas e os aspectos fisiopatológicos da DC são fundamentais para compreender os mecanismos biológicos e moleculares da doença e testar novas estratégias terapêuticas, como o treinamento físico.

Tem sido demonstrado que o exercício físico de intensidade moderada fornece resistência contra o desenvolvimento de infecções por protozoários em animais (Chao, Strgar et al. 1992, Cunha, Bacurau et al. 2012, Moreira, Santos et al. 2013, Moreira, Zanoni et al. 2014, Novaes, Gonçalves et al. 2017). Esse fato foi corroborado pelo presente estudo, onde demonstramos que o treinamento físico de intensidade moderada realizado pré infecção e mantido pós infecção modificou a evolução da curva de parasitemia, sendo capaz de reduzir drasticamente o pico de parasitemia e a parasitemia total, sendo essa redução acompanhada pela queda expressiva da taxa de mortalidade, demonstrando assim, o papel crucial do treinamento físico no controle parasitário e o impacto da carga parasitária na taxa de mortalidade. Não obstante, outros estudos avaliaram o efeito do treinamento físico na infecção com *T.cruzi*. Schebeleski-Soares e colaboradores (Schebeleski-Soares, Occhi-Soares et al. 2009) demonstrou que o exercício físico aeróbico de moderada intensidade pré-infecção é capaz de melhorar a resposta do organismo à infecção pelo *T. cruzi*, em modelo animal BALB/c fêmeas, infectado com a cepa Y submetidos a 8 semanas de treinamento. Nesse trabalho, o exercício promoveu redução do pico da parasitemia, a perda de peso induzida pela infecção e também aumentando a taxa de sobrevida. Outros estudos também demostraram uma redução no pico da curva de parasitemia e na curva de mortalidade após o treinamento aeróbico de moderada intensidade pré-infecção em camundongos machos da linhagem Swiss(Moreira, Santos et al. 2013, Lucchetti, Zanluqui et al. 2017), em ratos wistar machos (Novaes, Gonçalves et al. 2016) e em camundongos macho/fêmeas da linhagem BALB/C e Swiss infectados com a cepa Y (Moreira, Zanoni et al. 2014). Nesse sentido, o treinamento físico de moderada intensidade vem sendo utilizado como um fator de resistência contra as infecções causadas por protozoários(Chao, Strgar et al. 1992, Terra, Alves et al. 2013, Bortolini, Silva et al. 2016), e particularmente na infecção pelo *T. cruzi* atuando como um potente imunomodulador e promovendo melhora da resposta imune do hospedeiro (Nakamura, Kobayashi et al. 2010, Moreira, Zanoni et al. 2014, Moreira, Zanoni et al. 2014). Existem diversas evidencias dos efeitos imunomoduladores do treinamento físico, incluindo aumento da função leucocitária , pela ativação de neutrófilos e monócitos , bem como ativação e proliferação de linfócitos TCD4 + (auxiliares, tipo Th1) e TCD8+ (citotóxicos). Além disso, aumento da síntese de anticorpos, e da atividade citotóxica de células NK, bem como promover o equilíbrio entre os fenótipos Th1 e Th2, aumentando a eficiência no combate ao parasito. Esses fatores por sua vez atenuam o dano tecidual, diminuindo a mortalidade dos hospedeiros infectados por *T. cruzi* (Nagatomi 2006, Gleeson 2007, Novaes, Gonçalves et al. 2016, Schlagheck, Walzik et al. 2020, Wang, Liu et al. 2020).

Foi demonstrado que em resposta a infecções, o treinamento físico é capaz de estimular e aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IFN-γ, que atuam em conjunto para ativar macrófagos que irão eliminar os parasitos como o *T. cruzi* através da produção NO e ROS (Vespa, Cunha et al. 1994, Soares, Occhi et al. 2010, Machado, Dutra et al. 2012). Essas moléculas possuem papel pivotal no direcionamento para um padrão de resposta imune Th1(Lucchetti, Zanluqui et al. 2017), que são essenciais para promover a imunidade mediada por células contra o *T. cruzi* (Soares, Occhi et al. 2010, Novaes, Gonçalves et al. 2016), de forma que o parasito é continuamente combatido, reduzido sua replicação. De fato, em um recente estudo do nosso grupo de pesquisa utilizando camundongos macho C57BL/6 e camundongos knockout para IFN-$\gamma^{(-/-)}$ infectados com a cepa colombiana demonstram um aumento na parasitemia e a mortalidade em camundongos infectados IFN-$\gamma^{(-/-)}$, demonstrando o papel crucial do IFN-γ no controle da infecção(Roman-Campos, Sales-Junior et al. 2022).

Vale ressaltar que a resposta mediada pelo eixo Th2 com alavancada produção de IL-4, IL-10 e TGF-β agem na diminuição da biossíntese de NO, aumentando assim a suscetibilidade do hospedeiro à infecção (Boscardin, Torrecilhas et al. 2010, de Andrade, de Almeida et al. 2018). Entretanto, sabe-se que a ativação exacerbada do eixo Th1, como ocorre na doença de Chagas é prejudicial ao hospedeiro, acarretando em intenso infiltrado inflamatório, aumento do estresse oxidativo, necrose e fibrose tecidual e dessa forma, torna-se necessário à ativação concomitando do eixo Th2, evitando essa hiperestimulação do eixo Th1 que levaria à progressão da CCC(Bafica, Santiago et al. 2006). Diante do envolvimento de ambos eixos da resposta imune com o combate à infeção e a prevenção do dano tecidual excessivo, é necessário que haja um equilíbrio entre a resposta imune mediada por Th1 e Th2 para que se tenha o combate efetivo ao parasito, mantendo um fino balanço entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, evitando assim a ativação de vias que levariam ao aumento dos danos teciduais. Santos e colaboradores (Santos, Gonçalves et al. 2019) observaram níveis aumentados de IFN - γ e TNF- α e redução nos níveis de MCP-1,bem como aumento nos níveis de IL-4/IL-10 em ratos infectados treinados, os quais apresentaram menor pico de parasitemia. Esses resultados dão suporte aos efeitos protetivos do treinamento físico ao demonstra que há um equilíbrio imunológico melhorado entre as ativações dos eixos imunológicos Th1 e Th2 em animais treinados e assim, uma melhor resposta ao parasito e menor dano tecidual. Em pacientes com CCC os níveis de IL-10 são mais baixos do que naqueles com a forma indeterminada da DC (Keating, Deng et al. 2015), podendo evidenciar o estado pró-inflamatório geral dos pacientes com CCC. Em várias doenças crônicas, incluindo IC , o exercício aumenta as concentrações séricas de IL-10 ao estimular transitoriamente a produção de IL-6 no músculo (Batista Júnior,

Lopes et al. 2009, Ertek and Cicero 2012). Dessa forma, a IL-10 pode, por sua vez, reduzir os níveis de TNF-α na fase crônica da DC, como sugerido por estudos anteriores de exercício crônico(Petersen and Pedersen 2005). Somado a isso, o fato de animais infectados treinados diminuírem as concentrações de MCP-1 ajuda a explicar os efeitos benéficos do treinamento físico, já que MCP-1 é conhecido como um efetor para o processo inflamatório através do recrutamento de leucócitos e macrófagos para o tecido cardíaco infectado. Assim, a melhora no perfil parasitário observado nos nossos resultados nos animais infectados treinados pode estar relacionada com a melhora na resposta imunológica e também, no aumento das defesas enzimáticas antioxidantes no tecido cardíaco dos hospedeiros à infecção por *T. cruzi* (Schebeleski-Soares, Occhi-Soares et al. 2009, Novaes, Gonçalves et al. 2016, Lucchetti, Zanluqui et al. 2017).

Sabe-se que durante a infecção do *T. cruzi*, o equilíbrio entre a resposta imunomediada para controle do parasito e o processo inflamatório prejudicial nos tecidos do hospedeiro provavelmente determina o curso da doença. Se a resposta imunológica é prejudicada e ineficiente, acarreta dano tecidual como consequência tanto pela carga parasitária quanto pelo aumento da inflamação imunomediada. Por outro lado, uma resposta imune bem executada, ajustada, na qual a carga parasitária é reduzida e as consequências inflamatórias são reduzidas ao mínimo, resulta em dano tecidual reduzido(Tarleton 2003, Rassi, Rassi et al. 2010). Visto isto, a melhor resposta imunológica promovida pelo treinamento físico realizado pré infecção e mantido pós infecção no controle parasitológico no nosso modelo experimental foi acompanhada pela redução expressiva do infiltrado inflamatório 60 dias após a infecção, resultando em uma maior integridade do tecido cardíaco, reduzindo a perda de cardiomiócitos caracterizada neste estudo pelo aumento da ocupância de cardiomiócitos. Esse resultado pode ser explicado pelo menor número de parasitos observados em animais treinados. De fato, existe uma relação intima entre a carga parasitária, o parasitismo tecidual, a inflamação e dano tecidual, que são processos acoplados que estão diretamente relacionados ao dano morfofuncional do coração e progressão da cardiomiopatia(Rassi Jr, Rassi et al. 2009, Novaes, Gonçalves et al. 2016, Schlagheck, Walzik et al. 2020). Dessa forma, o controle deste parâmetro desempenha um papel fundamental no tratamento e impacta de forma exponencial a progressão da DC (Veloso, Guedes et al. 2008, Novaes, Gonçalves et al. 2017), já que uma maior parasitemia na infecção por *T. cruzi* está associada a maior patogênese e morbimortalidade (Marinho, D'Império Lima et al. 1999, Lana and Tafuri 2005). Modelos experimentais de CCC leve e grave mostraram que a intensidade da miocardite está associada à gravidade do parasitismo cardíaco e das lesões dos cardiomiócitos (Pereira, Vilar-Pereira et al. 2014) e o controle desses processos é crucial para uma melhor

progressão da DC(Rassi Jr, Rassi et al. 2009, Rassi, Marin et al. 2017). Dessa forma, a menor inflamação observada no nosso modelo se deve possivelmente, a um melhor equilíbrio imunológico em animais treinados, aumentando a regulação das citocinas do eixo Th2/Treg, que atuariam como mediadores anti-inflamatórios para controlar a intensidade do processo inflamatório, regulando e diminuindo o potencial destrutivo de uma resposta Th1 pró-inflamatória exacerbada que acontece na DC. Como discutido anteriormente, balanço de citocinas Th1/Th2 é essencial para o estabelecimento de um processo inflamatório ajustado (Novaes, Gonçalves et al. 2017) , que seja capaz de garantir o controle do parasita sem determinar intenso processo inflamatório, o que pode ajudar a explicar os resultados obtidos no nosso estudo no que cerne a diminuição do dano tecidual apresentados aqui. Dessa forma, no nosso modelo, o treinamento físico foi realizado pré infecção para que os animais adquirissem os benefícios gerados pelo exercício físico na cardioproteção e no sistema imune, no intuito de fortalecer as defesas dos animais contra o *T. cruzi* Visto que o destreinamento é capaz de reverter os benefícios adquiridos, mantivemos o treinamento físico após a infecção, buscando a manutenção dos benefícios do treinamento físico, e os dados até aqui relatados mostram o benefício da prática do exercício físico para o controle da DC. Nossos dados evidenciam o potencial do treinamento como ferramenta na terapia auxiliar da DC, mesmo após a infecção pelo *T. cruzi*.

Não obstante, a inflamação crônica e o estresse oxidativo são características da cardiomiopatia aguda e crônica na doença de Chagas. De fato, as lesões induzidas pelo estresse oxidativo são um achado comum no miocárdio chagásico(Gupta, Wen et al. 2009). Como relatado anteriormente, quando um hospedeiro é infectado pelo *T. cruzi*, há um intenso processo inflamatório que é constituído principalmente por macrófagos e neutrófilos, responsáveis pela produção de ROS através da “explosão oxidativa” e o NO dependente da iNOS, levando ao dano oxidativo, derivado do desbalanço entre a extensão do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante do hospedeiro (Gupta, Wen et al. 2009, Maldonado, Rojas et al. 2021) . De fato, estudos mostram um desbalanço das enzimas antioxidantes que estão reduzidas em modelos animais(Wen, Garg et al. 2004, Wen, Garg et al. 2008, Melo, Caldas et al. 2011), quanto em humanos(Pérez-Fuentes, Guégan et al. 2003, de Oliveira, Pedrosa et al. 2007). Por estes motivos, o uso de antioxidantes exógenos na DC tem sido estudado, acreditando que estas substancias possam intervir positivamente na redução dos efeitos de ROS, prevenindo assim os danos causados pelo estresse oxidativo(Pérez-Fuentes, Torres-Rasgado et al. 2008, Novaes, Sartini et al. 2016, Novaes, Santos et al. 2017, Freitas, Silva Godinho et al. 2020).Neste sentido, foi observado em modelos experimentais que o treinamento físico crônico, baseado em atividades aeróbias moderadas é capaz de potencializar a adaptação do sistema antioxidante, promovendo

aumento da atividade da glutationa peroxidase, superóxido dismutase, glutationa- S -transferase e catalase em animais treinados(Klamt, Dal-Pizzol et al. 2001, Tofas, Draganidis et al. 2020), e dessa forma, pode ser potencialmente benéfico para reduzir o dano tecidual oxidativo e a gravidade da CCC.

Dessa forma, como hipotetizado no nosso modelo, o treinamento físico modularia positivamente o sistema imunológico, o que acarreta em um melhor controle parasitológico, tendo como consequência, uma queda na inflamação. Com a menor carga parasitária cardíaca e associado a um perfil inflamatório cardíaco mais equilibrado entre as respostas Th1 e Th2, podemos esperar uma atenuação no remodelamento patológico do músculo cardíaco, levando a uma necrose celular reduzida, o que sugere, apesar de ainda não mensurado nesses estudos, que também haverá uma menor área fibrótica/de cicatrização no coração dos animais infectados treinados. Corroborando esse racional, outro estudo evidencia que em ratos, o treinamento aeróbico por 9 semanas previamente à infecção por *T. cruzi*, atenua o parasitismo cardíaco e promove a progressão mais branda da DC por diminuir a agregação de colágeno nas estruturas cardíacas (Novaes, Gonçalves et al. 2016).

O VO_2 pico é comumente utilizado na avaliação da capacidade funcional de pacientes com doença de Chagas e é um importante indicador para desfechos clínicos adversos, incluindo mortalidade cardiovascular, hospitalizações e qualidade de vida (Mady, Cardoso et al. 1994, Stelken, Younis et al. 1996). No nosso estudo, corroborando com outros achados em modelos experimentais(Novaes, Penitente et al. 2011, Lucchetti, Zanluqui et al. 2017, Alves, Cardoso et al. 2019) e em estudos clínicos (Oliveira, Pedrosa et al. 2000, Lima, Nunes et al. 2010, de Souza Nogueira Sardinha Mendes, Mediano et al. 2020), podemos observar que a DC leva a uma redução na tolerância ao exercício, com diminuição do VO_2pico e queda na velocidade máxima alcançada no teste de esforço, e o treinamento físico foi capaz de prevenir a perda do desempenho físico nos animais infectados. A redução da tolerância ao exercício em indivíduos com doença de Chagas é multifatorial e está envolvida com alterações patológicas em diversos órgãos e tecidos, como sistema nervoso periférico, músculos esqueléticos e cardíacos. Além disso, estudos anteriores indicaram que anormalidades mecânicas e elétricas atriais e ventriculares podem ter um papel importante na intolerância ao exercício na doença de Chagas.

De maneira importante e condizente com os nossos dados de menor infiltrado inflamatório, a maior ocupância dos cardiomiócitos caracterizando um menor grau de lesão/fibrose do miocárdio, o treinamento físico preveniu o prolongamento do intervalo QRS e QTc, ainda que não foi capaz de reverter o aumento do intervalo PR, o que pode levar a uma redução da chance do desenvolvimento de arritmias e distúrbios de condução, uma vez que lesões

necróticas e fibróticas causadas pela inflamação no miocárdio configuram um importante substrato arritmogênico na DC (Milei, Pesce et al. 1991). O aumento na duração do intervalo PR, reportado neste estudo nos animais chagásicos sedentário pode ser um indicativo de um bloqueio na condução atrioventricular de primeiro grau (BAV1ª), com acometimento do sistema de condução interatriais como o feixe de Bachman e o feixes atrioventriculares (Blackburn, Taylor et al. 1970), sendo uma manifestação típica de arritmia observada em humanos infectados por *T. cruzi*(Prata 2001). Uma das possíveis causas pode ser devido à substituição das células cardíacas nessa região por fibras de colágeno, decorrente da parasitemia e do intenso infiltrado inflamatório, que acaba dificultando e retardando o processo de condução do estimulo por essa área. De fato, o acúmulo excessivo de colágeno no miocárdio aumenta a suscetibilidade a arritmias(Shehadeh and Regan 1995, Porter, Turner et al. 2009). Estudos mostraram que a fibrose prejudica a propagação do impulso elétrico cardíaco, reduzindo o acoplamento elétrico célula a célula, e desempenha um papel importante nas arritmias cardíacas, como fibrilação e taquicardia ventricular (Yue, Xie et al. 2011). Seguindo essa lógica, o mau acoplamento elétrico entre os miócitos pode ser causado pela desestruturação das junções comunicantes (GAP), formadas por conexinas (Severs, Dupont et al. 2006). A perda da comunicação pode ser devido à reestruturação tecidual, que pode gerar a queda da expressão das conexinas ou mesmo a sua translocação para a periferia dos miócitos, que agora faria uma comunicação lateralizada entre os miócitos. De fato, estudos em modelos experimentais e humanos tem demonstrado a redução da expressão, bem como a lateralização das conexinas 40 e 43 (expressas nos átrios) e da conexina 45, expressa no nó AV(Lisewski, Shi et al. 2008, Leybaert, Lampe et al. 2017), e essas mudanças podem levar à redução do acoplamento elétrico célula a célula e retardar a transmissão do impulso através das junções comunicantes, tendo como resultado, o aumentando da duração do intervalo PR aqui observado. Em parte, o aumento da duração do intervalo PR também pode ser explicado por uma diminuição da corrente de Na^+ [I_{Na}] e também e/ou a redução da correntedo canal para cálcio tipo-L (I_{Ca-L}), que resulta em uma diminuição da velocidade de geração do potencial de ação, e assim, e de forma análoga, reduziria a velocidade de condução do PA(Hancox, Yuill et al. 2003, Greener, Tellez et al. 2009, Greener, Monfredi et al. 2011, Roman-Campos, Sales-Junior et al. 2013). Estudos clínicos e experimentais já demonstraram alteraçõesna duração do intervalo PR em modelo murino e em infecção humana da DC (Postan, Bailey et al. 1987, de Carvalho, Tanowitz et al. 1992, Williams-Blangero, Magalhaes et al. 2007, Marcolino, Palhares et al. 2015). Entretanto, é importante ressaltar que de modo geral o prolongamento discreto do intervalo PR como ocorre em BAV de 1° grau não apresenta implicações prognósticas adversas e geralmente são assintomáticos, não necessitando de

tratamento. Por outro lado, quando associado à outras disfunções elétricas, como por exemplo, concomitantes ao aumento da duração do intervalo QRS, podem representar geralmente lesão avançada e difusa do sistema de condução, tendo uma maior probabilidade de evolução para um bloqueio completo AV e pior prognóstico (Edhag and Swahn 1976, Nielsen, Pietersen et al. 2013, Atwater, Emerek et al. 2019). Dessa forma, com a modulação positiva exercida pelo treinamento físico na duração dos intervalos QRS e QTc, retornando os valores da duração a níveis de controle, o aumento na duração do intervalo PR pode não ter um impacto tão expressivo na qualidade de vida do paciente com DC.

Os nossos achados do prolongamento no intervalo QRS e QTc em animais sedentários infectado são condizentes com dados da literatura utilizando modelos experimentais de DC (Strauss, Lo Presti et al. 2013, Daliry, Pereira et al. 2014) e em humanos(Rassi Jr, Rassi et al. 2001, Salles, Xavier et al. 2003). O prolongamento no intervalo QRS pode indicar dano tecidual do sistema de condução intraventricular, e foi demonstrado como um fator para mortalidade em pacientes com DC. Além disso, o aumento do QRS pode indicar bloqueio de ramo, principalmente de feixe direito(Ribeiro, Cavalvanti et al. 2008, Ribeiro, Sabino et al. 2013). Já o aumento na duração do intervalo QTc, retrata as alterações na repolarização ventricular decorrentes da cicatrização do sistema de condução presente no coração desses animais (Ribeiro, Marcolino et al. 2014, Marcolino, Palhares et al. 2015). Nesse sentido, dentre os mecanismos responsáveis pelas arritmias, podemos citar os distúrbios de condução e a automaticidade alterada. Em relação aos distúrbios de condução, podemos ter os bloqueios parciais por condução retardada, como explicado anteriormente (BAV1º), mas também podem acontecer os bloqueios de 2º e 3° grau. Também é possível a ocorrência de fenômenos de reentrada, que é o principal mecanismo eletrofisiológico na geração de arritmias mais severas, como taquiarritmias ventriculares e supraventriculares (Hsia, Marchlinski et al. 2002). Durante a DC, o fenômeno de reentrada é um achado recorrente que contribui para a ocorrência de morte súbita(Sosa and Scanavacca 1994). Para a gênese das arritmias por reentrada é necessário a existência de alguns fatores, como bloqueio unidirecional. Na DC, o bloqueio unidirecional pode ser decorrente do infiltrado inflamatório crônico difuso, levando à degeneração necrótica e fibrose substitutiva que gera alteração na disposição das fibras miocárdicas devido à deposição de colágeno, formação de cicatriz e remodelamento, aumentando as áreas de condução lenta e heterogêneas que podem levar a uma condução unidirecional do estimulo (Rossi 1998, Hsia, Marchlinski et al. 2002). Somado a isso, é necessária uma diminuição na velocidade de condução do PA e por último e não menos importante, um circuito fechado. De fato, os animais infectados sedentários apresentado neste estudo cumpre todos os requisitos para a geração de arritmias por fenômenos

de reentrada, já que esses animais apresentam intenso processo inflamatório bem como o prolongamento efetivo do PA com concomitante condução retardada.

A nível celular, observamos que os animais chagásicos sedentário apresentam um perfil arritmogênico, com PA prolongados, e caracterizado pela clara alternância na duração do PA. Essas evidências estão em concordância com o prolongamento do intervalo QT observado. A alternância da repolarização do PA desempenha um papel importante na geração de substrato pró-arrítmico (Kanaporis and Blatter 2015, Němec, Kim et al. 2016, Kanaporis and Blatter 2017), e essa propensão à geração de arritmias a nível celular guarda correlação com à dinâmica alterada de cálcio. De fato, observamos alteração do manejo de Ca^{2+} em nosso modelo. Nos animais chagásicos sedentários, observamos maior amplitude do transiente de cálcio. Somado a isso, um recente estudo do nosso grupo utilizando o mesmo modelo, demonstrou também um aumento da concentração diastólica de cálcio e aumento na amplitude do transiente(Santos-Miranda, Costa et al. 2021), fortalecendo a ideia da dinâmica de cálcio prejudicada nos animais chagásicos sedentários. Vale destacar que esse aumento no transiente de cálcio não é observado em fase mais tardias da doença, onde se observa uma redução 200 dias após a infecção(López, Espinosa et al. 2011, Roman-Campos, Sales-Júnior et al. 2013, Mijares, Espinosa et al. 2020), porem, como em outras doenças como IC, esse aumento inicial pode levar à sobrecarga de cálcio. A dinâmica de cálcio alterada observada na fase inicial crônica aqui relatada pode favorecer o vazamento diastólico de cálcio do SR, propiciando o surgimento de eventos de pós-despolarização tardio (DAD). Além disso, o PA prolongado pode ainda favorecer o surgimento de pós-despolarizações precoces (EADs) pela reativação dos canais de Ca^{2+} (Němec, Kim et al. 2016). No presente estudo, associado à dinâmica de cálcio alterada, observamos o aumento expressivo na geração de PAs espontâneos nos animais sedentários infectado em comparação com os controles. Em confluência com nossos achados, nosso grupo relatou resultado similares no mesmo modelo de infecção(Santos-Miranda, Costa et al. 2021), tendo como explicação para esses eventos, além da alteração na dinâmica de cálcio, o aumento das correntes de membrana ativadas por Ca^{2+} (ITI do inglês transient inward current). Essas correntes parecem exercer um papel relevante na arritmogênese cardíaca, uma vez que, somadas, levam a geração de uma corrente transitória de entrada que pode resultar em um vetor de despolarização na fase diastólica que serviria como mecanismo para desencadear o aparecimento das DADs. Esses eventos, ao atingirem o potencial limiar, irão deflagrar um PA espontâneo, que dão origem às extrassístoles. Diversos mecanismos poderiam explicar as alterações na dinâmica de Ca^{2+} observadas.

No presente trabalho demonstramos que a infecção experimental crônica promove aumento

do transiente de cálcio, mas com menor contratilidade celular, em concordância com estudos anteriores do nosso grupo (Roman-Campos, Duarte et al. 2009, Roman-Campos, Sales-Júnior et al. 2013, Santos-Miranda, Joviano-Santos et al. 2020, Santos-Miranda, Costa et al. 2021) e em humanos (Lopez, Espinosa et al. 2011). Esse aumento pode ser explicado, em partes, através de um aumento da carga de Ca^{+2} do RS, o que poderia configurar um mecanismo compensatório em vista da diminuição do perfil contrátil celular, já que a quantidade de Ca^{2+} liberada do RS , somada à sensibilidade dos miofilamentos ao Ca2+ determina a extensão (encurtamento fracionário) e a força da contração (Bers 2002). Nossos dados são condizentes com outro estudo do nosso grupo, utilizando a mesma cepa do *T.cruzi*, porém em um modelo animal diferente(Roman-Campos, Sales-Junior et al. 2013). Nesse estudo também foi observado em animais infectados, redução nos níveis de SERCA-2A, porém foi uma menor expressão de fosfolambam, sugerindo uma menor inibição da SERCA-2, o que aumentaria a recaptação de cálcio. Além disso, um outro possível mecanismo para o aumento na velocidade de recaptação observada nos animais sedentários seria a hiperfosforilação da fosfolambam pela CAMKII no resíduo treonina 17 (Bartholomeu, Vanzelli et al. 2008), removendo a inibição sobre a SERCA-2. Nossos resultados estão alinhados com essas observações, e animais infectados sedentários apresentam um decaimento acelerado do transiente. Além disso, observamos que o AP é prolongado nos animais infectados e sedentários, o que poderia favorecer a entrada de Ca^{2+} via $I_{Ca\text{-}L}$, que em conjunto com uma maior recaptação pela SERCA, poderia induzir aumento da carga de Ca^{2+} do SR. Juntos, a diminuição dos níveis de PLN e o aumento da duração do AP podem explicar a maior amplitude transitória de Ca^{2+} encontrada nessas células. Entretanto, o aumento do transiente poderia ser explicado independente da carga de Ca^{2+} do SR, por exemplo pela alteração da probabilidade de abertura dos RyR, bem como sua condutância, que pode ser aumentada por fosforilação, oxidação direta e nitrilação(Lanner, Georgiou et al. 2010, Nikolaienko, Bovo et al. 2018, Huang, Lei et al. 2021). O mecanismo molecular determinante do aumento do transiente não foi explorado em profundidade no presente trabalho, e outros estudos são necessários para sua elucidação.

As alterações histopatológicas e a dinâmica de cálcio alterada parecem se correlacionar à gênese das arritmias na DC experimental através da hiperativação da CAMKII (Santos-Miranda, Costa et al. 2021), que de fato, tem sido associada à arritmias e insuficiência cardíaca(Hoch, Meyer et al. 1999, Wu, Temple et al. 2002, Bers 2008, Cuello and Lorenz 2016). A CAMKII pode fosforilar a RyR no resíduo serina 2814, aumenta a probabilidade de abertura e com isso, podendo ocasionar o vazamento de cálcio na diástole, que podem gerar DADs. E de fato, mostramos um aumento na expressão da CAMKII fosforilada e oxidada nos animais chagásicos (Santos-Miranda, Costa et al. 2021), um forte indicador da hiperativação desta via. Esses

resultados estão de acordo com evidências de que a ativação de CAMKII é dependente de Ca^{2+} e também do estresse oxidativo celular (Erickson and Anderson 2008, Sommese, Valverde et al. 2016). É importante ressaltar que a DC é caracterizada por um ambiente celular e tecidual marcado por elevado estresse oxidativo, como demonstrado por nosso grupo e por outros (Gupta, Wen et al. 2009, Roman-Campos, Duarte et al. 2009, Roman-Campos, Sales-Júnior et al. 2013, Wan and Garg 2021). Além disso, e também o aumento da $[Ca^{2+}]i$ observado em nosso trabalho atual e anteriores(Santos-Miranda, Joviano-Santos et al. 2020, Santos-Miranda, Costa et al. 2021) promovendo condições adequadas para hiperativação de CAMKII e favorecendo o aparecimento das DADs. Condizente com esses achados, no nosso trabalho anterior (Santos-Miranda, Costa etal. 2021), foi demonstrado pela primeira vez que, que a atenuação da CaMKII restaurou a maior parte das propriedades elétricas dos miócitos cardíacos, com redução na duração do PA e diminuição nas alternâncias na duração dos PA dos animais chagásicos, bem como a reduçãona concentração diastólica de Ca^{2+}. Também observamos a redução de ITi, que se correlaciona muito bem com a prevenção de AP espontâneo nos animais chagásicos após inibição daCaMKII.

A sobrecarga de cálcio está diretamente relacionada com a gênese das arritmias, como explicitado anteriormente. Mais recentemente, tornou-se claro que a sobrecarga de Ca^{2+} celular pode causar citotoxicidade e desencadear morte celular por apoptose e necrose através da ativação de caspases, podendo dessa forma intensificar o dano tecidual levando à morte celular e formação de cicatriz(Schanne, Kane et al. 1979). Como por exemplo, a sobrecarga de cálcio ativa a calpaína no miocárdio, que tem sido ligada à morte de miócitos cardíacos. Através da ativação da calpaína, o Ca^{2+} pode promover apoptose via ativação proteolítica da caspase-12, uma caspase ligada à membrana do retículo endoplástico que promove apoptose pela ativação da caspase-3. Trabalhos tem demonstrado que o treinamento físico atenuou a ativação de calpaína, resultando em cardioproteção semelhante à observada em corações que receberam um inibidor farmacológico de calpaína (French, Quindry et al. 2006, French, Hamilton et al. 2008). A sobrecarga de cálcio também pode ativar vias pró-apoptóticas mediada pelas mitocôndrias. A sobrecarga de cálcio mitocondrial induz aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais interna a uma série de compostos pró-apoptótico, incluindo o citocromo *c*. Este, quando ligado à proteína citosólica apafl, resultando na ativação da caspase-9, que por sua vez facilita a ativação da caspa-3 que irá mediar a apoptose celular (Zamzami and Kroemer 2001, Weiss, Korge et al. 2003). Como observado no nosso modelo, a DC causa uma sobrecarga de cálcio, que como visto aqui, podem piorar a função contrátil e o remodelamento cardíaco, podendo agravar a progressão da doença (Baines and Molkentin 2005). Dessa forma, regular a

homeostase de cálcio e prevenir a sobrecarga pode configurar uma importante estratégia para evitar os danos cardíacos consequentes. Como observado no nosso estudo, o treinamento físico é capaz de proteger o tecido cardíaco contra os danos provocados na DC. Fica evidente em nosso estudo que o exercício físico, promove melhora do perfil inflamatório/oxidativo cardíaco, mas também previne as alterações na dinâmica de Ca^{2+} observadas nos animais sedentários e chagásicos. Entendemos que a restituição da dinâmica de cálcio é um importante mecanismo que leva à preservação da estrutura e função tecido cardíaco induzida pelo exercício aeróbico moderado.

Seguindo a linha de pensamento, o treinamento físico é capaz de prevenir o aparecimento e atenuar a severidade de arritmias em doenças cardiovasculares (Høydal, Stølen et al. 2016, Manotheepan, Danielsen et al. 2016, Qin, Murakoshi et al. 2019), pela regulação da atividade da CAMKII. Em um modelo de cardiomiopatia diabética, os efeitos do treinamento físico foram muito semelhantes aos nossos achados, com redução do vazamento de Ca^{2+} do RS e diminuição dos eventos arrítmicos(Stolen, Hoydal et al. 2009). Assim, a inibição da hiperfosforilação dependente de CaMKII e da oxidação da RyR2 pelo treinamento físico crônico pode ser um mecanismo chave subjacente à supressão de arritmias. Uma outra hipótese levantada seria os efeitos benéficos do treinamento físico na regulação autonômica cardíaca, de modo que a atividade parassimpática é aumentada enquanto a atividade simpática é reduzida, evitando os efeitos deletérios da hiperestimulação simpática através da ativação da via da PKA, já conhecida como promotora da disfunção elétrica e contrátil na IC e que poderia estar ativada nessa fase inicial crônica da DC, também como um mecanismo crônico. E de fato, em modelos de IC, o treinamento físico é benéfico em reduzir os efeitos deletérios da hiperativação simpática, bem como restaurar a disfunção contrátil (Medeiros, Rolim et al. 2008, Bueno, Ferreira et al. 2010, Brum, Bacurau et al. 2011).

Diante do conjunto de evidências discutidos acima e apresentados nesse trabalho, sugerimos papel do exercício em normalizar a atividade das proteínas PKA e CAMKII, como demonstrado em alguns estudos(Stølen, Høydal et al. 2009, Høydal, Stølen et al. 2016), e com isso, restaurar os níveis anormais de fosforilação da RyR e PLB. Shao e colaboradores(Shao, Wehrens et al. 2009) avaliaram o efeito do treinamento físico em animais diabéticos no funcionamento do RyR nos cardiomiócitos de ratos. Os autores observaram que a frequência das *sparks* espontâneas de Ca^{2+} aumentou três vezes e a liberação de Ca^{2+} durante a sístole foi dessincronizada com a liberação de Ca^{2+} durante a diástole nos animais diabéticos sedentários, sendo esses mecanismos atribuídos a uma desbalanço entra as vias PKA e CAMKII. Os autores encontraram aumentos nos níveis de fosforilação da RyR em Ser2814 induzido pelo diabetes, bem como relataram uma redução na atividade da PKA e um aumento de 50% na atividade da

CaMKII. Os autores ainda relatam que o exercício físico normalizou a resposta do RyR2 ao Ca2+, atenuou o aumento da fosforilação dos RyRs ao nível de Ser2814, bem como regulou a atividade de PKA e CaMKII, mostrando uma regulação nas vias que antes estavam desbalanceadas. Esses dados são consistentes também com modelos de IC, que também associam as alterações na homeostase de cálcio ao aumento da ativação da CAMKII e perda de responsividade da via PKA. Nesses estudos, o treinamento físico atua na regulação do eixo da CAMKII e restaura a responsividade beta-adrenérgica e com isso, inibe, pelo menos em partes, os efeitos deletérios no coração(Ai, Curran et al. 2005, Curran, Hinton et al. 2007, Stølen, Høydal et al. 2009).

Curiosamente, os animais chagásicos sedentário apresentam um maior transiente de cálcio, porem uma menor resposta contrátil. Dados do nosso grupo e de outros suportam a evidência de uma possível influência negativa do estresse oxidativo na contratilidade dos cardiomiócitos (Roman-Campos, Duarte et al. 2009, Novaes, Penitente et al. 2011, Novaes, Penitente et al. 2013). Esses estudos revelaram pela que a infecção pelo *T. cruzi* altera as propriedades mecânicas intrínsecas dos cardiomiócitos, reduzindo o perfil contrátil celular. Uma possível consequência da inflamação crônica no coração durante a DC é a remodelação e dano a diferentes proteínas pertencentes à maquinaria contrátil. De fato, a infecção experimental por *T. cruzi* em roedores induziu fragmentação e desorganização das linhas Z, bandas I e A e perda de elementos miofibrilares(Taniwaki, Andreoli et al. 2005). Nesta circunstância, a afinidade de ligação da troponina com o cálcio pode estar reduzida com consequente diminuição na contratilidade miocárdica.

Podemos também hipotetizar, visto que a contratilidade dos cardiomiócitos são dependentes da expressão da miosina de cadeia pesada rápida (α - MHC), que apresenta maior atividade ATPásica e maior velocidade de encurtamento dos sarcômeros e a miosina de cadeia pesada lenta (β- MHC), apresentando menor velocidade de encurtamento e atividade ATPásica (Swynghedauw 1986). Nesse sentido, como ocorre em algumas doenças cardiovasculares como IC e hipertensão arterial (Alpert and Gordon 1962, Palmer 2005, Carneiro-Júnior, Quintão-Júnior et al. 2013), a DC pode causar uma diminuição da razão α/β-MCP, aumentando a β-MCP e dessa forma, condizente com nossos dados de piora nos parâmetros contráteis celular nos animais chagásicos sedentário. O treinamento físico tem se mostrado capaz de reverter a má adaptação em relação à distribuição das miofibrilas (Bernardo, Weeks et al. 2010, Fernandes, Soci et al. 2011, Fernandes, Baraúna et al. 2015), restaurando a ração α/β-MCP, o que também se relaciona com nossos dados de melhora nos parâmetros contráteis dos animais chagásico sedentário. Somado a isso, está bem relatado que o treinamento físico promove benefícios no miocárdio como aumento de contratilidade cardíaca devido à melhora do remodelamento,metebolismo de

cálcio, aumento do tamanho celular ou prevenção da atrofia, redução de apoptose e do estresse oxidativo (de Cássia Cypriano Ervati Pinter, Padilha et al. 2008, Alves, Nunes et al. 2014, Fernandes, Faria et al. 2015, Gimenes, Gimenes et al. 2015). Nesse sentido a via da proteína quinase B (Akt/PKB), uma serina-treonina quinase tem sido estudada como uma das principais vias cardioprotetoras relacionadas ao treinamento físico que promove aumento da função cardíaca devido ao aumento do tamanho do cardiomiócito, prevenção da atrofia e redução da apoptose (Melo, Barauna et al. 2017, Weeks, Bernardo et al. 2017). A via IGF-1/PI3K-Akt/mTOR/$P70^{s6k}$ é uma das principais vias cardioprotetoras relacionadas ao treinamento físico ativando a tradução e síntese proteica, bem como tem uma ação inibitória sobre o fator de transcrição forkhead box o (FOXO) diminui a expressão que estão envolvidas no catabolismo (atrogin-1 e Murf1)(Weeks, Bernardo et al. 2017). Dessa forma, poderíamos também supor que no nosso modelo de DC, o exercício físico seria benéfico causando inibição da morte celular e promovendo crescimento do cardiomiócito(Kapustian, Kroupskaya et al. 2014), mantendo assim a função contrátil e a homeostase de cálcio observada nos animais treinado chagásico.

7. Conclusão

A maioria dos estudos publicados até o momento avaliou o efeito do treinamento físico realizado de forma preventiva ou concomitante com o esquema de quimioterapia antiparasitária nos pacientes e em modelos experimentais. Ao realizarmos o treinamento de forma preventiva e continuada, mantendo assim os seus benefícios, observamos uma melhora significativa do da DC experimental. Concluímos que essa melhora está refletida pela prevenção dos danos ao tecido cardíaco, controlando a parasitemia promovendo menor morte celular e processos fibróticos. Observamos a redução do perfil arrítmico, que está diretamente associada à melhora da condução, restauração da dinâmica de cálcio, evitando a sobrecarga e com isso diminuindo a alternância dos PAs, e das DADs. A melhora na homeostase de cálcio se refletiu na melhora dos parâmetros contráteis. Dessa forma, o treinamento físico pode ser uma estratégia benéfica para prevenir os efeitos deletérios da infecção crônica. Dessa forma, esse trabalho provê novas perspectivas no desenvolvimento de abordagens mais específicas e precisas para o tratamento e/ou melhora na saúde dos pacientes acometidos pela Doença de Chagas.

8. Referências Bibliográficas:

Ai, X., J. W. Curran, T. R. Shannon, D. M. Bers and S. M. J. C. r. Pogwizd (2005). "Ca2+/calmodulin– dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmicreticulum Ca2+ leak in heart failure." **97**(12): 1314-1322.

Alpert, N. R. and M. S. Gordon (1962). "Myofibrillar adenosine triphosphatase activity in congestiveheart failure." Am J Physiol **202**: 940-946.

Alves, J. P., R. B. Nunes, G. P. Stefani and P. Dal Lago (2014). "Resistance training improves hemodynamic function, collagen deposition and inflammatory profiles: experimental model of heartfailure." PLoS One **9**(10): e110317.

Alves, R. L., B. R. L. Cardoso, I. P. R. Ramos, B. da Silva Oliveira, M. L. Dos Santos, A. S. de Miranda, T. C. S. de Almeida, M. A. R. Vieira, F. S. Machado and A. J. J. L. s. Ferreira (2019). "Physical training improves exercise tolerance, cardiac function and promotes changes in neurotrophins levels inchagasic mice." **232**: 116629.

Alves, R. L., B. R. L. Cardoso, I. P. R. Ramos, B. d. S. Oliveira, M. L. dos Santos, A. S. de Miranda, T. C. S. de Almeida, M. A. R. Vieira, F. S. Machado, A. J. Ferreira and G. F. de Avelar (2019). "Physical training improves exercise tolerance, cardiac function and promotes changes in neurotrophins levels in chagasic mice." Life Sciences **232**: 116629.

Andrade, J. P. d., J. A. Marin Neto, A. A. V. d. Paola, F. Vilas-Boas, G. M. M. Oliveira, F. Bacal, E. A. Bocchi, D. R. Almeida, A. A. Fragata Filho and M. d. C. V. J. A. b. d. c. Moreira (2011). "I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary." **96**(6): 434-442.

Andrade, V., M. Barral-Netto, S. G. J. B. j. o. m. Andrade and b. r. R. b. d. p. m. e. biologicas (1985). "Patterns of resistance of inbred mice to Trypanosoma cruzi are determined by parasite strain." **18**(4):499-506.

Andrade, V., C. Brodskyn, S. G. J. T. o. t. R. S. o. T. M. Andrade and Hygiene (1983). "Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of Trypanosoma cruzi."**77**(6): 796-799.

Anez, N., H. Carrasco, H. Parada, G. Crisante, A. Rojas, C. Fuenmayor, N. Gonzalez, G. Percoco, R. Borges, P. J. T. A. j. o. t. m. Guevara and hygiene (1999). "Myocardial parasite persistence in chronicchagasic patients." **60**(5): 726-732.

Atwater, B. D., K. Emerek, P. L. Sørensen, S. M. Hansen, Z. Loring, C. Graff, C. Polcwiartek, J. Kisslo, P. Søgaard and D. J. Friedman (2019). "PR Prolongation predicts inadequate resynchronization with biventricular pacing in left bundle branch block." Pacing and clinical electrophysiology : PACE **42**(11):1477-1485.

Báez, A. L., M. N. Reynoso, M. S. L. Presti, P. C. Bazán, M. Strauss, N. Miler, P. Pons, H. W. Rivarola, P. J. E. Paglini-Oliva and m. pathology (2015). "Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle duringexperimental Chagas disease." **98**(3): 467-475.

Bafica, A., H. C. Santiago, R. Goldszmid, C. Ropert, R. T. Gazzinelli and A. J. T. J. o. I. Sher (2006). "Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemiain Trypanosoma cruzi infection." **177**(6): 3515-3519.

Baines, C. P. and J. D. Molkentin (2005). "STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyteapoptosis." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **38**(1): 47-62.

Bartholomeu, J. B., A. S. Vanzelli, N. P. L. Rolim, J. C. B. Ferreira, L. R. G. Bechara, L. Y. Tanaka, K. T. Rosa, M. M. Alves, A. Medeiros, K. C. Mattos, M. A. Coelho, M. C. Irigoyen, E. M. Krieger, J. E. Krieger, C. E. Negrão, P. R. Ramires, S. Guatimosim and P. C. Brum (2008). "Intracellular mechanisms of specific β-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure." Journal of Molecular and Cellular Cardiology **45**(2): 240-249.

Bass, J. and J. S. Takahashi (2010). "Circadian integration of metabolism and energetics." Science **330**(6009): 1349-1354.

Bassel-Duby, R. and E. Olson (2013). Biochemistry of Development: Striated Muscle. Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition, Elsevier Inc.**:** 179-186.

Batista Júnior, M. L., R. D. Lopes, M. C. L. Seelaender and A. C. J. A. b. d. c. Lopes (2009). "Anti- inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-α and IL-10." **93**: 692-700. Benvenuti, L., A. Roggério, H. Freitas, A. Mansur, A. Fiorelli, M. J. A. o. T. M. Higuchi and Parasitology (2008). "Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis." **102**(6): 481-487.

Bern, C., S. Kjos, M. J. Yabsley and S. P. J. C. m. r. Montgomery (2011). "Trypanosoma cruzi and Chagas'disease in the United States." **24**(4): 655-681.

Bernardo, B. C., K. L. Weeks, L. Pretorius and J. R. McMullen (2010). "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies."Pharmacol Ther **128**(1): 191-227.

Bers, D. (2001). Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force, Springer Science &Business Media.

Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.

Bers, D. M. (2008). "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes." Annu Rev Physiol **70**: 23-49. Bers, D. M. and T. J. A. o. t. N. Y. A. o. S. Guo (2005). "Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes." **1047**(1): 86-98.

Bers, D. M. J. A. r. o. p. (2008). "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes." **70**(1): 23-49. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. J. N. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 andregulatory T cells." **441**(7090): 235-238.

Betts, T. R., P. R. Roberts, S. Y. Ho and J. M. Morgan (2003). "High density endocardial mapping of shifts in the site of earliest depolarization during sinus rhythm and sinus tachycardia." Pacing Clin Electrophysiol **26**(4 Pt 1): 874-882.

Blackburn, H., H. L. Taylor and A. Keys (1970). "Coronary heart disease in seven countries. XVI. The electrocardiogram in prediction of five-year coronary heart disease incidence among men aged fortythrough fifty-nine." Circulation **41**(4 Suppl): I154-161.

Blackwell, D. J., J. Schmeckpeper and B. C. Knollmann (2022). "Animal Models to Study Cardiac Arrhythmias." Circ Res **130**(12): 1926-1964.

Boineau, J. P., R. B. Schuessler, C. R. Mooney, A. C. Wylds, C. B. Miller, R. D. Hudson, J. M. Borremans and C. W. Brockus (1978). "Multicentric origin of the atrial depolarization wave: the pacemaker complex. Relation to dynamics of atrial conduction, P-wave changes and heart rate control." Circulation **58**(6): 1036-1048.

Bonney, K. M. J. P. (2014). "Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat?" **21**.

Bortolini, M. J., M. V. Silva, F. M. Alonso, L. A. Medeiros, F. R. Carvalho, L. F. Costa, N. M. Silva, N. Penha-Silva, T. W. Mineo and J. R. Mineo (2016). "Strength and Aerobic Physical Exercises Are Able to Increase Survival of Toxoplasma gondii-Infected C57BL/6 Mice by Interfering in the IFN-γ Expression." Front Physiol **7**: 641.

Boscardin, S. B., A. C. Torrecilhas, R. Manarin, S. Revelli, E. G. Rey, R. R. Tonelli and A. M. Silber (2010). "Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies." J Cell Mol Med **14**(6b): 1373-1384.

Boyton, R. J. and D. M. J. T. i. i. Altmann (2002). "Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization?" **23**(11): 526-529.

Braithwaite, J. P. and Y. Al Khalili (2019). "Physiology, Muscle Myocyte."

Brener, Z. (1962). "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **4**: 389-396.

Brener, Z., R. T. J. I. a. o. a. Gazzinelli and immunology (1997). "Immnunological Control of

Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease." **114**(2): 103-110.

Brito, A., L. Falcão, A. Matias, R. Brito and R. J. R. d. E. Lima, Ciência e Inovação em Saúde (2021). "Um Doenças Negligenciadas: Doença de Chagas e os aspectos atuais do tratamento." **2**(1): 9-17.

Brum, P. C., A. V. Bacurau, A. Medeiros, J. C. Ferreira, A. S. Vanzelli and C. E. Negrão (2011). "Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function." Braz J Med Biol Res **44**(9): 827-835.

Bryan, M. A., S. E. Guyach and K. A. J. P. n. t. d. Norris (2010). "Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice." **4**(7): e733.

Bueno, C. R., Jr., J. C. Ferreira, M. G. Pereira, A. V. Bacurau and P. C. Brum (2010). "Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca2+ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure." J Appl Physiol (1985) **109**(3): 702-709.

Burgos, J. M., M. Diez, C. Vigliano, M. Bisio, M. Risso, T. Duffy, C. Cura, B. Brusses, L. Favaloro and M. S.

J. C. I. D. Leguizamon (2010). "Molecular identification of Trypanosoma cruzi discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation." **51**(5): 485-495. Cardoso, C. S., A. L. P. Ribeiro, C. D. L. Oliveira, L. C. Oliveira, A. M. Ferreira, A. L. Bierrenbach, J. L. P. Silva, E. A. Colosimo, J. E. Ferreira and T.-H. J. P. n. t. d. Lee (2018). "Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: NIH SaMi-Trop cohort study." **12**(11): e0006814.

Carneiro-Júnior, M. A., J. F. Quintão-Júnior, L. R. Drummond, V. N. Lavorato, F. R. Drummond, D. N. da Cunha, M. A. Amadeu, L. B. Felix, E. M. de Oliveira, J. S. Cruz, T. N. Prímola-Gomes, J. G. Mill and A. J. Natali (2013). "The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining." J Mol Cell Cardiol **57**: 119-128.

Cerbán, F. M., C. C. Stempin, X. Volpini, E. A. C. Silva, S. Gea and C. C. J. B. e. B. A.-M. B. o. D. Motran (2020). "Signaling pathways that regulate Trypanosoma cruzi infection and immune response." **1866**(5): 165707.

CHAGAS, C. (1909). Nova espécie mórbida do homem produzida por um trypanozoma (Schizotripanumcruzi), Brazil-méd.

Chagas, C. J. A. f. S.-u. T. (1909). "Neue Trypanosomen." **13**: 120.

Chandra, M., H. B. Tanowitz, S. B. Petkova, H. Huang, L. M. Weiss, M. Wittner, S. M. Factor, V. Shtutin, L. A. Jelicks and J. J. I. j. f. p. Chan (2002). "Significance of inducible nitric oxide synthase in acutemyocarditis caused by Trypanosoma cruzi (Tulahuen strain)." **32**(7): 897-905.

Chao, C. C., F. Strgar, M. Tsang, P. K. J. C. i. Peterson and immunopathology (1992). "Effects of swimming exercise on the pathogenesis of acute murine Toxoplasma gondii Me49 infection." **62**(2):220-226.

Chapadeiro, E. J. M. d. I. O. C. (1999). "Clinical evolution and morbi-mortality in Chagas disease." **94**:309-310.

Chatelain, E. J. C. and s. b. journal (2017). "Chagas disease research and development: Is there light atthe end of the tunnel?" **15**: 98-103.

Cirillo, M. (2018). "The Memory of the Heart." **5**(4): 55.

Conti, C. R. (2015). Sistema Cardiovascular -: Coleção Netter de Ilustrações Médicas, Elsevier Brasil. Correia, J. R., S. C. S. Ribeiro, L. V. F. de Araújo, M. C. Santos, T. R. Rocha, E. A. S. Viana, P. T. P. R. C. Caires, S. M. C. Corrêa, T. G. Pinheiro and L. C. J. R. E. A. S. de Carvalho (2021). "Doença de Chagas: aspectos clínicos, epidemiológicos e fisiopatológicos." **13**(3): e6502-e6502.

Costa, A. J. L. D. (2018). "Efeitos do treinamento físico sobre a função cardíaca e as propriedades mecânicas em cardiomiócitos de camundongos knockout para os receptores β2-adrenérgicos."

Crespo, C. J., E. Di Angelantonio and W. C. R. C. W. G. J. T. Lancet (2019). "World health organization cardiovascular disease risk charts: Revised models to estimate risk in 21 global regions." **7**.

Cruz, J. S., A. Santos-Miranda, P. A. Sales-Junior, R. Monti-Rocha, P. P. Campos, F. S. Machado, D. J. T.

Roman-Campos and hygiene (2016). "Altered cardiomyocyte function and Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease." **94**(5): 1028.

Cuello, F. and K. J. B. R. i. C. Lorenz (2016). "Inhibition of cardiac CaMKII to cure heart failure: step bystep towards translation?" **111**(6): 1-4.

Cunha-Neto, E. and C. J. M. o. i. Chevillard (2014). "Chagas disease cardiomyopathy: immunopathologyand genetics." **2014**.

Cunha-Neto, E. and J. J. A. Kalilf (2001). "Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis ofhuman Chagas' disease cardiomyopathy." **34**(3): 187-192.

Cunha, T. F., A. V. Bacurau, J. B. Moreira, N. A. Paixão, J. C. Campos, J. C. Ferreira, M. L. Leal, C. E. Negrão, A. S. Moriscot, U. Wisløff and P. C. Brum (2012). "Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure."PLoS One **7**(8): e41701.

Curi, R. and J. P. d. Araújo Filho (2009). Fisiologia básica. Fisiologia básica**:** 882-882.

Curran, J., M. J. Hinton, E. Ríos, D. M. Bers and T. R. J. C. r. Shannon (2007). "β-Adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase." **100**(3): 391-398.

Dal Pai-Silva, M., V. Dal Pai and R. Carvalho (2005). Célula muscular estriada esquelética. Células: umaabordagem multidisciplinar, São Paulo: Editora Manole.

Daliry, A., I. R. Pereira, P. P. Pereira-Junior, I. P. Ramos, G. Vilar-Pereira, R. R. Silvares, J. Lannes-Vieira and A. C. Campos De Carvalho (2014). "Levels of circulating anti-muscarinic and anti-adrenergic antibodies and their effect on cardiac arrhythmias and dysautonomia in murine models of Chagas disease." Parasitology **141**(13): 1769-1778.

Dávila, D. F., J. H. Donis, G. Arata de Bellabarba, V. Villarroel, F. Sanchez, L. Berrueta, S. Salmen and B.

Das Neves (2012). "Cardiac autonomic control mechanisms in the pathogenesis of chagas'heart disease." **2012**.

Dawidowski, M., V. C. Kalel, V. Napolitano, R. Fino, K. Schorpp, L. Emmanouilidis, D. Lenhart, M. Ostertag, M. Kaiser and M. J. J. o. m. c. Kolonko (2019). "Structure–activity relationship in pyrazolo [4, 3-c] pyridines, first inhibitors of PEX14–PEX5 protein–protein interaction with trypanocidal activity." **63**(2): 847-879.

de Andrade, M. F., V. D. de Almeida, L. M. S. de Souza, D. C. C. Paiva, C. d. M. Andrade and T. de Medeiros Fernandes (2018). "Involvement of neutrophils in Chagas disease pathology." **40**(12):e12593.

de Carvalho, A. C., H. B. Tanowitz, M. Wittner, R. Dermietzel, C. Roy, E. L. Hertzberg and D. C. Spray (1992). "Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with

Trypanosomacruzi." Circ Res **70**(4): 733-742.

de Cássia Cypriano Ervati Pinter, R., A. S. Padilha, E. M. de Oliveira, D. V. Vassallo and J. H. de Fúcio Lizardo (2008). "Cardiovascular adaptive responses in rats submitted to moderate resistance training."Eur J Appl Physiol **103**(5): 605-613.

de Figueiredo Brito, B. O. (2018). "Anormalidades eletrocardiográficas típicas e NT-proBNP elevado naDoença de Chagas."

de Oliveira, T. B., R. C. Pedrosa and D. J. I. j. o. c. Wilhelm Filho (2007). "Oxidative stress in chroniccardiopathy associated with Chagas disease." **116**(3): 357-363.

de Souza Nogueira Sardinha Mendes, F., M. F. F. Mediano, F. C. de Castro e Souza, P. S. da Silva, F. M. Carneiro, M. T. de Holanda, R. M. Saraiva, S. S. Xavier, P. E. A. Americano do Brasil and A. S. de Sousa (2020). "Effect of Physical Exercise Training in Patients With Chagas Heart Disease (from the PEACH STUDY)." The American Journal of Cardiology **125**(9): 1413-1420.

de Souza Nogueira Sardinha Mendes, F., M. F. F. Mediano, E. S. F. C. de Castro, P. S. da Silva, F. M. Carneiro, M. T. de Holanda, R. M. Saraiva, S. S. Xavier, P. E. A. Americano do Brasil and A. S. de Sousa(2020). "Effect of Physical Exercise Training in Patients With Chagas Heart Disease (from the PEACH STUDY)." Am J Cardiol **125**(9): 1413-1420.

Dias, J. C. P., A. N. Ramos Jr, E. D. Gontijo, A. Luquetti, M. A. Shikanai-Yasuda, J. R. Coura, R. M. Torres,

J. R. d. C. Melo, E. A. d. Almeida and W. d. J. E. e. S. d. S. Oliveira Jr (2016). "Brazilian consensus onChagas disease, 2015." **25**(SPE): 7-86.

Dias, J. C. P. J. M. d. I. O. C. (2007). "Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of Triatoma infestans and the interruption of transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives." **102**: 11-18.

Dupre, A., S. Vincent and P. A. Iaizzo (2005). Basic ECG Theory, Recordings, and Interpretation. Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices. P. A. Iaizzo. Totowa, NJ, Humana Press**:** 191-201.

Dutra, W., K. Gollob, J. Pinto-Dias, G. Gazzinelli, R. Correa-Oliveira, R. Coffman and J. Carvalho-Parra (1997). "Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated fromindividuals with Trypanosoma cruzi chronic infection." **45**(1): 74-80.

Dutra, W. O., C. A. Menezes, L. M. Magalhães and K. J. J. P. i. Gollob (2014). "Immunoregulatorynetworks in human C hagas disease." **36**(8): 377-387.

Echeverria, L. E. and C. A. J. I. D. C. Morillo (2019). "American trypanosomiasis (Chagas disease).**33**(1): 119-134.

Edhag, O. and A. Swahn (1976). "Prognosis of patients with complete heart block or arrhythmic syncope who were not treated with artificial pacemakers. A long-term follow-up study of 101 patients." Acta Med Scand **200**(6): 457-463.

Epstein, A. E., J. P. DiMarco, K. A. Ellenbogen, N. M. Estes, R. A. Freedman, L. S. Gettes, A. M. Gillinov, G. Gregoratos, S. C. Hammill and D. L. J. J. o. t. A. C. o. C. Hayes (2008). "ACC/AHA/HRS 2008 guidelines for device-based therapy of cardiac rhythm abnormalities: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices) developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons." **51**(21): e1-e62.

Erickson, J. R. and M. E. Anderson (2008). "CaMKII and its role in cardiac arrhythmia." J CardiovascElectrophysiol **19**(12): 1332-1336.

Ertek, S. and A. J. A. o. m. s. A. Cicero (2012). "Impact of physical activity on inflammation: effects oncardiovascular disease risk and other inflammatory conditions." **8**(5): 794.

Fajardo, G., M. Zhao, T. Urashima, S. Farahani, D.-Q. Hu, S. Reddy, D. J. J. o. m. Bernstein and c. cardiology (2013). "Deletion of the β2-adrenergic receptor prevents the development of cardiomyopathy in mice." **63**: 155-164.

Fernandes, A., T. d. O. Faria, R. Ribeiro Junior, G. Costa, B. Marchezini, E. Silveira, J. Angeli, I. Stefanon, D. Vassallo, J. J. B. J. o. M. Lizardo and B. Research (2015). "A single resistance exercise session improves myocardial contractility in spontaneously hypertensive rats." **48**: 813-821.

Fernandes, T., V. G. Baraúna, C. E. Negrão, M. I. Phillips and E. M. Oliveira (2015). "Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs." Am J Physiol HeartCirc Physiol **309**(4): H543-552.

Fernandes, T., U. P. Soci and E. M. Oliveira (2011). "Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants." Braz J Med Biol Res **44**(9): 836-847.

Ferraboli, R., E. D. M. Ornelas, F. L. A. Fonseca, G. L. d. Veiga, C. G. Cardoso, M. R. Marques and L. B. M.

C. S. Maifrino (2018). "Effect of mild aerobic exercise in atrial granules of mice with chronic Chagas Disease." **31**: 585-593.

Ferreira, J. C., N. P. Rolim, J. B. Bartholomeu, C. A. Gobatto, E. Kokubun, P. C. J. C. Brum, E. Pharmacology and Physiology (2007). "Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercisetraining." **34**(8): 760-765.

Filho, m. M., s. F. De siqueira, h. Moreira, a. Fagundes, a. Pedrosa, s. D. Ó. Nishioka, r. Costa, m. Scanavacca, a. D'ávila, e. J. P. Sosa and c. Electrophysiology (2000). "probability of

occurrence of life-threatening ventricular arrhythmias in Chagas' disease versus non-Chagas' disease.

Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard and A. J. T. J. o. i. O'Garra (1991). "IL-10 inhibitscytokine production by activated macrophages.

Franco-Paredes, C., A. Von, A. Hidron, A. J. Rodríguez-Morales, I. Tellez, M. Barragán, D. Jones, C. G. Náquira, J. J. B. I. H. Mendez and H. Rights (2007). "Chagas disease: an impediment in achieving theMillennium Development Goals in Latin America." **7**(1): 1-6.

Frank, K. F., B. Bölck, E. Erdmann and R. H. Schwinger (2003). "Sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPasemodulates cardiac contraction and relaxation." Cardiovasc Res **57**(1): 20-27.

Freitas, D. S., A. S. Silva Godinho, R. Mondêgo-Oliveira, F. O. Cardoso, A. L. Abreu-Silva and L. A. Silva(2020). "Anti-inflammatory and antioxidant therapies for chagasic myocarditis: a systematic review."Parasitology **147**(6): 603-610.

French, J. P., K. L. Hamilton, J. C. Quindry, Y. Lee, P. A. Upchurch and S. K. Powers (2008). "Exercise- induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **22**(8): 2862-2871.

French, J. P., J. C. Quindry, D. J. Falk, J. L. Staib, Y. Lee, K. K. Wang, S. K. J. A. J. o. P.-H. Powers and C. Physiology (2006). "Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition." **290**(1): H128-H136.

Frontera, W. R. and J. J. C. t. i. Ochala (2015). "Skeletal muscle: a brief review of structure and function." **96**(3): 183-195.

Garber, C. E., B. Blissmer, M. R. Deschenes, B. A. Franklin, M. J. Lamonte, I. M. Lee, D. C. Nieman and D.

P. Swain (2011). "American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise." Med Sci Sports Exerc **43**(7): 1334-1359. Gaspar, L., C. B Moraes, L. H Freitas-Junior, S. Ferrari, L. Costantino, M. Paola Costi, R. P Coron, T. K Smith, J. L Siqueira-Neto and J. J. C. m. c. H McKerrow (2015). "Current and future chemotherapy for Chagas disease." **22**(37): 4293-4312.

Gavaghan, M. (1998). "Cardiac anatomy and physiology: a review." Aorn j **67**(4): 802-822; quiz 824-808.

Gimenes, C., R. Gimenes, C. M. Rosa, N. P. Xavier, D. H. Campos, A. A. Fernandes, M. D. Cezar, G. N. Guirado, A. C. Cicogna, A. H. Takamoto, M. P. Okoshi and K. Okoshi (2015). "Low Intensity Physical Exercise Attenuates Cardiac Remodeling and Myocardial Oxidative Stress and Dysfunction in DiabeticRats." J Diabetes Res **2015**: 457848.

Gleeson, M. J. J. o. a. p. (2007). "Immune function in sport and exercise." **103**(2): 693-699. Glimcher, L. H. and K. M. Murphy (2000). "Lineage commitment in the immune system: the T helperlymphocyte grows up." Genes Dev **14**(14): 1693-1711.

Glimcher, L. H., K. M. J. G. Murphy and development (2000). "Lineage commitment in the immunesystem: the T helper lymphocyte grows up." **14**(14): 1693-1711.

Grant, A. O. (2009). "Cardiac ion channels." Circ Arrhythm Electrophysiol **2**(2): 185-194. Greener, I., O. Monfredi, S. Inada, N. Chandler, J. Tellez, A. Atkinson, M.-A. Taube, R.

Billeter, R.Anderson, I. J. J. o. m. Efimov and c. cardiology (2011). "Molecular architecture of the human specialised atrioventricular conduction axis." **50**(4): 642-651.

Greener, I. D., J. O. Tellez, H. Dobrzynski, M. Yamamoto, G. M. Graham, R. Billeter, M. R. J. C. A. Boyett and Electrophysiology (2009). "Ion channel transcript expression at the rabbit atrioventricular conduction axis." **2**(3): 305-315.

Gupta, S., J.-J. Wen and N. J. Garg (2009). "Oxidative Stress in Chagas Disease." Interdisciplinaryperspectives on infectious diseases **2009**: 190354-190354.

Gupta, S., J. J. Wen and N. J. Garg (2009). "Oxidative Stress in Chagas Disease." Interdiscip PerspectInfect Dis **2009**: 190354.

Gutierrez, F. R., T. W. Mineo, W. R. Pavanelli, P. M. Guedes and J. S. J. M. d. I. O. C. Silva (2009). "Theeffects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection." **104**: 236-245.

Hall, J. E. (2011). Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica, Elsevier Health Sciences.

HALL, J. E., T. de Fisiologia Médica and T. A. M. Junior (2011). 12ª edição, Rio de Janeiro. EditoraElsevier.

Hancox, J. C., K. H. Yuill, J. S. Mitcheson, M. K. J. I. J. o. B. Convery and Chaos (2003). "Progress and gaps in understanding the electrophysiological properties of morphologically normal cells from thecardiac atrioventricular node." **13**(12): 3675-3691.

Henao-Martínez, A. F. J. T. A. j. o. t. m. and hygiene (2016). "Rapid progressive Chagasic myocarditis: amultifactorial condition." **95**(1): 247.

Higuchi, M., M. Ries, V. D. Aiello, L. A. Benvenuti, P. S. Gutierrez, G. Bellotti, F. J. T. A. j. o. t. m. Pileggi and hygiene (1997). "Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruziantigens in chronic, human, chagasic myocarditis." **56**(5): 485-489.

Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes.

Hoch, B., R. Meyer, R. Hetzer, E.-G. Krause and P. J. C. r. Karczewski (1999). "Identification and

expression of δ-isoforms of the multifunctional Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in failingand nonfailing human myocardium." **84**(6): 713-721.

Horowits, R., E. S. Kempner, M. E. Bisher and R. J. Podolsky (1986). "A physiological role for titin andnebulin in skeletal muscle." Nature **323**(6084): 160-164.

Høydal, M. A., T. O. Stølen, S. Kettlewell, L. S. Maier, J. H. Brown, T. Sowa, D. Catalucci, G. Condorelli,

O. J. Kemi, G. L. Smith and U. Wisløff (2016). "Exercise training reverses myocardial dysfunction

induced by CaMKIIδC overexpression by restoring Ca2+ homeostasis." J Appl Physiol (1985)

121(1):212-220.

Hsia, H. H., F. E. J. P. Marchlinski and c. electrophysiology (2002). "Characterization of the electroanatomic substrate for monomorphic ventricular tachycardia in patients with nonischemiccardiomyopathy." **25**(7): 1114-1127.

Huang, B., D. QIN and N. J. J. o. c. e. EL-SHERIF (2000). "Early down-regulation of K+ channel genes and

currents in the postinfarction heart." **11**(11): 1252-1261.

Huang, Y., C. Lei, W. Xie, L. Yan, Y. Wang, S. Yuan, J. Wang, Y. Zhao, Z. Wang, X. Yang, X. Qin, Q. Fang, L. Fang and X. Guo (2021). "Oxidation of Ryanodine Receptors Promotes Ca(2+) Leakage and Contributesto Right Ventricular Dysfunction in Pulmonary Hypertension." Hypertension **77**(1): 59-71.

Joukar, S. (2021). "A comparative review on heart ion channels, action potentials and electrocardiogram in rodents and human: extrapolation of experimental insights to clinic." Lab AnimRes **37**(1): 25.

Jr, A. R., A. Rassi and W. C. J. C. c. Little (2000). "Chagas' heart disease." **23**(12): 883-889.

Júnior, M. A. C. "Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares emecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos."

Junior, P. A. S., I. Molina, S. M. F. Murta, A. Sánchez-Montalvá, F. Salvador, R. Corrêa-Oliveira, C. M. J.

T. A. j. o. t. m. Carneiro and hygiene (2017). "Experimental and clinical treatment of Chagas disease: areview." **97**(5): 1289-1303.

Kanaporis, G. and L. A. Blatter (2015). "The mechanisms of calcium cycling and action potentialdynamics in cardiac alternans." Circ Res **116**(5): 846-856.

Kanaporis, G. and L. A. Blatter (2017). "Alternans in atria: Mechanisms and clinical relevance."Medicina (Kaunas, Lithuania) **53**(3): 139-149.

Kaptoge, S., L. Pennells, D. De Bacquer, M. T. Cooney, M. Kavousi, G. Stevens, L. M. Riley, S. Savin, T. Khan and S. J. T. L. G. H. Altay (2019). "World Health Organization cardiovascular disease risk charts:revised models to estimate risk in 21 global regions." **7**(10): e1332-e1345.

Kapustian, L., I. Kroupskaya, O. Rozhko, V. Bobyk, D. Ryabenko and L. Sidorik (2014). "Akt1 expressionand activity at different stages in experimental heart failure." Pathophysiology **21**(2): 147-151.

Katz, A. M. (1996). Fisiologia do coração. Fisiologia do coração**:** 354-354. Katz, A. M. (2010). Physiology of the Heart, Lippincott Williams & Wilkins.

Kawaguchi, W. H., L. P. Leonart, M. M. Fachi, B. Böger and R. J. J. H. S. I. Pontarolo (2019). "Doença deChagas: do surgimento ao tratamento–revisão da litera-tura." **37**(2): 182-189.

Keating, S., X. Deng, F. Fernandes, E. Cunha-Neto, A. Ribeiro, B. Adesina, A. Beyer, P. Contestable, B. Custer and M. J. I. j. o. c. Busch (2015). "Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease." **199**: 451-459.

Keith, A. and M. J. T. L. Flack (1906). "The auriculo-ventricular bundle of the human heart." **168**(4328):359-364.

Khonsary, S. A. J. S. n. i. (2017). "Guyton and Hall: textbook of medical physiology." **8**.

Kim, J. M., J. P. Rasmussen and A. Y. J. N. i. Rudensky (2007). "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice." **8**(2): 191-197.

Klamt, F., F. Dal-Pizzol, M. L. Conte da Frota, Jr., R. Walz, M. E. Andrades, E. G. da Silva, R. R. Brentani, I. Izquierdo and J. C. Fonseca Moreira (2001). "Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein." Free Radic Biol Med **30**(10): 1137-1144.

Köhler, A. C., C. M. Sag and L. S. Maier (2014). "Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology." J Mol Cell Cardiol **73**: 92-102.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. J. A. r. o. i. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." **27**: 485-517.

Lacerda, A. C. R., U. Marubayashi and C. C. J. B. r. b. Coimbra (2005). "Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise." **67**(1-2): 110-116.

Lana, M. and W. J. P. h. Tafuri (2005). "Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas." **11**: 85-108.

Lanner, J. T., D. K. Georgiou, A. D. Joshi and S. L. J. C. S. H. p. i. b. Hamilton (2010). "Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release." **2**(11): a003996. Lascano, F., F. García Bournissen and J. J. B. J. o. C. P. Altcheh (2020). "Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease."

Le Loup, G., G. Pialoux and F. X. J. C. o. i. i. d. Lescure (2011). "Update in treatment of Chagas disease.**24**(5): 428-434.

Lee, B. Y., K. M. Bacon, M. E. Bottazzi and P. J. J. T. L. i. d. Hotez (2013). "Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model." **13**(4): 342-348.

Lenschow, D. J., T. L. Walunas and J. A. J. A. r. o. i. Bluestone (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." **14**(1): 233-258.

Leung, S., X. Liu, L. Fang, X. Chen, T. Guo and J. Zhang (2010). "The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease." Cellular & molecular immunology **7**(3): 182-189.

Leybaert, L., P. D. Lampe, S. Dhein, B. R. Kwak, P. Ferdinandy, E. C. Beyer, D. W. Laird, C. C. Naus, C. R. Green and R. Schulz (2017). "Connexins in Cardiovascular and Neurovascular Health and Disease: Pharmacological Implications." Pharmacological reviews **69**(4): 396-478.

Lidani, K. C. F., F. A. Andrade, L. Bavia, F. S. Damasceno, M. H. Beltrame, I. J. Messias-Reason and T. L. J.

F. i. p. h. Sandri (2019). "Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem." **7**: 166. Lieber, R. L. (2002). Skeletal muscle structure, function, and plasticity, Lippincott Williams & Wilkins. Lima, M. M., M. C. Nunes, M. O. Rocha, F. R. Beloti, M. C. Alencar and A. L. Ribeiro (2010). "Left ventricular diastolic function and exercise capacity in patients with Chagas cardiomyopathy." Echocardiography **27**(5): 519-524.

Lima, M. M., M. O. C. Rocha, M. C. P. Nunes, L. Sousa, H. S. Costa, M. C. N. Alencar, R. R. Britto and A. L.

P. J. E. j. o. h. f. Ribeiro (2010). "A randomized trial of the effects of exercise training in Chagascardiomyopathy." **12**(8): 866-873.

Lisewski, U., Y. Shi, U. Wrackmeyer, R. Fischer, C. Chen, A. Schirdewan, R. Jüttner, F. Rathjen, W. Poller and M. H. J. T. J. o. e. m. Radke (2008). "The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell–cell communication." **205**(10): 2369-2379.

López, J. R., R. Espinosa, P. Landazuru, N. Linares, P. Allen and A. Mijares (2011). "Dysfunction of Diastolic [Ca 2+] in Cardiomyocytes Isolated From Chagasic Patients." Revista Española de Cardiología (English Edition) **64**(6): 456-462.

Lopez, J. R., R. Espinosa, P. Landazuru, N. Linares, P. Allen and A. J. R. E. d. C. Mijares (2011). "Dysfunction of diastolic [Ca2+] in cardiomyocytes isolated from chagasic patients." **64**(6): 456-462. Lucchetti, B. F., N. G. Zanluqui, H. de Ataides Raquel, M. I. Lovo-Martins, V. L. Tatakihara, M. de Oliveira Belém, L. C. Michelini, E. J. de Almeida Araújo, P. Pinge-Filho and M. C. J. F. i. P. Martins-Pinge (2017). "Moderate treadmill exercise training improves cardiovascular and nitrergic response and resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice." **8**: 315.

Lucchetti, B. F. C., N. G. Zanluqui, H. de Ataides Raquel, M. I. Lovo-Martins, V. L. H. Tatakihara, M. de Oliveira Belém, L. C. Michelini, E. J. de Almeida Araújo, P. Pinge-Filho and M. C. Martins-Pinge (2017). "Moderate Treadmill Exercise Training Improves Cardiovascular and Nitrergic Response and Resistance to Trypanosoma cruzi Infection in Mice." Frontiers in physiology **8**: 315-315.

Lucchetti, B. F. C., N. G. Zanluqui, H. de Ataides Raquel, M. I. Lovo-Martins, V. L. H. Tatakihara, M. de Oliveira Belém, L. C. Michelini, E. J. de Almeida Araújo, P. Pinge-Filho and M. C. Martins-Pinge (2017). "Moderate Treadmill Exercise Training Improves Cardiovascular and Nitrergic Response and Resistance to Trypanosoma cruzi Infection in Mice." Frontiers in Physiology **8**.

Luczak, E. D., M. E. J. J. o. m. Anderson and c. cardiology (2014). "CaMKII oxidative activation and thepathogenesis of cardiac disease." **73**: 112-116.

Machado, F. S., W. O. Dutra, L. Esper, K. J. Gollob, M. M. Teixeira, S. M. Factor, L. M. Weiss, F. Nagajyothi, H. B. Tanowitz and N. J. Garg (2012). "Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease." Seminars in immunopathology **34**(6): 753-770.

Madamanchi, A. J. M. J. o. M. M. (2007). "β-Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heartfailure." **10**(2): 99.

Mady, C., R. Cardoso, A. Barretto, P. L. da Luz, G. Bellotti and F. J. C. Pileggi (1994). "Survival and predictors of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas' cardiomyopathy." **90**(6):3098-3102.

Maldonado, E., D. A. Rojas, S. Morales, V. Miralles and A. Solari (2020). "Dual and Opposite Roles of Reactive Oxygen Species (ROS) in Chagas Disease: Beneficial on the Pathogen and Harmful on the Host." Oxidative medicine and cellular longevity **2020**: 8867701-8867701.

Maldonado, E., D. A. Rojas, F. Urbina and A. Solari (2021). "The Oxidative Stress and Chronic Inflammatory Process in Chagas Disease: Role of Exosomes and Contributing Genetic Factors." OxidMed Cell Longev **2021**: 4993452.

Malik, L. H., G. D. Singh and E. A. J. C. c. Amsterdam (2015). "The epidemiology, clinical manifestations,and management of chagas heart disease." **38**(9): 565-569.

Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. J. N. Weaver (2006). "Transforming growth factor-β induces development of the TH17 lineage." **441**(7090): 231-234.

Manotheepan, R., T. K. Danielsen, M. Sadredini, M. E. Anderson, C. R. Carlson, S. E. Lehnart, I. Sjaastad and M. K. Stokke (2016). "Exercise training prevents ventricular tachycardia in CPVT1 due to reduced CaMKII-dependent arrhythmogenic Ca 2+ release." Cardiovascular Research **111**(3): 295-306.

Marban, E., T. Yamagishi and G. F. J. T. J. o. p. Tomaselli (1998). "Structure and function of voltage-gated sodium channels." **508**(Pt 3): 647.

Marcolino, M. S., D. M. Palhares, L. R. Ferreira and A. L. J. G. h. Ribeiro (2015). "Electrocardiogram and Chagas disease: a large population database of primary care patients." **10**(3): 167-172.

Marin-Neto, J. A., O. C. d. Almeida Filho, A. Pazin-Filho and B. C. J. A. b. d. c. Maciel (2002). "Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for earlytreatment of cardiomyopathy." **79**(6): 623-627.

Marin-Neto, J. A. and A. J. R. E. d. C. Rassi Jr (2009). Update on chagas heart disease on the firstcentennial of its discovery, Elsevier Doyma. **62:** 1211-1216.

Marinho, C. R., M. R. D'Império Lima, M. G. Grisotto and J. M. Alvarez (1999). "Influence of acute- phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronicphase of Chagas' disease." Infection and immunity **67**(1): 308-318.

Marinho, C. R., M. R. D'Império Lima, M. G. Grisotto, J. M. J. I. Alvarez and immunity (1999). "Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the latechronic phase of Chagas' disease." **67**(1): 308-318.

Marques, J., I. Mendoza, B. Noya, H. Acquatella, I. Palacios and M. J. A. B. d. C. Marques-Mejias (2013). "As manifestações de ECG do maior surto da doença de Chagas devido a infecção oral na América Latina." **101**: 249-254.

Martins, A. C. (2015). Anatomia e fisiologia humana, Martinari.

Maruyama, K. (1997). "Connectin/titin, giant elastic protein of muscle." Faseb j **11**(5): 341-345. Medeiros, A., N. P. Rolim, R. S. Oliveira, K. T. Rosa, K. C. Mattos, D. E. Casarini, M. C. Irigoyen, E. M. Krieger, J. E. Krieger, C. E. Negrão and P. C. Brum (2008). "Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice."J Appl Physiol (1985) **104**(1): 103-109.

Mediano, M. F., S. Mendes Fde, V. L. Pinto, G. M. Silva, P. S. Silva, F. M. Carneiro, L. H. Sangenis, R. M. Saraiva, S. S. Xavier, P. E. Brasil, A. M. Hasslocher-Moreno and A. S. Sousa (2016). "Cardiac rehabilitation program in patients with Chagas heart failure: a single-arm pilot study." Rev Soc Bras Med Trop **49**(3): 319-328.

Mehlhorn, H. (2016). Chagas, Carlos (1879–1934). Encyclopedia of Parasitology. H. Mehlhorn. Berlin,Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg**:** 1-2.

Melo, L., I. S. Caldas, M. A. Azevedo, K. R. Gonçalves, A. F. d. S. do Nascimento, V. P. Figueiredo, L. de Figueiredo Diniz, W. G. de Lima, R. M. Torres, M. T. J. T. A. J. o. T. M. Bahia and Hygiene (2011). "Low doses of simvastatin therapy ameliorate cardiac inflammatory remodeling in Trypanosoma cruzi- infected dogs." **84**(2): 325.

Melo, S. F., V. G. Barauna, T. Fernandes, E. C. Carmo, C. R. Carvalho and E. M. Oliveira (2017). "Cardiac AT(1) receptor-dependent and IGF1 receptor-independent signaling is activated by a single bout of resistance exercise." Physiol Res **66**(6): 1061-1065.

Mendonça, A. A. S., R. V. Gonçalves, T. G. Souza-Silva, I. R. S. C. Maldonado, A. Talvani, A. J. Natali and

R. D. Novaes (2019). "Concomitant exercise training attenuates the cardioprotective effects of pharmacological therapy in a murine model of acute infectious myocarditis." Life Sciences **230**: 141-149.

Michailowsky, V., N. M. Silva, C. D. Rocha, L. Q. Vieira, J. Lannes-Vieira and R. T. Gazzinelli (2001). "Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection." Am JPathol **159**(5): 1723-1733.

Mijares, A., R. Espinosa, J. Adams and J. R. Lopez (2020). "Increases in [IP3]i aggravates diastolic [Ca2+] and contractile dysfunction in Chagas' human cardiomyocytes." PLoS neglected tropical diseases **14**(4):e0008162-e0008162.

Milei, J., R. Pesce, E. Valero, C. Muratore, R. Beigelman and V. J. Ferrans (1991). "Electrophysiologic- structural correlations in chagasic aneurysms causing malignant arrhythmias." Int J Cardiol **32**(1): 65-73.

Molina, I., J. Gómez i Prat, F. Salvador, B. Treviño, E. Sulleiro, N. Serre, D. Pou, S. Roure, J. Cabezos, L. Valerio, A. Blanco-Grau, A. Sánchez-Montalvá, X. Vidal and A. Pahissa (2014). "Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease." N Engl J Med **370**(20): 1899-1908.

Moncayo, Á. and A. C. J. M. d. I. O. C. Silveira (2009). "Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy." **104**:17-30.

Moreira, N. M., F. Santos, M. J. Toledo, S. M. Moraes, E. J. Araujo, D. Sant'Ana and S. M. Araujo (2013). "Moderate physical exercise reduces parasitaemia and protects colonic myenteric neurons in mice infected with Trypanosoma cruzi." Int J Exp Pathol **94**(6): 426-435.

Moreira, N. M., J. N. Zanoni, M. M. de Oliveira Dalálio, E. J. de Almeida Araújo, C. F. Braga and S. M. de Araújo (2014). "Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia in Trypanosomacruzi infection." Experimental Parasitology **141**: 68-74.

Moreira, N. M., J. N. Zanoni, M. M. de Oliveira Dalálio, E. J. de Almeida Araújo, C. F. Braga and S. M. J.

E. p. de Araújo (2014). "Physical exercise protects myenteric neurons and reduces parasitemia inTrypanosoma cruzi infection." **141**: 68-74.

Morillo, C. A., J. A. Marin-Neto, A. Avezum, S. Sosa-Estani, A. Rassi Jr, F. Rosas, E. Villena, R. Quiroz, R.Bonilla and C. J. N. E. J. o. M. Britto (2015). "Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy." **373**(14): 1295-1306.

Morvan, E., N. E. Lima, J. F. Machi, C. Mostarda, K. De Angelis, M. C. Irigoyen, R. B. Wichi, B. Rodriguesand L. B. Maifrino (2013). "Metabolic, hemodynamic and structural adjustments to low intensity exercise training in a metabolic syndrome model." Cardiovasc Diabetol **12**: 89.

Müller Kratz, J., F. Garcia Bournissen, C. J. Forsyth and S. J. E. R. o. C. P. Sosa-Estani (2018). "Clinical andpharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease." **11**(10): 943-957.

Murphy, K. M., W. Ouyang, J. D. Farrar and J. J. A. r. o. i. Yang (2000). "Signaling and transcription in Thelper development." **18**: 451.

Nagatomi, R. J. E. I. R. (2006). "The implication of alterations in leukocyte subset counts on immunefunction." **12**: 54-71.

Nahar, J., T. Imam, K. S. Tickle and Y.-P. P. Chen (2013). "Association rule mining to detect factors which contribute to heart disease in males and females." Expert Systems with Applications **40**(4):1086-1093.

Nakamura, S., M. Kobayashi, T. Sugino, O. Kajimoto, R. Matoba and K. Matsubara (2010). "Effect of exercise on gene expression profile in unfractionated peripheral blood leukocytes." Biochem BiophysRes Commun **391**(1): 846-851.

Nánási, P. P., B. Horváth, F. Tar, J. Almássy, N. Szentandrássy, N. Jost, I. Baczkó, T. Bányász and A. Varró(2021). "Canine Myocytes Represent a Good Model for Human Ventricular Cells Regarding Their Electrophysiological Properties." Pharmaceuticals (Basel) **14**(8).

Nascimento, B. R., M. M. O. Lima, M. d. C. P. Nunes, M. C. N. d. Alencar, H. S. Costa, M. M. Pinto Filho,

V. E. S. Cota, M. O. d. C. Rocha and A. L. P. J. A. b. d. c. Ribeiro (2014). "Effects of exercise training onheart rate variability in Chagas heart disease." **103**: 201-208.

Němec, J., J. J. Kim and G. Salama (2016). "The link between abnormal calcium handling and

electrical instability in acquired long QT syndrome--Does calcium precipitate arrhythmic storms?" Progress in biophysics and molecular biology **120**(1-3): 210-221.

Nielsen, J. B., A. Pietersen, C. Graff, B. Lind, J. J. Struijk, M. S. Olesen, S. Haunsø, T. A. Gerds, P. T. Ellinor, L. Køber, J. H. Svendsen and A. G. Holst (2013). "Risk of atrial fibrillation as a function of the electrocardiographic PR interval: Results from the Copenhagen ECG Study." Heart Rhythm **10**(9): 1249-1256.

Nikolaienko, R., E. Bovo and A. V. Zima (2018). "Redox Dependent Modifications of Ryanodine Receptor: Basic Mechanisms and Implications in Heart Diseases." Front Physiol **9**: 1775.

Novaes, R. D., R. V. Gonçalves, A. R. Penitente, L. H. Bozi, C. A. Neves, I. R. Maldonado, A. J. Natali and

Talvani (2016). "Modulation of inflammatory and oxidative status by exercise attenuates cardiac morphofunctional remodeling in experimental Chagas cardiomyopathy." Life Sci **152**: 210-219.

Novaes, R. D., R. V. Gonçalves, A. R. Penitente, L. H. M. Bozi, C. A. Neves, I. R. Maldonado, A. J. Natali and A. J. L. s. Talvani (2016). "Modulation of inflammatory and oxidative status by exercise attenuatescardiac morphofunctional remodeling in experimental Chagas cardiomyopathy." **152**: 210-219.

Novaes, R. D., R. V. Gonçalves, A. R. Penitente, L. H. M. Bozi, C. A. Neves, I. R. S. C. Maldonado, A. J. Natali and A. Talvani (2016). "Modulation of inflammatory and oxidative status by exercise attenuatescardiac morphofunctional remodeling in experimental Chagas cardiomyopathy." Life Sciences **152**: 210-219.

Novaes, R. D., R. V. Gonçalves, A. R. Penitente, M. C. Cupertino, I. R. Maldonado, A. Talvani and A. J. J.

A. t. Natali (2017). "Parasite control and skeletal myositis in Trypanosoma cruzi-infected and exercisedrats." **170**: 8-15.

Novaes, R. D., R. V. Gonçalves, A. R. Penitente, M. C. Cupertino, I. R. S. C. Maldonado, A. Talvani and A.

J. Natali (2017). "Parasite control and skeletal myositis in Trypanosoma cruzi-infected and exercisedrats." Acta Tropica **170**: 8-15.

Novaes, R. D., A. R. Penitente, R. V. Gonçalves, A. Talvani, C. A. Neves, I. R. Maldonado and Natali (2011). "Effects of Trypanosoma cruzi infection on myocardial morphology, single cardiomyocyte contractile function and exercise tolerance in rats." **92**(5): 299-307.

Novaes, R. D., A. R. Penitente, R. V. Gonçalves, A. Talvani, C. A. Neves, I. R. S. C. Maldonado and A. J. Natali (2011). "Effects of Trypanosoma cruzi infection on myocardial morphology, single cardiomyocyte contractile function and exercise tolerance in rats." International journal of experimental pathology **92**(5): 299-307.

Novaes, R. D., A. R. Penitente, R. V. Gonçalves, A. Talvani, M. C. Peluzio, C. A. Neves, A. J.

Natali and I.

Maldonado (2013). "Trypanosoma cruzi infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats." **22**(4): 270-279.

Novaes, R. D., E. C. Santos, M. Fialho, W. G. Gonçalves, P. L. Sequetto, A. Talvani and R. V. Gonçalves (2017). "Nonsteroidal anti-inflammatory is more effective than anti-oxidant therapy in counteracting oxidative/nitrosative stress and heart disease in T. cruzi-infected mice." Parasitology **144**(7): 904-916.

Novaes, R. D., M. V. Sartini, J. P. Rodrigues, R. V. Gonçalves, E. C. Santos, R. L. Souza and I. S. Caldas (2016). "Curcumin Enhances the Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Benznidazole-Based Chemotherapy in Acute Experimental Chagas Disease." Antimicrob Agents Chemother **60**(6): 3355- 3364.

Nunes, M. C., A. A. Carmo, M. O. Rocha and A. L. Ribeiro (2012). "Mortality prediction in Chagas heartdisease." Expert Rev Cardiovasc Ther **10**(9): 1173-1184.

Nunes, M. C. P., A. Beaton, H. Acquatella, C. Bern, A. F. Bolger, L. E. Echeverria, W. O. Dutra, J. Gascon,

C. A. Morillo, J. Oliveira-Filho, A. L. P. Ribeiro, J. A. Marin-Neto, E. American Heart Association Rheumatic Fever, Y. Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the, C. Council on, N. Stroke and C. Stroke (2018). "Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical

Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association." Circulation **138**(12): e169-e209.

Nunes, M. C. P., W. Dones, C. A. Morillo, J. J. Encina and A. L. Ribeiro (2013). "Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects." Journal of the American College of Cardiology **62**(9):767-776.

Oliveira, F. P., R. C. Pedrosa and A. Giannella-Neto (2000). "Gas exchange during exercise in differentevolutional stages of chronic Chagas' heart disease." Arq Bras Cardiol **75**(6): 481-498.

Organization, W. H. (2010). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases: Workingto overcome the global impact of neglected tropical diseases**:** 172-172.

Padala, S. K., J. A. Cabrera, K. A. J. P. Ellenbogen and C. Electrophysiology (2021). "Anatomy of thecardiac conduction system." **44**(1): 15-25.

Paiva, C. N., D. F. Feijó, F. F. Dutra, V. C. Carneiro, G. B. Freitas, L. S. Alves, J. Mesquita, G. B. Fortes, R.

T. Figueiredo and H. S. J. T. J. o. c. i. Souza (2012). "Oxidative stress fuels Trypanosoma cruzi infectionin mice." **122**(7): 2531-2542.

Paiva, C. N., E. Medei and M. T. Bozza (2018). "ROS and Trypanosoma cruzi: Fuel to infection, poison tothe heart." PLoS Pathog **14**(4): e1006928.

Palmer, B. M. (2005). "Thick filament proteins and performance in human heart failure." Heart Fail Rev**10**(3): 187-197.

Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y.-H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu and Q. J. N. i.Tian (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin17." **6**(11): 1133-1141.

Pazin-Filho, A., A. Schmidt and B. C. J. M. Maciel (2004). "Ausculta cardiaca: bases fisiológicas-fisiopatológicas." **37**(3/4): 208-226.

Pereira, F. T., E. A. Rocha, P. Monteiro Mde, A. C. Neto, F. Daher Ede, C. R. Sobrinho and J. Pires Neto Rda (2014). "Long-term follow-up of patients with chronic chagas disease and implantable cardioverter-defibrillator." Pacing Clin Electrophysiol **37**(6): 751-756.

Pereira, I. R., G. Vilar-Pereira, A. A. d. Silva and J. J. M. d. I. O. C. Lannes-Vieira (2014). "Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels inthe serum: models of mild and severe disease." **109**: 289-298.

Pérez-Fuentes, R., J. F. Guégan, C. Barnabé, A. López-Colombo, H. Salgado-Rosas, E. Torres-Rasgado, B. Briones, M. Romero-Díaz, J. Ramos-Jiménez and C. Sánchez-Guillén Mdel (2003). "Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals." Int J Parasitol **33**(3): 293-299.

Pérez-Fuentes, R., E. Torres-Rasgado, H. Salgado-Rosas, I. Zamora-Ginez and M. C. Sánchez-Guillén(2008). "The anti-oxidant defence response in individuals with the indeterminate form of Chagas disease (American trypanosomiasis)." Ann Trop Med Parasitol **102**(3): 189-197.

Petersen, A. M. W. and B. K. J. J. o. a. p. Pedersen (2005). "The anti-inflammatory effect of exercise."

Porter, K. E., N. A. J. P. Turner and therapeutics (2009). "Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardialremodeling." **123**(2): 255-278.

Postan, M., J. J. Bailey, J. A. Dvorak, J. P. McDaniel and E. W. Pottala (1987). "Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection." Am J Trop Med Hyg **37**(3): 541-549.

Poveda, C., M. Fresno, N. Gironès, O. A. Martins-Filho, J. D. Ramírez, J. Santi-Rocca, J. A. Marin-Neto, C.

A. Morillo, F. Rosas and F. J. P. o. Guhl (2014). "Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting Trypanosoma cruzi discrete typing units (a BENEFIT TRIALsub-study)." **9**(3): e91154.

Prabhu, V., P. G. Kuppusamy, A. Karthikeyan and M. Sucharitha (2020). "A novel approach for non-invasive measurement of mean arterial pressure using pulse transit time." Multimedia Tools and Applications **79**(5): 3775-3789.

Prata, A. J. T. L. i. d. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." **1**(2): 92-100.

Preto, E., N. E. Lima, L. Simardi, F. L. A. Fonseca, A. A. Fragata Filho, L. B. M. J. B. t. Maifrino and therapy (2015). "Effect of mild aerobic training on the myocardium of mice with chronic Chagasdisease." **9**: 87.

Prímola-Gomes, T. N., W. Pires, L. O. Rodrigues, C. C. Coimbra, U. Marubayashi and N. R. J. N. l. Lima (2007). "Activation of the central cholinergic pathway increases post-exercise tail heat loss in rats." **413**(1): 1-5.

Qin, R., N. Murakoshi, D. Xu, K. Tajiri, D. Feng, E. N. Stujanna, S. Yonebayashi, Y. Nakagawa, H. Shimano, A. Nogami, A. Koike, K. Aonuma and M. Ieda (2019). "Exercise training reduces ventricular arrhythmias through restoring calcium handling and sympathetic tone in myocardial infarction mice."Physiological reports **7**(4): e13972-e13972.

Rassi, A., Jr., J. A. N. Marin and A. Rassi (2017). "Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial." Mem Inst Oswaldo Cruz **112**(3): 224-235.

Rassi, A., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." The Lancet **375**(9723): 1388-1402.

Rassi Jr, A., A. Rassi and J. A. J. M. d. I. O. C. Marin-Neto (2009). "Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification." **104**: 152-158.

Rassi Jr, A., A. Rassi and J. A. J. T. L. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." **375**(9723): 1388-1402.

Rassi Jr, A., S. G. Rassi and A. J. A. b. d. c. Rassi (2001). "Sudden death in Chagas' disease." **76**(1): 86-96.Ribeiro, A. L., P. S. Cavalvanti, F. Lombardi, C. Nunes Mdo, M. V. Barros and M. O. Rocha (2008). "Prognostic value of signal-averaged electrocardiogram in Chagas disease." J Cardiovasc Electrophysiol **19**(5): 502-509.

Ribeiro, A. L., M. P. Nunes, M. M. Teixeira and M. O. J. N. R. C. Rocha (2012). "Diagnosis andmanagement of Chagas disease and cardiomyopathy." **9**(10): 576-589.

Ribeiro, A. L., E. C. Sabino, M. S. Marcolino, V. M. Salemi, B. M. Ianni, F. Fernandes, L. Nastari, A. Antunes, M. Menezes and C. D. L. J. P. n. t. d. Oliveira (2013). "Electrocardiographic abnormalities inTrypanosoma cruzi seropositive and seronegative former blood donors." **7**(2): e2078.

Ribeiro, A. L. P. and da Costa Rocha (1998). "Indeterminate form of Chagas' disease: considerations about diagnosis and prognosis." **31**(3).

Ribeiro, A. L. P., M. S. Marcolino, R. J. Prineas and M. F. J. J. o. t. A. H. A. Lima-Costa (2014). "Electrocardiographic Abnormalities in elderly Chagas disease patients: 10-year follow-up of theBambuí Cohort Study of Aging." **3**(1): e000632.

Rocha, A., A. De Meneses, A. M. Da Silva, M. S. Ferreira, S. A. Nishioka, M. Burgarelli, E.

Almeida, K. Metze, E. J. T. A. J. o. T. M. Lopes and Hygiene (1994). "Pathology of patients with Chagas' disease andacquired immunodeficiency syndrome." **50**(3): 261-268.

Roman-Campos, D., A. C. Campos, C. R. Gioda, P. P. Campos, M. A. Medeiros and J. S. Cruz (2009). "Cardiac structural changes and electrical remodeling in a thiamine-deficiency model in rats." Life Sci**84**(23-24): 817-824.

Roman-Campos, D., H. L. Duarte, P. A. Sales, Jr., A. J. Natali, C. Ropert, R. T. Gazzinelli and J. S. Cruz (2009). "Changes in cellular contractility and cytokines profile during Trypanosoma cruzi infection inmice." Basic Res Cardiol **104**(3): 238-246.

Roman-Campos, D., H. L. L. Duarte, P. A. Sales, A. J. Natali, C. Ropert, R. T. Gazzinelli and J. S. J. B. r. i. c. Cruz (2009). "Changes in cellular contractility and cytokines profile during Trypanosoma cruzi infectionin mice." **104**(3): 238-246.

Roman-Campos, D., P. Sales-Junior, A. D. Costa, D. S. Souza, A. Santos-Miranda, J. V. Joviano-Santos, C. Ropert and J. S. Cruz (2022). "Impact of IFN-γ Deficiency on the Cardiomyocyte Function in theFirst Stage of Experimental Chagas Disease." **10**(2): 271.

Roman-Campos, D., P. Sales-Júnior, H. L. Duarte, E. R. Gomes, S. Guatimosim, C. Ropert, R. T. Gazzinelli and J. S. Cruz (2013). "Cardiomyocyte dysfunction during the chronic phase of Chagas disease." Mem Inst Oswaldo Cruz **108**(2): 243-245.

Roman-Campos, D., P. Sales-Júnior, H. L. Duarte, E. R. Gomes, S. Guatimosim, C. Ropert, R. T. Gazzinelli and J. S. Cruz (2013). "Cardiomyocyte dysfunction during the chronic phase of Chagas disease." Memorias do Instituto Oswaldo Cruz **108**(2): 243-245.

Roman-Campos, D., P. Sales-Júnior, H. L. Duarte, E. R. Gomes, S. Guatimosim, C. Ropert, R. T. Gazzinelli and J. S. J. M. d. I. O. C. Cruz (2013). "Cardiomyocyte dysfunction during the chronic phase of Chagas disease." **108**: 243-245.

Roman-Campos, D., P. Sales-Junior, H. L. Duarte, E. R. Gomes, A. Lara, P. Campos, N. N. Rocha, R. R. Resende, A. Ferreira, S. Guatimosim, R. T. Gazzinelli, C. Ropert and J. S. Cruz (2013). "Novel insights into the development of chagasic cardiomyopathy: Role of PI3Kinase/NO axis." International Journal ofCardiology **167**(6): 3011-3020.

Roman-Campos, D., P. Sales-Junior, H. L. Duarte, E. R. Gomes, A. Lara, P. Campos, N. N. Rocha, R. R. Resende, A. Ferreira, S. Guatimosim, R. T. Gazzinelli, C. Ropert and J. S. Cruz (2013). "Novel insights into the development of chagasic cardiomyopathy: role of PI3Kinase/NO axis." Int J Cardiol **167**(6): 3011-3020.

Rossi, M. A., H. B. Tanowitz, L. M. Malvestio, M. R. Celes, E. C. Campos, V. Blefari and C. M. J. P. n. t. d. Prado (2010). "Coronary microvascular disease in chronic Chagas cardiomyopathy including an overview on history, pathology, and other proposed pathogenic mechanisms." **4**(8): e674.

Rossi, M. A. J. I. j. o. c. (1998). "Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations." **66**(2): 183-194.

Rossow, C. F., K. W. Dilly, C. Yuan, M. Nieves-Cintrón, J. L. Cabarrus, L. F. J. J. o. m.

Santana and c. cardiology (2009). "NFATc3-dependent loss of Ito gradient across the left ventricular wall during chronic β adrenergic stimulation." **46**(2): 249-256.

Salles, G., S. Xavier, A. Sousa, A. Hasslocher-Moreno and C. Cardoso (2003). "Prognostic value of QT interval parameters for mortality risk stratification in Chagas' disease: results of a long-term follow-upstudy." Circulation **108**(3): 305-312.

Santana, L. F., E. P. Cheng and W. J. Lederer (2010). "How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart?" Journal of molecular and cellularcardiology **49**(6): 901-903.

Santos-Miranda, A., A. D. Costa, J. V. Joviano-Santos, P. Rhana, A. S. Bruno, P. Rocha, S. B. Cau, L. Q. Vieira, J. S. Cruz and D. Roman-Campos (2021). "Inhibition of calcium/calmodulin (Ca(2+) /CaM)- Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) axis reduces in vitro and ex vivo arrhythmiasin experimental Chagas disease." Faseb j **35**(10): e21901.

Santos-Miranda, A., J. V. Joviano-Santos, G. A. Ribeiro, A. F. M. Botelho, P. Rocha, L. Q. Vieira, J. S. Cruz and D. Roman-Campos (2020). "Reactive oxygen species and nitric oxide imbalances lead to in vivo and in vitro arrhythmogenic phenotype in acute phase of experimental Chagas disease." PLoS Pathog **16**(3):e1008379.

Santos-Miranda, A., J. V. Joviano-Santos, G. A. Ribeiro, A. F. M. Botelho, P. Rocha, L. Q. Vieira, J. S. Cruz and D. J. P. p. Roman-Campos (2020). "Reactive oxygen species and nitric oxide imbalances lead to in vivo and in vitro arrhythmogenic phenotype in acute phase of experimental Chagas disease." **16**(3): e1008379.

Santos, E. G., R. V. Gonçalves, T. G. Souza-Silva, I. R. Maldonado, E. C. Santos, A. Talvani, A. J. Natali and

Novaes (2019). "Could pre-infection exercise training improve the efficacy of specific antiparasitic chemotherapy for Chagas disease?" **146**(13): 1655-1664.

Santos, E. G., R. V. Gonçalves, T. G. Souza-Silva, I. R. S. C. Maldonado, E. C. Santos, A. Talvani, A. J. Natali and R. D. Novaes (2019). "Could pre-infection exercise training improve the efficacy of specific antiparasitic chemotherapy for Chagas disease?" Parasitology **146**(13): 1655-1664.

Scarpulla, R. C. (2011). "Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 familyregulatory network." Biochim Biophys Acta **1813**(7): 1269-1278.

Schanne, F. A., A. B. Kane, E. E. Young and J. L. J. S. Farber (1979). "Calcium dependence of toxic celldeath: a final common pathway." **206**(4419): 700-702.

Schebeleski-Soares, C., R. C. Occhi-Soares, S. M. Franzoi-de-Moraes, M. M. de Oliveira Dalalio, F. N. Almeida, M. J. de Ornelas Toledo, S. M. J. A. P. de Araújo, Nutrition, and Metabolism (2009). "Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against Trypanosoma cruzi infection inmice." **34**(4): 659-665

Schlagheck, M. L., D. Walzik, N. Joisten, C. Koliamitra, L. Hardt, A. J. Metcalfe, P. Wahl, W. Bloch, A. Schenk and P. Zimmer (2020). "Cellular immune response to acute exercise: Comparison of enduranceand resistance exercise." Eur J Haematol **105**(1): 75-84.

Schmitz, K. H., K. S. Courneya, C. Matthews, W. Demark-Wahnefried, D. A. Galvão, B. M. Pinto, M. L. Irwin, K. Y. Wolin, R. J. Segal, A. Lucia, C. M. Schneider, V. E. von Gruenigen and A. L. Schwartz (2010). "American College of Sports Medicine roundtable on exercise guidelines for cancer survivors." Med SciSports Exerc **42**(7): 1409-1426.

Scott, W., J. Stevens and S. A. Binder–Macleod (2001). "Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications." Physical Therapy **81**(11): 1810-1816.

Scriven, D. R. L., P. Asghari and E. D. W. Moore (2013). "Microarchitecture of the dyad." CardiovascularResearch **98**(2): 169-176.

Seder, R. and W. Paul (1994). "Acquisition of lymphokine-producing."

Sepúlveda, M., L. A. Gonano, M. Viotti, M. Morell, P. Blanco, M. López Alarcón, I. Peroba Ramos, A. Bastos Carvalho, E. Medei and M. J. C. c. m. Vila Petroff (2017). "Calcium/calmodulin protein kinase II-dependent ryanodine receptor phosphorylation mediates cardiac contractile dysfunction associated with sepsis." **45**(4): e399-e408.

Severs, N. J., E. Dupont, N. Thomas, R. Kaba, S. Rothery, R. Jain, K. Sharpey and C. H. J. C. G. J. Fry (2006). "Alterations in cardiac connexin expression in cardiomyopathies." **42**: 228-242.

Shao, C. H., X. H. Wehrens, T. A. Wyatt, S. Parbhu, G. J. Rozanski, K. P. Patel and K. R. Bidasee (2009). "Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation." J Appl Physiol(1985) **106**(4): 1280-1292.

Shehadeh, A. and T. J. J. C. c. Regan (1995). "Cardiac consequences of diabetes mellitus." **18**(6): 301-305.

Shih, H. T. (1994). "Anatomy of the action potential in the heart." Texas Heart Institute journal **21**(1):30-41.

Shikanai-Yasuda, M. A. and N. B. J. C. I. D. Carvalho (2012). "Oral transmission of Chagas disease."

Shioya, T. J. T. J. o. P. S. (2007). "A simple technique for isolating healthy heart cells from mousemodels." 0711050011-0711050011.

Sigg, D. C., P. A. Iaizzo, Y.-F. Xiao and B. He (2010). Cardiac electrophysiology methods and models,Springer Science & Business Media.

Simões, M. V., M. M. D. Romano, A. Schmidt, K. S. M. Martins and J. A. J. I. J. o. C. S. Marin-Neto(2018). "Chagas disease cardiomyopathy." **31**: 173-189.

Smaill, B. H., J. Zhao and M. L. Trew (2013). "Three-dimensional impulse propagation in myocardium:arrhythmogenic mechanisms at the tissue level." Circ Res **112**(5): 834-848.

Soares, C. S., R. C. Occhi, L. G. L. de Carvalho, S. M. Franzoi-de-Moraes, M. M. de Oliveira Dalalio and S.

M. J. A. S. H. S. de Araujo (2010). "Production of tumoral necrosis factor-alpha and hydrogen

peroxide during Trypanosoma cruzi infection in mice submitted to exercise/Producao de fator de necrose tumoral-alfa e peroxido de hidrogenio na infeccao pelo Trypanosoma cruzi em camundongos submetidos ao exercicio." **32**(1): 57-61.

Sommese, L., C. A. Valverde, P. Blanco, M. C. Castro, O. V. Rueda, M. Kaetzel, J. Dedman, M. E. Anderson, A. Mattiazzi and J. Palomeque (2016). "Ryanodine receptor phosphorylation by CaMKII promotes spontaneous Ca(2+) release events in a rodent model of early stage diabetes: The arrhythmogenic substrate." International journal of cardiology **202**: 394-406.

Sosa, E. and M. J. R. S. C. E. d. S. P. Scanavacca (1994). "Estudo eletrofisiológico na cardiopatiachagásica crônica." 168-176.

Stelken, A. M., L. T. Younis, S. H. Jennison, D. D. Miller, L. W. Miller, L. J. Shaw, D. Kargl and B. R. J. J. o.

Chaitman (1996). "Prognostic value of cardiopulmonary exercise testing using percent achieved of predicted peak oxygen uptake for patients with ischemic and dilated cardiomyopathy."**27**(2): 345-352.

Steverding, D. J. P. and vectors (2014). "The history of Chagas disease." **7**(1): 1-8.

Stølen, T. O., M. A. Høydal, O. J. Kemi, D. Catalucci, M. Ceci, E. Aasum, T. Larsen, N. Rolim, G. Condorelli, G. L. Smith and U. Wisløff (2009). "Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca2+ control, and SR Ca2+ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy." Circ Res **105**(6): 527-536.

Strauss, M., M. S. Lo Presti, P. C. Bazán, A. Baez, R. Fauro, B. Esteves, O. Sanchez Negrete, D. Cremonezzi, P. A. Paglini-Oliva and H. W. Rivarola (2013). "Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental Trypanosoma cruzi infection." Parasitol Int **62**(3): 293-299.

Swynghedauw, B. (1986). "Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiacand skeletal muscles." Physiol Rev **66**(3): 710-771.

Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler and K. M. Murphy (1997). "Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells." J Exp Med **185**(5): 817-824. Taniwaki, N. N., W. K. Andreoli, K. S. Calabrese, S. d. Silva and R. A. J. P. r. Mortara (2005). "Disruption of myofibrillar proteins in cardiac muscle of Calomys callosus chronically infected with Trypanosoma cruzi and treated with immunosuppressive agent." **97**(4): 323-331.

Tanowitz, H. B., F. S. Machado, D. C. Spray, J. M. Friedman, O. S. Weiss, J. N. Lora, J. Nagajyothi, D. N.Moraes, N. J. Garg and M. C. P. J. E. r. o. c. t. Nunes (2015). "Developments in the management of Chagas cardiomyopathy." **13**(12): 1393-1409.

Tarleton, R. (2003). Trypanosoma cruzi and Chagas disease: cause and effect. American trypanosomiasis, Springer**:** 107-115.

Tawara, S. (1906). Das Reizleitungssystem des Säugetierherzens: eine anatomisch-histologische Studieüber das Atrioventrikularbündel und die Purkinjeschen Fäden, Fischer.

Terlau, H. and W. J. D. N. Stühmer (1998). "Structure and function of voltage-gated ion channels."

Terra, R., P. Alves, S. G. da Silva, V. Salerno and P. J. I. j. o. s. m. Dutra (2013). "Exercise improves the Th1 response by modulating cytokine and NO production in BALB/c mice." **34**(07): 661-666.

Tofas, T., D. Draganidis, C. K. Deli, K. Georgakouli, I. G. Fatouros and A. Z. Jamurtas (2020). Exercise- Induced Regulation of Redox Status in Cardiovascular Diseases: The Role of Exercise Training and Detraining.

Torrent-Guasp, F., G. D. Buckberg, C. Clemente, J. L. Cox, H. C. Coghlan and M. Gharib (2001). The structure and function of the helical heart and its buttress wrapping. I. The normal macroscopic structure of the heart. Seminars in thoracic and cardiovascular surgery, Elsevier.

Torrent-Guasp, F. J. R. e. d. c. (1998). "Estructura y función del corazón." **51**(2): 91-102.

Vago, A. R., L. O. Andrade, A. A. Leite, D. d. Á. Reis, A. M. Macedo, S. J. Adad, S. Tostes Jr, V. M. Mariada Consolaçao, G. Brasileiro Filho and S. D. J. T. A. j. o. p. Pena (2000). "Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs." **156**(5): 1805-1809.

Varró, A., J. Tomek, N. Nagy, L. Virág, E. Passini, B. Rodriguez and I. Baczkó (2021). "Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior."Physiol Rev **101**(3): 1083-1176.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. J. I. Stockinger (2006). "TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing Tcells." **24**(2): 179-189.

Veloso, V. M., P. M. Guedes, I. M. Andrade, I. S. Caldas, H. R. Martins, C. M. Carneiro, G. L. Machado- Coelho, M. d. Lana, L. Galvão and M. T. J. M. d. I. O. C. Bahia (2008). "Trypanosoma cruzi: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection ofBeagle dogs." **103**(6): 528-534.

Vespa, G. N., F. Q. Cunha and J. S. Silva (1994). "Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro." Infect Immun **62**(11): 5177-5182. Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. J. N. r. i. Workman (2008). "How regulatory T cells work." **8**(7):523-532.

Viotti, R., C. Vigliano, B. Lococo, G. Bertocchi, M. Petti, M. G. Alvarez, M. Postan and A. J. A. o. i. m. Armenti (2006). "Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazoleversus no treatment: a nonrandomized trial." **144**(10): 724-734.

Wan, X. and N. J. Garg (2021). "Sirtuin Control of Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, andInflammation in Chagas Disease Models." Front Cell Infect Microbiol **11**: 693051.

Wan, X. and N. J. Garg (2021). "Sirtuin Control of Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation in Chagas Disease Models." Frontiers in cellular and infection microbiology **11**: 693051-693051.

Wang, J., S. Liu, G. Li and J. Xiao (2020). "Exercise Regulates the Immune System." Adv Exp Med Biol **1228**: 395-408.

Wang, K., J. G. Forbes and A. J. Jin (2001). "Single molecule measurements of titin elasticity." ProgBiophys Mol Biol **77**(1): 1-44.

Wang, S., B. Ziman, I. Bodi, M. Rubio, Y.-Y. Zhou, K. D'Souza, N. H. Bishopric, A. Schwartz and E. G. J. P. O. Lakatta (2009). "Dilated cardiomyopathy with increased SR Ca2+ loading preceded by a

hypercontractile state and diastolic failure in the α1CTG mouse." **4**(1): e4133.

Weeks, K. L., B. C. Bernardo, J. Y. Y. Ooi, N. L. Patterson and J. R. McMullen (2017). "The IGF1-PI3K-Akt Signaling Pathway in Mediating Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy and Protection." Adv Exp Med Biol **1000**: 187-210.

Weiss, J. N., P. Korge, H. M. Honda and P. J. C. r. Ping (2003). "Role of the mitochondrial permeabilitytransition in myocardial disease." **93**(4): 292-301.

Wellens, H. J. (2012). The conduction system of the heart: structure, function and clinical implications,Springer Science & Business Media.

Wen, J.-J., N. J. F. R. B. Garg and Medicine (2004). "Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of Trypanosoma cruzi infection." **37**(12): 2072-2081.

Garg and biomembranes (2008). "Mitochondrial generation of reactive oxygen species is enhanced at the Qo site of the complex III in the myocardium of Trypanosoma cruzi-infected mice: beneficial effects of an antioxidant." **40**(6): 587-598.

Wen, J.-J., S. Gupta, Z. Guan, M. Dhiman, D. Condon, C. Lui and N. J. J. J. o. t. A. C. o. C. Garg (2010). "Phenyl-α-tert-butyl-nitrone and benzonidazole treatment controlled the mitochondrial oxidative stress and evolution of cardiomyopathy in chronic chagasic rats." **55**(22): 2499-2508.

Wen, J. J., F. Nagajyothi, F. S. Machado, L. M. Weiss, P. E. Scherer, H. B. Tanowitz and N. J. Garg (2014). "Markers of oxidative stress in adipose tissue during Trypanosoma cruzi infection." Parasitol Res **113**(9): 3159-3165.

Williams-Blangero, S., T. Magalhaes, E. Rainwater, J. Blangero, R. Corrêa-Oliveira and J. L. Vandeberg (2007). "Electrocardiographic characteristics in a population with high rates of seropositivity for Trypanosoma cruzi infection." Am J Trop Med Hyg **77**(3): 495-499.

Woo, A. Y. H., Y. Song, R. P. Xiao and W. J. B. j. o. p. Zhu (2015). "Biased β2-adrenoceptor signalling in Heart Failure: pathophysiology and drug discovery." **172**(23): 5444-5456.

Wrightsman, R., S. Krassner, J. J. I. Watson and Immunity (1982). "Genetic control of responses toTrypanosoma cruzi in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival."

Wu, Y., J. Temple, R. Zhang, I. Dzhura, W. Zhang, R. Trimble, D. M. Roden, R. Passier, E. N. Olson and R. J. J. C. Colbran (2002). "Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model

of cardiachypertrophy." **106**(10): 1288-1293.

Xiang, Y. and B. K. J. S. Kobilka (2003). "Myocyte adrenoceptor signaling pathways." **300**(5625): 1530-1532.

Xiang, Y. K. J. C. r. (2011). "Compartmentalization of β-adrenergic signals in cardiomyocytes." **109**(2):231-244.

Yancy, C. W., M. Jessup, B. Bozkurt, J. Butler, D. E. Casey, Jr., M. H. Drazner, G. C. Fonarow, S. A. Geraci,

T. Horwich, J. L. Januzzi, M. R. Johnson, E. K. Kasper, W. C. Levy, F. A. Masoudi, P. E. McBride, J. J. McMurray, J. E. Mitchell, P. N. Peterson, B. Riegel, F. Sam, L. W. Stevenson, W. H. Tang, E. J. Tsai and B. L. Wilkoff (2013). "2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." J Am Coll Cardiol **62**(16): e147-239.

Yue, L., J. Xie and S. J. C. r. Nattel (2011). "Molecular determinants of cardiac fibroblast electricalfunction and therapeutic implications for atrial fibrillation." **89**(4): 744-753.

Zafra, G., J. C. Mantilla, H. M. Valadares, A. M. Macedo and C. I. J. P. R. González (2008). "Evidence ofTrypanosoma cruzi II infection in Colombian chagasic patients." **103**(3): 731-734.