

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

MARCOS ELIEZECK DOS SANTOS INACIO

**A SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA-GI COMO EIXO MODULADOR
DA PROTEÇÃO E DA MATURAÇÃO CARDÍACA**

Belo Horizonte, MG

Março/2026

MARCOS ELIEZECK DOS SANTOS INACIO

**A SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA-GI COMO EIXO
MODULADOR DA PROTEÇÃO E DA MATURAÇÃO CARDÍACA**

Tese 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 de título de
Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Guatimosim

Coorientador: Sergio R. A. Scalzo Júnior

Belo Horizonte, MG

Março/2026

043

Inacio, Marcos Eliezeck dos Santos.

A sinalização colinérgica–Gi como eixo modulador da proteção e da maturação cardíaca [manuscrito] / Marcos Eliezeck dos Santos Inacio. – 2026.
132 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Guatimosim. Coorientador: Sergio R. A. Scalzo Júnior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Coração. 3. Miócitos Cardíacos. 4. Receptores Acoplados a Proteínas G. I. Fonseca, Silvia Carolina Guatimosim. II. Scalzo Júnior, Sergio Ricardo Aluotto. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 417 DE MARCOS ELIEZECK DOS SANTOS INÁCIO

Às 10:00 horas do dia 05 do mês de março de 2026, Transmitida através da Plataforma Microsoft Teams, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Marcos Eliezeck dos Santos Inácio**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Orientadora - ICB/UFMG, Dr. Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior - Coorientador, ICB/UFMG, Profa. Dra. Ivanita Stefanon, CCS/UFES, Profa. Dra. Adriana Castello Costa Girardi, inCor-USP, Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz, University of South Florida e o Prof. Dr. Fernando Pedro Souza Neto, University of Minnesota**. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**A SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA-GI COMO EIXO MODULADOR DA PROTEÇÃO E DA MATUREÇÃO CARDÍACA**". 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 com louvor** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 05 de março de 2026.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Placoná Diniz, Usuário Externo**, em 11/03/2026, às 07:59, 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 **Adriana Castello Costa Girardi, Usuária Externa**, em 11/03/2026, às 10:23, 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 **Fernando Pedro de Souza Neto, Usuário Externo**, em 11/03/2026, às 18:17, 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 **Sérgio Ricardo Aluotto Scalzo Júnior, Usuário Externo**, em 17/03/2026, às 14:13, 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 **Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Professora do Magistério Superior**, em 17/03/2026, às 15:26, 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 **Ivanita Stefanon, Usuário Externo**, em 17/03/2026, às 20:24, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5017423** e o código CRC **87EC79AF**.

Apoio Institucional e Financeiro

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização Cardíaca, situado no Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, e teve auxílio financeiro das seguintes instituições:

- I) CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico);
- II) CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) e
- III) FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

A Deus, por sua fidelidade comigo, mesmo quando eu falhei em ser fiel a Ele.

Aos meus pais, Deli e Regina, e à minha avó, Carmelita. Mesmo sem terem tido a oportunidade de frequentar uma universidade, vocês foram a base para que hoje eu pudesse concluir esta etapa.

Aos meus irmãos, Ester, Gabriel e Sarah, e à minha namorada, Vivian. Estar em família foi o que tornou tudo mais leve.

Agradecimentos

A Deus, por sempre iluminar e direcionar o meu caminho, para que tudo acontecesse de forma boa, perfeita e agradável.

Aos meus pais, Deli Inácio e Regina Cláudia, e à minha avó Carmelita. Só nós sabemos as múltiplas dificuldades enfrentadas ao longo dessa longa trajetória. Vocês estiveram em todas essas conquistas, desde um calouro de 17 anos até hoje. Como doutor, essa conquista é mais de vocês do que minha.

À minha namorada Vivian, por todos esses anos de companheirismo e cumplicidade. Por compreender a rotina complexa e exaustiva da vida científica, entendendo minhas ausências e os momentos a que precisei renunciar. Obrigado por escolher permanecer, por embarcar comigo nessa trajetória desafiadora e por sonhar ao meu lado com um futuro melhor.

Aos meus irmãos, por estarem sempre ao meu lado e por tornarem significativas a responsabilidade e a alegria de ser o irmão mais velho. Aos meus tios pelo suporte.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Sílvia Guatimosim, por toda a disponibilidade, paciência e presença constante ao longo dessa caminhada. Pela confiança, parceria e amizade construídas, e por me ensinar muito além da ciência. Acredito que nosso encontro não foi por acaso; Deus sabia exatamente do que eu precisava. Obrigado, sobretudo, por nunca desistir de mim.

A todos os colaboradores que tornaram este trabalho possível. Em especial, à Thais Marques pela amizade construída.

A todos os colegas de laboratório que passaram pela minha vida. Em especial, àqueles com quem tive a oportunidade de aprender, como Itamar Couto, Fernando Pedro, Anderson Kennedy e Sérgio Scalzo. Aos que foram meus contemporâneos durante esta etapa: André, Bruno, Victor, Kiany, Katyana, Tamires, Gracy, Fernando, Iago e Janete. Todos vocês foram importantes para mim, cada um do seu jeito.

A todos os estudantes de iniciação científica que me acompanharam, Anna, Lucas e Davi, mas especialmente Mateus e Rayssa por todo o tempo que passamos juntos. A contribuição para a formação de vocês não foi unilateral; aprendi com vocês tanto quanto pude ensinar.

Resumo

Introdução: Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) desempenham papel central na regulação da função cardíaca e no desenvolvimento do coração, modulando processos como frequência cardíaca, contratilidade, remodelamento e maturação dos cardiomiócitos (CMs). Enquanto a hiperatividade das vias Gs e Gq está associada ao surgimento de patologias cardíacas e à aceleração da maturação celular, a ativação da via Gi (classicamente estimulada pela acetilcolina (ACh) por meio do receptor muscarínico M2), tem sido associada à cardioproteção e ao controle do crescimento celular. No entanto, apesar desses avanços, os mecanismos que sustentam tais efeitos, bem como as bases celulares envolvidas, permanecem pouco explorados. Nesse contexto, investigamos o papel da sinalização colinérgica/Gi tanto na resposta do coração adulto ao estresse adrenérgico, quanto na regulação da maturação cardíaca pós-natal. Para isto, esta tese foi dividida em dois capítulos.

Capítulo I: Para avaliar o papel terapêutico da via Gi em cardiomiócitos adultos, utilizamos um modelo murino com ativação seletiva da via Gi em CMs por meio do sistema DREADD (Myh6-hM4Di), ativado farmacologicamente por clozapina-N-óxido (CNO). Em protocolos *in vitro* e *in vivo* de sobrecarga adrenérgica induzida por 7 dias de isoproterenol (ISO), demonstramos que a ativação de Gi em CMs reduz a contratilidade celular e previne o remodelamento cardíaco patológico, incluindo o desenvolvimento da hipertrofia, morte de cardiomiócitos, a presença de infiltrado inflamatório e ativação de fibroblastos. Além disso, a ativação tardia de Gi, no dia 4 após o início do tratamento com isoproterenol, foi capaz de reverter alterações cardíacas já estabelecidas, como hipertrofia e inflamação, evidenciando um papel ativo dessa via na orquestração do reparo cardíaco.

Capítulo II: Para investigar o papel da atividade colinérgica na maturação cardíaca pós-natal, utilizamos diferentes modelos murinos com ganho ou redução da atividade colinérgica: camundongos VACHT-KD, Chat-ChR2, DREADD com ativação da sinalização Gi entre os dias 1 e 21 pós-natais (P1–P21), período que compreende a janela de maturação. Além de cultura de CMs neonatais. O aumento sistêmico de ACh nos camundongos Chat-ChR2 resultou em atraso maturacional, caracterizado por maior proliferação de CMs, menor crescimento celular e maior proporção de cardiomiócitos mononucleados. Em contraste, a redução global dos níveis de ACh acelerou o processo de maturação, promovendo o aumento do tamanho celular e da polinucleação. Já a ativação seletiva da via Gi em cardiomiócitos neonatais reproduziu o fenótipo de atraso maturacional, observado nos camundongos Chat-ChR2, indicando que os efeitos da ACh são predominantemente mediados pelo eixo ACh–M2–Gi. Estudos *in vitro* em cultura de cardiomiócitos demonstraram ainda que a ACh de origem miocitária exerce papel autócrino/parácrino no controle do crescimento celular, uma vez que a inibição da sua degradação reduziu a área dos CMs, enquanto o bloqueio da sua liberação ou sinalização promoveu hipertrofia celular.

Conclusão: Em conjunto, os dados demonstram que a via colinérgica/Gi exerce papel dual no coração, atuando como mecanismo de proteção frente a insultos adrenérgicos no coração adulto e como moduladora negativa da maturação estrutural e funcional dos cardiomiócitos no período pós-natal. Assim, o balanço dinâmico entre as vias adrenérgica e colinérgica emerge como determinante tanto para a adaptação cardíaca ao estresse, quanto para o desenvolvimento maturacional cardíaco, posicionando a sinalização Gi como potencial alvo terapêutico em diferentes contextos fisiológicos e patológicos do coração.

Palavras Chave: Cardiomiócito; Remodelamento cardíaco; GPCRs; Via Gi; maturação cardíaca.

Abstract

Introduction: G protein-coupled receptors (GPCRs) play a central role in the regulation of cardiac function and heart development by modulating processes such as heart rate, contractility, cardiac remodeling, and cardiomyocyte (CM) maturation. While hyperactivation of Gs and Gq signaling pathways is associated with the development of cardiac pathologies and accelerated maturation, activation of the Gi pathway (classically stimulated by acetylcholine (ACh) via the M2 muscarinic receptor) has been associated with cardioprotection and modulation of cellular growth. However, despite these advances, the mechanisms underlying these effects, as well as the cellular bases involved, remain poorly explored. In this context, we investigated the role of cholinergic/Gi signaling both in the response of the adult heart to adrenergic stress and in the regulation of postnatal cardiac maturation. For this purpose, this thesis was divided into two chapters. **Chapter I:** To evaluate the therapeutic role of the Gi pathway in adult cardiomyocytes, we used a murine model with selective Gi activation in CMs through the DREADD system (Myh6-hM4Di), pharmacologically activated by clozapine-N-oxide (CNO). In *in vitro* and *in vivo* models of adrenergic overload induced by isoproterenol (ISO), we demonstrated that Gi activation in CMs reduces cellular contractility and prevents pathological cardiac remodeling, including cardiac and cellular hypertrophy, cardiomyocyte death, inflammatory infiltration, fibroblast activation, and increased collagen expression. Moreover, late Gi activation was able to reverse already established cardiac injury, highlighting an active role of this pathway in orchestrating cardiac repair, possibly through communication between cardiomyocytes, inflammatory cells, and fibroblasts. **Chapter II:** To investigate the role of cholinergic activity in postnatal cardiac maturation, we used different murine models with either increased or reduced cholinergic activity: VAcHT-KD mice, Chat-ChR2 mice, and DREADD-based activation of Gi signaling between postnatal days 1 and 21 (P1–P21), the period that encompasses the maturation window. We also used neonatal CM cultures. Increased systemic ACh availability resulted in delayed maturation, characterized by increased CM proliferation, reduced cellular growth, and a higher proportion of mononucleated cardiomyocytes. In contrast, global reduction of ACh accelerated maturation, promoting increased cell size and higher multinucleation. Selective activation of the Gi pathway in neonatal cardiomyocytes reproduced the delayed maturation phenotype, indicating that ACh effects are predominantly mediated through the ACh–M2–Gi axis. *In vitro* studies further demonstrated that cardiomyocyte-derived ACh exerts an autocrine/paracrine role in controlling cellular growth, as inhibition of its degradation reduced CM area, whereas blockade of its release or muscarinic signaling promoted cellular hypertrophy. **Conclusion:** Collectively, our data demonstrate that the cholinergic/Gi pathway exerts a dual role in the heart, acting as a protective mechanism against adrenergic insults in the adult heart and as a negative modulator of structural and functional cardiomyocyte maturation during the postnatal period. Thus, the dynamic balance between adrenergic and cholinergic signaling emerges as a key determinant of both cardiac adaptation to stress and cardiac development, positioning Gi signaling as a potential therapeutic target across different physiological and pathological cardiac contexts: **Keywords: Cardiomyocyte; Cardiac remodeling; GPCRs; Gi pathway; cardiac maturation.**

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática de um receptor acoplado à proteína G (GPCR) e seu ciclo de ativação	21
Figura 2. Cascata de sinalização intracelular mediada por receptores beta adrenérgicos (β AR) e muscarínicos (M2) no cardiomiócito	22
Figura 3. Visão morfofuncional dos principais tipos de hipertrofia cardíaca	26
Figura 4. Engenharia genética do receptor muscarínico hM4Di	33
Figura 5. Representação do modelo de ativação adrenérgica sistêmica comparado ao CNO, um modelo de ativação célula-específico	36
Figura 6. Bandas obtidas a partir da genotipagem de animais Myh6-Cre/hM4Di ..	38
Figura 7. Caracterização funcional do modelo Myh6-Cre/hM4Di de ativação direcionada da via Gi em cardiomiócitos	45
Figura 8. A expressão de mCitrina é observada em cardiomiócitos de camundongos Myh6-Cre/hM4Di	46
Figura 9. O CNO reduz a contratilidade de CMs-Gi+	47
Figura 10. A ativação da via Gi pelo CNO reduz a fosforilação de substratos da PKA após o tratamento crônico e agudo.....	48
Figura 11. O tratamento com CNO <i>in vivo</i> induz redução da frequência cardíaca (FC).....	49
Figura 12. Células oriundas de animais hM4Di e Myh6-Cre não respondem ao CNO	49
Figura 13. O CNO reduz o aumento da contratilidade induzida pelo isoproterenol	50
Figura 14. O tratamento <i>in vivo</i> com CNO previne a hipertrofia cardíaca e do cardiomiócito.....	51
Figura 15. O tratamento com CNO previne a inflamação e fibrose cardíaca.....	52
Figura 16. A ativação da Via Gi aumenta a sobrevivência dos CMs	53
Figura 17. O tratamento com CNO normaliza a contratilidade de animais tratados com ISO	54
Figura 18. Avaliação temporal do remodelamento patológico induzido por isoproterenol (ISO).....	55
Figura 19. A ativação tardia da via Gi em cardiomiócitos reverte a hipertrofia cardíaca induzida por ISO em camundongos	56
Figura 20. O tratamento com CNO restaura parâmetros ecocardiográficos	57
Figura 21. O tratamento tardio reduz a inflamação e a fibrose cardíaca.....	58
Figura 22. A ativação tardia da via Gi em camundongos tratados com ISO normaliza a função contrátil em miócitos ventriculares	59
Figura 23. O tratamento tardio com CNO é mais eficiente que o repouso para a recuperação da hipertrofia e inflamação cardíaca	60

Figura 24. A ativação tardia da via Gi em cardiomiócitos previne o influxo de células CCR2 ⁺ para o coração em resposta ao dano induzido por ISO.....	62
Figura 25. O fluxo de microvesículas de cardiomiócitos para fibroblastos	76
Figura 26. Resumo gráfico dos principais achados (capítulo I).....	77
Figura 27. Principais mecanismos moleculares propostos	78
Figura 28. Características da maturação dos CMs	82
Figura 29. Comparativo morfoestrutural entre diferentes CMs isolados	94
Figura 30. Bandas obtidas a partir da genotipagem de animais Chat-ChR2 SuperVChT).....	96
Figura 31. Bandas obtidas a partir da genotipagem de animais VChT-KD.....	96
Figura 32. Eficácia da transdução pelo vetor viral AAV9	97
Figura 33. O aumento global da atividade colinérgica aumenta a janela proliferativa dos cardiomiócitos	100
Figura 34. O aumento na disponibilidade de ACh prejudica a hipertrofia e reduz a nucleação	102
Figura 35. A redução global da atividade colinérgica reduz a quantidade de cardiomiócitos em proliferação	103
Figura 36. A redução da disponibilidade global de ACh favorece a hipertrofia e a polinucleação de cardiomiócitos	105
Figura 37. A ativação seletiva da via Gi em 30% dos cardiomiócitos é capaz de aumentar a janela proliferativa.	107
Figura 38. A ativação de Gi seletivamente aos cardiomiócitos atrasa a hipertrofia e a polinucleação	108
Figura 39. A acetilcolina endógena modula o crescimento dos cardiomiócitos <i>in vitro</i> via receptores muscarínicos.....	110
Figura 40. Sistema nervoso autonômico e seus efeitos na maturação cardíaca	115
Figura 41. Resumo gráfico dos principais achados (capítulo II).....	116

Lista de tabelas

Tabela 1. Anticorpos e sondas utilizados nos experimentos de imunofluorescência e Western Blot.....	43
Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados para experimentos de citometria de fluxo ...	44

Lista de siglas e abreviaturas

A

α -SMA – Actina de músculo liso alfa
ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
AKT – Proteína quinase B
ANP – Peptídeo natriurético atrial
Ang II – Angiotensina II
ARA-C – Citarabina (Arabinosídeo de citosina)
AT1receptor – Receptor de angiotensina II tipo 1
ATP – Adenosina trifosfato
ATr – Atropina
a.u – Unidade arbitrária

B

BNP – Peptídeo natriurético tipo B
 β -AR – Receptor beta-adrenérgico

C

Ca^{2+} – Cálcio
CAMKII – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo II
CCR2 – Receptor de quimiocina C-C tipo 2
CD68 – Glicoproteína associada a macrófagos
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CMs – Cardiomiócitos
CMS-Gi+ – Cardiomiócitos com Gi ativada via CNO
CNO – Clozapina N-óxido

Cre – Recombinase Cre

CSA – Área de secção transversal

D

DAMPs – Padrões moleculares associados a dano
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
DREADD – Receptores projetados ativados exclusivamente por fármacos projetados

E

EBD – Corante Azul de Evans
ECG – Eletrocardiograma
ECO – Ecocardiograma

F

FACS – Separação celular ativada por fluorescência
FC – Frequência cardíaca

G

GDP – Guanosina difosfato
GPCRs – Receptores acoplados à proteína G
GTP – Guanosina trifosfato

H

hM4Di – Receptor muscarínico humano M4 modificado acoplado à proteína Gi
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
Hz – Hertz

I

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

ISO – Isoproterenol

L

lcnRNA – RNA longo não codificante

LVAWs – Parede anterior do ventrículo esquerdo na sistole

LVEF – Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

LVIDd – Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na diástole

LVIDs – Diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole

M

M2 – Receptor muscarínico M2

MCS – Velocidade máxima de contração

MEC – Matriz extracelular

miR – microRNA

mRNA – RNA mensageiro

MRS – Velocidade máxima de relaxamento

μmol/L – Micromol por litro

N

NFAT – Fator nuclear de células T ativadas

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NRG-1 – Neuregulina 1

nM – Nanomolar

P

PA – Pressão arterial

P1 – Dia pós-natal 1

P8 – Dia pós-natal 8

P21 – Dia pós-natal 21

Pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Per1 – Period Circadian Regulator 1

Per2 – Period Circadian Regulator 2

PGC-1α – Coativador 1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma

Pi3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – Proteína quinase A

Pyr – Piridostigmina

R

RyR2 – Receptor de rianodina tipo 2

S

SFB – Soro fetal bovino

SiRNA – RNA interferente pequeno

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNP – Sistema nervoso parassimpático

SNS – Sistema nervoso simpático

T

T3 – Hormônio Triiodotironina

TGFβ1 – Fator de crescimento transformador beta 1

TnT – Troponina T

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

V

VACHT – Transportador vesicular de acetilcolina

Ves – Vesamicol

W

WT – Wild type

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO I: A ativação da sinalização Gi exclusivamente em cardiomiócitos reverte a lesão cardíaca induzida pela sobrecarga adrenérgica	24
2. REVISÃO DE LITERATURA (capítulo I)	25
2.1 O Remodelamento cardíaco	25
2.2 Sobrecarga adrenérgica e lesão cardíaca	27
2.3 Via Gi em cardiomiócitos	29
2.4 Efeitos cardioprotetores atribuídos ao eixo ACh-M2-Gi	30
2.5 Modelo DREADD-Gi cardíaco	32
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL (capítulo I)	34
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo geral	36
4.2 Objetivos específicos	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS (capítulo I)	37
5.1 Animais	37
5.2 Genotipagem.....	37
5.3 Modelo de isoproterenol e tratamento de camundongos com CNO.....	38
5.4 Isolamento de miócitos ventriculares	38
5.5 Aquisição da contratilidade	39
5.6 Morfometria	39
5.7 Avaliação da lesão miocárdica	39
5.8 Imunofluorescência	40
5.9 Histologia	40
5.10 PCR em tempo real.....	40
5.11 Eletrocardiograma.....	41
5.12 Ecocardiografia.....	41
5.13 Citometria de fluxo	42
5.14 SDS-PAGE e imunoblotting	42
5.15 Análise estatística	42
6. RESULTADOS (capítulo I)	45
6.1 Caracterização do modelo Myh6-Cre/hM4Di	45
6.2 O tratamento com CNO previne o remodelamento cardíaco induzido pelo ISO	50

6.3	Evolução temporal do remodelamento cardíaco induzido por ISO	54
6.4	O tratamento com CNO reverte o dano cardíaco induzido pelo ISO.....	55
6.5	CNO é mais eficiente que repouso para a recuperação cardíaca	59
6.6	CNO favorece a recuperação do coração através da modulação do perfil inflamatório cardíaco	60
7.	DISCUSSÃO (capítulo I)	63
7.1	O modelo Myh6-Cre/hM4Di como ferramenta de estudo da sinalização Gi.....	63
7.2	Via Gi em situações de estresse cardíaco	64
7.3	Via Gi e remodelamento cardíaco reverso	66
7.4	Mecanismos da ativação Gi na regulação do ambiente inflamatório cardíaco	67
7.4.1	Citoproteção direta	68
7.4.2	Via colinérgica com agente anti-inflamatório	68
7.4.3	Ação parácrina cardiomiócitos-macrófago direta	70
7.4.4	Redução da frequência cardíaca	72
7.5	Os efeitos antifibróticos associados a via Gi	73
7.5.1	Redução da fibrose secundária a redução da inflamação	73
7.5.2	Redução da fibrose por ação parácrina cardiomiócito-fibroblastos	75
8.	CONCLUSÃO (capítulo I)	76
9.	LIMITAÇÃO DO ESTUDO (capítulo I)	78
	CAPÍTULO II: <i>A acetilcolina regula a maturação pós-natal do cardiomiócito através da sinalização via receptor M2 e proteína Gi.</i>	79
10.	REVISÃO DE LITERATURA (Capítulo II)	81
10.1	O processo de maturação cardíaca	81
10.2	Principais fatores que influenciam na maturação cardíaca	83
10.2.1	Fatores físicos e metabólicos	83
10.2.2	Fatores neuro-humorais	85
10.2.3	Ação de outros tipos celulares no processo de maturação dos cardiomiócitos	87
10.3	SNA e maturação cardíaca	89
11.	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL (capítulo II)	92
12.	OBJETIVOS	95
12.1	Objetivo geral	95
12.2	Objetivos específicos	95
13.	MATERIAIS E MÉTODOS (capítulo I)	96
13.1	Animais	96
13.1.1	Aumento sistêmico na disponibilidade de acetilcolina	96

13.1.2 Diminuição sistêmica na disponibilidade de acetilcolina	96
13.1.3 Ativação seletiva de Gi nos cardiomiócitos	96
13.2 Cultura primária de cardiomiócitos	97
13.3 Tratamento de camundongos e células	98
14. RESULTADOS (capítulo II).....	99
14.1 A superexpressão global de ACh retarda a maturação cardíaca	99
14.2 A redução global da ACh acelera a maturação cardíaca	96
14.3 Os efeitos da ACh sobre a maturação ocorrem predominantemente através do eixo ACh-M2-Gi	105
14.4 A sinalização colinérgica autócrina regula o crescimento maturacional dos cardiomiócitos <i>in vitro</i>	108
15. DISCUSSÃO (capítulo II).....	111
15.1 Via colinérgica e proliferação de cardiomiócitos	111
15.2 Via colinérgica e controle do crescimento de cardiomiócitos	113
16. CONCLUSÃO (capítulo II)	116
17.LIMITAÇÃO DO ESTUDO (capítulo II)	117
18. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1. INTRODUÇÃO

O coração é um órgão que atua como uma bomba, cuja função é impulsionar o sangue pelo sistema vascular, garantindo o fornecimento adequado de oxigênio e nutrientes a todos os tecidos do organismo. Embora apresente um ritmo de contração intrínseco, inicialmente determinado pelo sistema de condução cardíaco localizado no átrio direito, especificamente no nó sinoatrial, variáveis como a pressão arterial (PA), a frequência cardíaca (FC), relacionada ao cronotropismo positivo, a velocidade de contração e relaxamento do miocárdio, associada ao inotropismo e ao lusitropismo positivos, bem como a força de contração dos cardiomiócitos (CMs), são finamente moduladas pelo sistema nervoso autônomo (SNA), de acordo com as demandas metabólicas do organismo.

O SNA exerce esse controle por meio de seus dois ramos principais, o sistema nervoso simpático (SNS) e o sistema nervoso parassimpático (SNP), que atuam de forma funcionalmente oposta. Esses sistemas utilizam, como principais neurotransmissores, a noradrenalina (NE) e a acetilcolina (ACh), respectivamente. A ação desses neurotransmissores ocorre predominantemente por meio da ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), que desempenham papel central na modulação da função cardíaca.

Os receptores acoplados a proteína G:

A ideia inicial de que receptores de membrana desencadeavam respostas intracelulares, começou a ser discutida na década de 1960 a partir de respostas intracelulares desencadeadas por hormônios. Na década de 1980, Alfred Gilman e Martin Rodbell sugeriram que a transdução de sinais envolvia uma proteína até então desconhecida (depois batizada de proteína G em alusão ao mensageiro GTP). Os cientistas foram laureados com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1994 devido aos estudos envolvendo a transdução de sinal via proteína G. Na década de 1990, Brian Kobilka e H. Eric Xu determinaram a sequência de aminoácidos que compunham o receptor beta-2 adrenérgico, um importante marco na caracterização dos GPCRs. No ano de 2012, o Prêmio Nobel de Química foi concedido a Robert Lefkowitz e Brian Kobilka pelas contribuições fundamentais para a caracterização estrutural dos GPCRs (*protein-coupled receptors*).

Os GPCRs constituem uma ampla família de proteínas que estão presentes em quase todos os tecidos (VASSILATIS *et al.*, 2003). É um receptor caracterizado por sete domínios transmembrana, associados a proteínas G heterotriméricas, e possui cerca de 200 ligantes endógenos conhecidos. A relevância desses receptores na fisiologia cardiovascular é evidenciada pelo fato de que aproximadamente um terço dos fármacos utilizados na prática clínica cardiovascular têm como alvo os GPCRs (KAYE e KRUM, 2007; CAPOTE, PEREZ e LYMPEROPOULOS, 2015). A diversidade funcional desses receptores decorre, em grande parte, das diferentes subunidades que compõem a proteína G associada.

Vassilatis *et al.*, 2003 concluíram, através da análise de sequência genômica em banco de dados, que existem cerca de 367 GPCRs humanos que respondem a algum ligante endógeno, outros 380 são sensíveis a estímulos sensoriais externos, totalizando 747 receptores diferentes. Destes receptores, apenas 200 apresentam ligantes conhecidos, e a grande maioria segue como “receptores órfãos”. Os GPCRs são extremamente versáteis e capazes de responder a diversos ligantes, como hormônios, neurotransmissores, peptídeos, proteínas, odorantes, feromônios, luz, Ca^{2+} extracelular, atividade de protease, entre outros. Embora englobados na mesma classe, os GPCRs só compartilham de forma unânime a característica heterotriméticas (compostas por subunidades Alfa, Beta e Gamma- $G\alpha\beta\gamma$) e heptahelicoidais (sete hélices que atravessam a membrana plasmática), pois nas demais características como localização do terminal N (extracelular) e do terminal C (Intracelular), tamanho das alças extra e intracelulares variam amplamente em estrutura e função (GUREVICH e GUREVICH, 2018).

Atualmente, são descritos pelo menos 21 tipos distintos de subunidades $G\alpha$, além de 6 subunidades $G\beta$ e 12 subunidades $G\gamma$ (WANG, GARERI e ROCKMAN, 2018). Considerando que, na maioria das vias de sinalização, a subunidade $G\alpha$ é a principal responsável pela ativação dos efetores intracelulares, esta tem sido alvo de intenso interesse científico (CAPOTE, MENDEZ PEREZ e LYMPEROPOULOS, 2015; WETTSCHURECK e OFFERMANN, 2005). A atividade de um GPCR se inicia através da interação entre o receptor e seu agonista; a partir daí, através de mudanças conformacionais, o receptor se acopla à subunidade intracelular heterotrimérica (α , β e γ). Neste momento de atividade, a subunidade α troca seu acoplamento de GDP pelo GTP, o que propicia sua separação das subunidades β e γ , que seguem em

dímero, sendo consideradas uma única subunidade efetora. Ambas as subunidades efetoras (α e β/γ) ativam cascatas celulares específicas (GARCÍA-NAFRÍA e TATE, 2021). O modelo esquemático da atividade funcional geral de um GPCR é demonstrado na Figura 1.

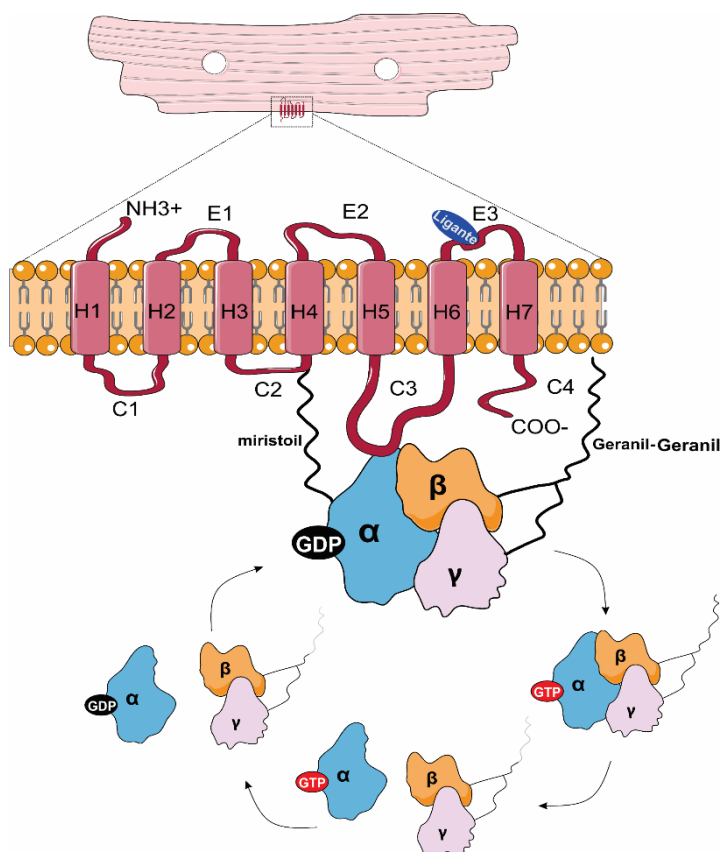


Figura 1: Representação esquemática de um GPCR e seu ciclo de ativação. No detalhe superior, observa-se a estrutura transmembrana do receptor com sete hélices (α -hélices de H1 a H7), alças extracelulares (E1-E3) para ligação do ligante e alças intracelulares (C1-C4) para interação com a proteína G heterotrímica (α , β e γ). A porção inferior ilustra o ciclo de sinalização: a troca de GDP por GTP na subunidade α promove a dissociação do complexo β/γ , permitindo que as subunidades ativem seus respectivos efetores intracelulares. Note-se a ancoragem lipídica das subunidades à membrana plasmática via grupos miristoil e geranyl-geranyl.

No tecido cardíaco, as subunidades G_{aq} e G_{as} , de caráter excitatório, e G_{ai} , de caráter inibitório, desempenham papéis centrais na regulação da função celular, sendo comumente referidas como G_q , G_s e G_i . A subunidade G_q está associada a diversos receptores implicados na fisiopatologia cardíaca, incluindo o receptor AT1, ativado pela angiotensina II (Ang II). A subunidade G_s , por sua vez, está principalmente vinculada aos receptores β -adrenérgicos (β AR), que respondem à noradrenalina liberada pela inervação simpática cardíaca, realizando principalmente o aumento das variáveis cardíacas com efeitos cronotrópicos, lusitrópicos e inotrópicos positivos (os principais mecanismos da via G_s nos CMs são descritos na figura 2). Já a subunidade G_i encontra-se predominantemente associada ao receptor muscarínico do tipo 2 (M2), ativado pela acetilcolina liberada pelas fibras vagais parassimpáticas cardíacas que, em última instância, exerce efeitos cronotrópicos, lusitrópicos e inotrópicos negativos (LYMPEROPOULOS et al., 2021).

Nesse contexto, o eixo NE- β AR-Gs, quando ativado de forma desproporcional, tem sido frequentemente associado a processos de lesão e disfunção cardíaca, enquanto o eixo ACh-M2-Gi é classicamente relacionado a mecanismos de cardioproteção, como demonstrado por por nosso (GAVIOLI *et al.*, 2014; LATARO *et al.*, 2013; ROY *et al.*, 2013) e por outros grupos (LI *et al.*, 2004, 2013; ZHANG *et al.*, 2009), aspectos que serão discutidos em maior profundidade ao longo desta tese. Embora quando estimulada em excesso a via Gs possa gerar efeitos patológicos, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a sinalização mediada por Gs contribui de maneira significativa para o desenvolvimento adequado dos CMs (ELIEZECK *et al.*, 2024). Em contraste, os efeitos diretos da ativação seletiva da via Gi sobre os CMs permanecem pouco explorados, seja relacionados à cardioproteção ou ao desenvolvimento cardíaco, em grande parte devido à dificuldade de dissociar os efeitos sistêmicos do SNA de mecanismos celulares específicos.

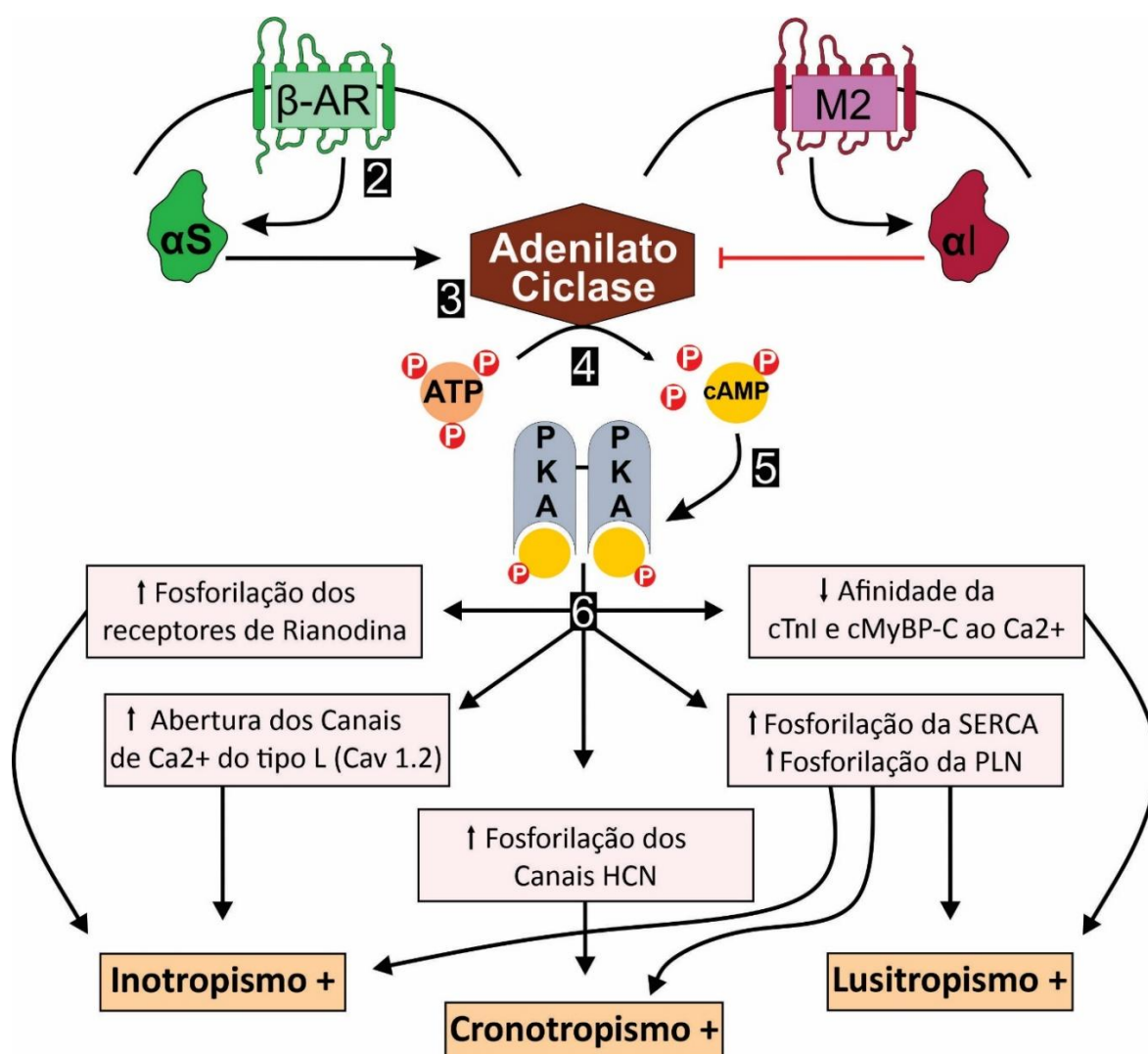


Figura 2: Cascata de sinalização intracelular mediada por receptores beta adrenérgicos (β AR) e muscarínicos (M2) no cardiomiócito. A ativação do β AR estimula a proteína Gs, que ativa a adenilato ciclase para converter ATP em AMP cíclico (cAMP). O aumento de cAMP ativa a proteína quinase A (PKA), resultando na fosforilação de diversas proteínas-alvo. Esse processo culmina em efeitos fisiológicos positivos: Inotropismo (aumento da força de contração via canais de cálcio e receptores de rianodina), Cronotropismo (aumento da frequência cardíaca via canais HCN) e Lusitropismo (aumento da velocidade de relaxamento via fosforilação de fosfolambam/PLN e SERCA). O receptor M2 exerce efeito oposto através da proteína Gi inibindo a adenilato ciclase. Fonte: Wettschureck e Offermanns, 2005; Lympelopoulos e Bathgate, 2013.

Essas lacunas sugerem que vias tradicionalmente associadas à cardioproteção aguda podem também exercer influência sobre processos estruturais e funcionais de longo prazo, como o desenvolvimento e a maturação cardíaca. Dessa forma, o presente trabalho investiga o papel da sinalização colinérgica Gi como um eixo modulador tanto da proteção quanto do desenvolvimento cardíaco, utilizando uma abordagem experimental que permite a ativação seletiva dessa via em CMs. A tese está organizada em dois capítulos experimentais: o primeiro avalia o impacto da ativação da via Gi na proteção do coração frente à sobrecarga adrenérgica, enquanto o segundo examina sua contribuição para o desenvolvimento cardíaco. Em conjunto, esses estudos buscam integrar os processos de proteção e desenvolvimento sob uma mesma perspectiva fisiológica

CAPITULO I

A ativação da sinalização Gi exclusivamente em cardiomiócitos reverte a lesão cardíaca induzida pela sobrecarga adrenérgica.

2. REVISÃO DE LITERATURA (Capítulo I)

2.1 O remodelamento cardíaco

O remodelamento cardíaco pode ser definido como o conjunto de alterações moleculares, celulares e intersticiais que culminam em modificações no tamanho, na forma e na função do coração (PARREIRA *et al.*, 2020). De modo geral, esse processo é classificado em remodelamento cardíaco fisiológico ou patológico, a depender da natureza, intensidade e duração do estímulo.

O remodelamento cardíaco fisiológico ocorre em situações adaptativas, como durante o desenvolvimento pós-natal, a prática regular de exercício físico ou a gestação. Nesses contextos, observam-se alterações morfoestruturais organizadas, incluindo hipertrofia cardíaca proporcional, aumento da rede vascular e preservação da função contrátil. Trata-se de um processo bem adaptado, reversível, que não envolve morte celular significativa e que, em geral, resulta em melhora da capacidade funcional do órgão (NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018; WEEKS e MCMULLEN, 2011). Em contraste, o remodelamento cardíaco patológico desenvolve-se em resposta a estímulos cardiodeletérios persistentes, como sobrecarga hemodinâmica, isquemia ou hiperativação neuro-hormonal. Esse tipo de remodelamento caracteriza-se por uma resposta mal adaptativa, associada à disfunção contrátil, morte celular, fibrose intersticial, estresse oxidativo e inflamação, apresentando caráter progressivo e, frequentemente, irreversível (AZEVEDO *et al.*, 2016; NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018). Uma visão geral dos diferentes tipos de hipertrofia cardíaca encontra-se ilustrada na Figura 3.

A hipertrofia patológica apresenta características distintas que a diferenciam da forma fisiológica. Além do aumento da síntese proteica e do crescimento celular (comuns a ambos os processos), observa-se, no remodelamento patológico, desregulação do manejo intracelular de Ca^{2+} , reexpressão de genes fetais, comprometimento da função mitocondrial e ribossomal, bem como a indução de apoptose, inflamação e fibrose. Em muitos casos, o impacto funcional do remodelamento cardíaco patológico supera aquele causado pelo estímulo inicial, sendo o principal determinante do prognóstico clínico. Diversas vias de sinalização intracelular participam da modulação do remodelamento cardíaco, com destaque para aquelas mediadas por GPCRs. Essas

vias desempenham papel central na determinação do tipo, da progressão e da reversibilidade da hipertrofia cardíaca. Diante disso, o presente capítulo discute mecanismos envolvidos na prevenção e na reversão do remodelamento cardíaco patológico induzido por sobrecarga adrenérgica. Dentre os diferentes estímulos capazes de desencadear e sustentar o remodelamento cardíaco patológico, a hiperativação do SNS ocupa posição de destaque.

A ativação adrenérgica crônica, inicialmente compensatória, exerce profundo impacto sobre a estrutura e a função do miocárdio, modulando processos como hipertrofia, morte celular, fibrose e disfunção contrátil. Nesse contexto, a sinalização mediada por catecolaminas e seus receptores emerge como um eixo central na transição entre adaptação e má adaptação cardíaca. Assim, torna-se fundamental compreender como a hiperativação adrenérgica contribui para o desenvolvimento e a progressão do remodelamento cardíaco patológico, tema que será abordado no tópico seguinte.

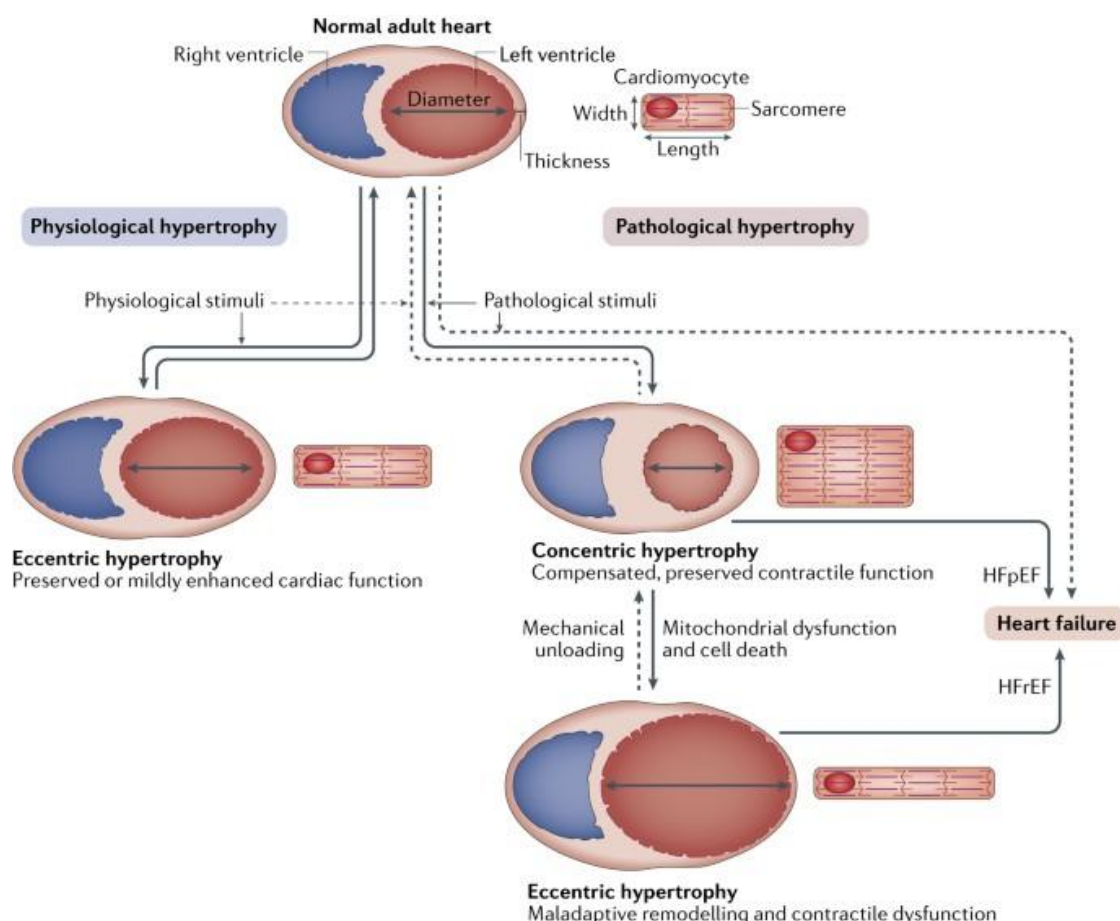


Figura 3: Visão morfofuncional dos principais tipos de hipertrofia cardíaca: A partir de um coração adulto normal, estímulos fisiológicos (como o exercício físico) promovem uma hipertrofia excêntrica, caracterizada pelo aumento proporcional das câmaras e preservação da função cardíaca. Em contraste, estímulos patológicos desencadeiam inicialmente uma hipertrofia concêntrica, com aumento

da espessura da parede e redução do diâmetro da cavidade para compensar a sobrecarga. A persistência do estresse patológico, aliada à disfunção mitocondrial e morte celular, leva ao remodelamento mal-adaptativo (hipertrofia excêntrica patológica), resultando em dilatação ventricular, disfunção contrátil e evolução para quadros de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (HFpEF) ou reduzida (HFrEF). Nakamura e Sadoshima, 2018.

Como este trabalho aborda a reversão do remodelamento cardíaco patológico, é importante contextualizar esta definição que vem ganhando destaque nas últimas décadas: o remodelamento cardíaco reverso. Esse termo refere-se ao processo pelo qual alterações estruturais, funcionais e moleculares do coração, previamente associadas a condições patológicas como hipertrofia, dilatação ventricular e disfunção contrátil/sistólica podem ser parcial ou totalmente revertidas após a remoção do estímulo agressor ou mediante intervenções terapêuticas eficazes (MARTIN, JUARROS e LEINWAND, 2023)

Esse fenômeno tem sido descrito após tratamento farmacológico otimizado, especialmente com inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona e betabloqueadores, bem como após terapias de ressincronização cardíaca ou correção de sobrecargas hemodinâmicas. O remodelamento reverso está associado à redução do tamanho cardíaco e dos CMs, melhora da fração de ejeção, normalização de vias de sinalização relacionadas à hipertrofia celular, aprimoramento do metabolismo energético e atenuação da fibrose, por meio da reorganização da matriz extracelular. Embora por muitos anos o remodelamento cardíaco tenha sido considerado um processo irreversível, evidências acumuladas nas últimas décadas demonstram que essa regressão é possível por meio de terapias específicas e coordenadas, estando associada a melhor prognóstico clínico (MARTIN, JUARROS e LEINWAND, 2023).

2.2 Sobrecarga adrenérgica e lesão cardíaca:

Um dos principais mecanismos associados ao desenvolvimento do remodelamento cardíaco patológico é a sobrecarga adrenérgica, frequentemente descrita como consequência de um desbalanço autonômico. Esse desbalanço caracteriza-se por uma assimetria na atividade do SNA, na qual a descarga simpática deixa de ser rítmica e finamente regulada, passando a ocorrer de forma exacerbada e persistente. Inicialmente, o aumento do tônus simpático atua como um mecanismo compensatório, promovendo elevação da força de contração, bem como das velocidades de contração e relaxamento, com o objetivo de preservar o débito cardíaco, garantindo assim a perfusão tecidual adequada. (LYMPEROPOULOS; RENGO; KOCH, 2013).

Contudo, o estresse à manutenção desse estado hiperadrenérgico leva a um aumento expressivo das concentrações intersticiais e circulantes de catecolaminas, podendo atingir níveis 500 vezes superiores aos fisiológicos (LAMERIS *et al.*, 2000; WORTSMAN, FRANK e CRYER, 1984). Esse fenômeno decorre da ativação excessiva e sustentada do SNS, com liberação contínua de noradrenalina, somada ao aumento de produção de adrenalina pela suprarrenal, que retroalimenta o desbalanço autonômico principalmente por favorecer os níveis de outras catecolaminas circulantes, como adrenalina, intensificando ainda mais seus efeitos deletérios (NAKAMURA e SADOSHIMA, 2018). Esse ambiente é suficiente para induzir sobrecarga intracelular de Ca^{2+} nos CMs, culminando em aumento da morte celular (LAMERIS *et al.*, 2000; SHENG *et al.*, 2023).

Do ponto de vista intracelular, a elevação persistente de noradrenalina promove a ativação de receptores adrenérgicos α e β , ambos relevantes para a modulação cardiovascular. Entretanto, no contexto do miocárdio, os receptores β -adrenérgicos exercem papel central. Esses receptores pertencem à família dos receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e, classicamente, sinalizam por meio da proteína Gs, promovendo a ativação da adenilato ciclase, aumento da produção de AMPc e subsequente ativação da proteína quinase A (PKA). A ativação dessa via resulta em fosforilação de múltiplos alvos envolvidos no acoplamento excitação-contracção, levando ao aumento das principais variáveis cardíacas, conforme previamente demonstrado na figura 3 (PARREIRA *et al.*, 2020).

A partir do início dos anos 2000, entretanto, tornou-se evidente que a sinalização β -adrenérgica no coração apresenta elevada plasticidade. No contexto fisiológico, a proporção de receptores β_1 para β_2 é de 80:20, porém, em situações de estresse, ocorre o aumento na expressão de receptores β_2 , e essa proporção passa a ser de 60:40 (WANG, GARERI e ROCKMAN, 2018). Estudos demonstraram que, com o aumento na densidade de receptores β_2 (que ocorre principalmente em condições de estimulação prolongada e fosforilação sustentada do receptor), ocorrem um desacoplamento funcional da via Gs e o recrutamento da proteína Gi. Esse fenômeno, conhecido como “switch de acoplamento Gs-Gi”, tem sido interpretado como um mecanismo adaptativo destinado a limitar os efeitos deletérios da hiperativação adrenérgica crônica e a modular a progressão do dano cardíaco (DAAKA *et al.*, 1998;

XIAO *et al.*, 1999). Este próprio mecanismo endógeno, levanta a discussão sobre a capacidade da via Gi de proteger o coração.

2.3 Via Gi em cardiomiócitos:

A via de sinalização acoplada à proteína Gi desempenha um papel central na modulação da função cardíaca, atuando de forma funcionalmente oposta à sinalização mediada pela proteína Gs. Enquanto a ativação da via Gs promove efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos, a ativação da via Gi está classicamente associada a efeitos cardiodepressores e cardioprotetores, sendo particularmente relevante em condições de hiperatividade simpática (WETTSCHURECK e OFFERMANN, 2005).

No coração, as proteínas Gi podem ser ativadas por diferentes classes de GPCRs, incluindo os receptores de adenosina do tipo A1, receptores α 2-adrenérgicos, receptores de somatostatina e receptores opioides dos subtipos δ e κ (BRODDE *et al.*, 1992). No entanto, em condições fisiológicas, a principal via de ativação da Gi nos CMs ocorre por meio dos receptores muscarínicos do tipo M2, sensíveis à ACh liberada pelas terminações parassimpáticas do nervo vago. O eixo ACh–M2–Gi exerce papel fundamental no contrabalanceamento da atividade simpática cardíaca, sendo crucial para o controle fino da frequência cardíaca e, em menor grau, da contratilidade miocárdica. A ativação desse eixo resulta predominantemente em efeito cronotrópico negativo, mas também pode induzir efeito inotrópico negativo, especialmente em condições de estimulação colinérgica intensa ou em contextos patológicos específicos, uma vez que a inervação parassimpática também inerva os ventrículos.

O principal mecanismo intracelular associado à ativação da Gi, conforme ilustrado na Figura 3, envolve a inibição da adenilato ciclase pela subunidade α_i , levando à redução dos níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). A diminuição do cAMP resulta em menor ativação da proteína quinase A (PKA), reduzindo a fosforilação de múltiplos alvos envolvidos na cinética do Ca^{2+} , como os canais de cálcio do tipo L, o fosfolamban e os receptores de rianodina (RyR2). Como consequência, observa-se redução da entrada e da liberação intracelular de Ca^{2+} ,

culminando em diminuição da força contrátil e da frequência de disparo dos CMs (CAPOTE, MÉNDEZ PEREZ e LYMPEROPOULOS, 2015).

Além da ação da subunidade α_i , o dímero $\beta\gamma$ liberado após a ativação da proteína Gi desempenha papel funcional relevante ao ativar canais de potássio retificadores de entrada dependentes de proteína G (GIRK/Kir3.x). A ativação desses canais promove hiperpolarização da membrana celular, particularmente em células do nó sinoatrial, reduzindo a inclinação da fase 4 do potencial de ação e potencializando o efeito cronotrópico negativo da estimulação colinérgica (WANG, GARERI e ROCKMAN, 2018b). Dessa forma, a sinalização via Gi atua de maneira integrada na modulação da excitabilidade elétrica, do acoplamento excitação–contração e da homeostase cardíaca.

A proteína Gi é composta por diferentes isoformas, incluindo Gi1, Gi2 e Gi3. Embora todas apresentem caráter inibitório e sejam sensíveis à toxina pertussis, essas isoformas exibem diferenças relevantes, como a codificação por genes distintos (GNAI1, GNAI2 e GNAI3, respectivamente). No coração, a isoforma Gi2 é a mais prevalente e está associada aos principais efeitos autonômicos e cardioprotetores (MATSUDA *et al.*, 2000). Em contraste, as subunidades Gi1 e Gi3 apresentam menor expressão cardíaca e são consideradas, até o momento, menos relevantes do ponto de vista funcional, sendo necessários mais estudos para elucidar seus papéis específicos no tecido cardíaco (MATSUDA *et al.*, 2000). Estudos experimentais reforçam o papel cardioprotetor da Gi2, uma vez que seu nocaute em modelos de isquemia miocárdica resulta em aumento significativo da área de lesão. Curiosamente, o nocaute da isoforma Gi3 foi associado à redução do tamanho da área isquêmica (KÖHLER *et al.*, 2014). Na ausência de Gi3, observa-se aumento compensatório da expressão de Gi2, o que pode explicar esse efeito paradoxal, sugerindo que a maior disponibilidade de Gi2 seja suficiente para conferir proteção adicional ao miocárdio lesionado (KÖHLER *et al.*, 2014b).

2.4 Efeitos cardioprotetores atribuídos ao eixo ACh-M2-Gi

A via Gi é ativada no coração predominantemente pela ACh, Nesta frente, trabalhos do nosso grupo de pesquisa e da literatura corroboram a ideia de que a estimulação dos receptores muscarínicos cardíacos reduzem os efeitos deletérios da disfunção

cardíaca em modelos experimentais distintos, a saber: (i) Li *et al.*, (2004) demonstraram que a estimulação vagal aumenta a sobrevivência de ratos submetidos ao infarto por ligadura da artéria coronária; (ii) Zhang *et al.*, (2009), ao induzir IC através de um modelo de hiperestimulação ventricular observaram que a estimulação vagal crônica, atenua diversos efeitos deletérios advindos da IC como arritmias, diminuição da fração de ejeção, processo inflamatório cardíaco e fibrose tecidual, além de reduzir os níveis plasmáticos de noradrenalina, Ang II e proteína C reativa, marcadores clássicos da IC; (iii) Gavioli *et al.*, (2014); Lataro *et al.*, (2013); Li *et al.*, (2013) demonstraram que o tratamento com diferentes anti-colinesterásicos atenuou os efeitos deletérios e aumentava a sobrevivência de animais submetidos ao infarto do miocárdio; por fim (iv) Roy *et al.*, (2016) ao utilizarem modelos transgênicos de ganho de função colinérgica demonstraram proteção contra o remodelamento cardíaco induzido por Ang II.

Na clínica, estudos também apontam para um efeito cardioprotetor da ativação colinérgica e subsequente ativação da via Gi em humanos. (Nordström *et al.*, 2013) atribuíram o menor risco no desenvolvimento de eventos cardiovasculares em pacientes com Alzheimer tratados com anti-colinesterásicos. Na mesma linha, Schwartz *et al.*, (2008) ao aplicarem um marcapasso vagal sincronizado com a frequência cardíaca observaram melhora no volume sistólico e na qualidade de vida de pacientes com IC. Desta forma, podemos dizer que existe um consenso na literatura acerca do efeito cardioprotetor da ACh.

Além da tradicional ACh de origem neuronal, foi demonstrado por Kakinuma, Akiyama e Sato, (2009) e Rana *et al.*, (2010) que, assim como outros tipos celulares não neuronais, os CMs também possuem a maquinaria necessária para a síntese e secreção de ACh. Nesta linha, nosso grupo também tem contribuído com diversos estudos, que caracterizaram a maquinaria colinérgica não neuronal. Rocha-Resende *et al.*, (2012) mostraram a importância desta sinalização na proteção contra a hipertrofia cardíaca induzida por fenilefrina e ISO *in vitro* (ROCHA-RESENDE *et al.*, 2012), na proteção contra o remodelamento cardíaco induzido por Ang in vivo II (ROY *et al.*, 2016), além de desempenhar um papel crucial na manutenção da homeostase cardíaca basal após estímulos fisiológicos e estressores (ROY *et al.*, 2013).

De fato, os receptores M2 parecem exercer um importante mecanismo protetor cardíaco. Estudos demonstram que durante a insuficiência cardíaca, ocorre um aumento acentuado na densidade de receptores muscarínicos do tipo 2 no coração, como um mecanismo adaptivo frente ao estresse (GULUDEK, Le *et al.*, 1997). Por outro lado, durante a senescência, ocorre uma regulação negativa na densidade dos receptores M2, bem como o desacoplamento dos receptores M2 da via Gi (processo por vezes chamado de “uncoupling with age”) fazendo com que o coração perca eficiência do tônus parassimpático, tornando-o mais suscetível a arritmias, disfunções e remodelamento associado a senescência. (BRODDE *et al.*, 1998).

2.5 Modelo DREADD-Gi cardíaco:

Devido à alta versatilidade da sinalização por GPCRs, foi desenvolvido em 2007 um modelo de quimiogenética denominado de *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*, ou simplesmente *DREADD* (ARMBRUSTER *et al.*, 2007). Este modelo consiste na produção de um receptor mutado que pode ativar vias de sinalização Gs, Gq e Gi. Estes receptores mutados, foram desenvolvidos a partir de receptores muscarínicos humanos M1, M3 e M5 (acoplados a Gq ou Gs) e M2 e M4 (acoplados a Gi), que possuem como principal característica a capacidade de responder a uma droga exógena, que não é sintetizada pelo organismo, a Clozapina-N-óxido (CNO). Posteriormente, com o estudo de Zhu *et al.*, (2016), o modelo foi refinado e passou a ser dependente da enzima Cre recombinase, garantindo uma maior seletividade em tempo e local de expressão. Outro progresso foi a adição na sequência genética que codifica para o DREADD juntamente com a sequência correspondente à proteína m-citrina, uma proteína autofluorescente, que permite a visualização e identificação das células que expressam o receptor mutado. Os *DREADDs* são identificados pela subunidade à qual estão acoplados. Utilizaremos neste estudo animais denominados Dredd hM4Di, da sigla do inglês para: **h**–human (origem do receptor); **M4**–muscarinic 4 (base usada na construção do receptor mutante); **D**–DREADD; **i** (subunidade ao qual o *DREADD* se acopla), sendo, portanto, um modelo *Dredd* que está acoplado à subunidade Gi (ZHU *et al.*, 2016). Esses receptores não podem ser estimulados por ligantes endógenos, sendo sensíveis a ligantes sintéticos como o CNO. O modelo DREADD é representado na Figura 4. De forma resumida, a via Gi cardíaca é ativada de forma fisiológica pelo eixo ACh-M2-Gi,

enquanto no nosso modelo DREADD, a ativação dessa via ocorre via CNO-hM4Di-Gi de forma temporal e tecido específica.

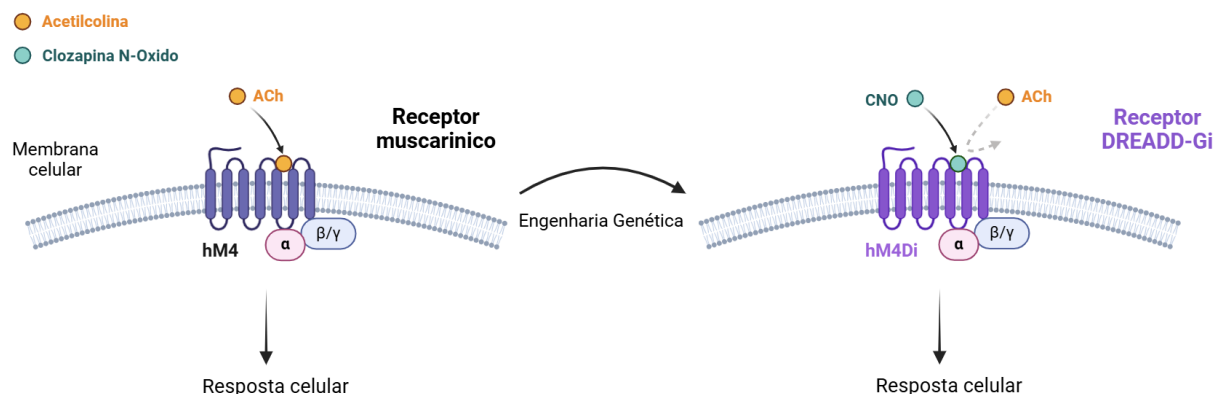


Figura 4: Engenharia genética do receptor muscarínico hM4Di: Esquema ilustrativo comparando o receptor muscarínico endógeno e o receptor mutado DREADD, este último acoplado à proteína Gi (hM4Di) e gerado a partir de engenharia genética. À esquerda, a acetilcolina (ACh) ativa o receptor muscarínico M4 nativo na membrana celular, promovendo sinalização intracelular mediada pela subunidade $G_{\alpha i}$ e pelo dímero $G_{\beta\gamma}$, culminando em resposta celular. À direita, após modificação genética, o receptor hM4Di perde responsividade à ACh e passa a ser seletivamente ativado pela clozapina-N-óxido (CNO), permitindo o controle farmacogenético específico da sinalização Gi e da resposta celular associada. O cruzamento do camundongo DREADD-Gi com o camundongo Myh6-Cre possibilita a expressão do receptor mutado apenas em cardiomiócitos.

Conforme descrito, a via de sinalização acoplada à proteína Gi configura-se como uma via altamente versátil, com reconhecido potencial cardioprotetor. Entretanto, a contribuição específica dos cardiomiócitos para esses efeitos ainda não foi claramente estabelecida, uma vez que a maioria dos estudos previamente revisados promove a ativação da atividade colinérgica de maneira sistêmica e não célula-específica. Considerando que, mesmo no contexto cardíaco, a ACh pode atuar sobre distintos tipos celulares, desencadeando respostas celulares heterogêneas, os mecanismos responsáveis por seus efeitos benéficos no coração permanecem pouco elucidados, particularmente no que se refere às vias de sinalização intracelular ativadas a jusante da proteína Gi nos CMs. Nesse sentido, o presente estudo aborda essa lacuna do conhecimento por meio do emprego de modelo transgênico de última geração, que permite a ativação seletiva e célula-específica da via Gi em CMs. Essa estratégia experimental possibilita entender a contribuição de um único tipo celular na proteção cardíaca.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL (Capítulo I)

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por aproximadamente 17,5 milhões de mortes por ano, correspondendo a cerca de 31% de todos os óbitos no mundo (OMS, 2016). No Brasil, estima-se que aproximadamente 300 mil pessoas morram anualmente em decorrência de DCV. De acordo com projeções da Organização Mundial da Saúde, esse cenário tende a se agravar, com a expectativa de que, até o ano de 2030, o número de mortes por DCV atinja cerca de 23,6 milhões por ano (OMS, 2021). Esses números elevados consolidam as DCV como um dos principais problemas de saúde pública em escala global. Apenas no Brasil, em 2015, os custos diretos relacionados a consultas, internações, cirurgias e transplantes associados às DCV ultrapassaram 5 bilhões de reais (SIQUEIRA, SIQUEIRA-FILHO e LAND, 2017)

As patologias cardiovasculares frequentemente evoluem para insuficiência cardíaca (IC), condição caracterizada pela incapacidade do coração de bombear sangue de forma eficiente, comprometendo a manutenção adequada da perfusão tecidual (LYMPEROPOULOS, RENGO e KOCH, 2013). Diante de um insulto inicial, o coração desencadeia um processo de remodelamento adaptativo, cujo objetivo primário é compensar a perda de tecido viável. Essa fase inicial é marcada, em grande parte, por um aumento da atividade simpática cardíaca, que visa restaurar o débito cardíaco por meio da elevação da força de contração, da frequência cardíaca, além de alterações no relaxamento ventricular e na velocidade de condução elétrica (efeito dromotrópico) (FRANGOIANNIS, 2015 e GUYTON, 2017)

A progressão da IC pode seguir dois desfechos principais: (i) a hiperativação simpática é suficiente para restaurar parcialmente a fração de ejeção, resultando em uma fase compensada da doença; ou (ii) mesmo na presença de intensa ativação simpática, a perfusão tecidual adequada não é restabelecida, levando à progressão da disfunção cardíaca. É importante destacar que, independentemente do desfecho inicial, a ativação simpática crônica exerce efeitos deletérios significativos sobre o tecido cardíaco, incluindo hipertrofia patológica, morte de CMs, fibrose intersticial e substitutiva, ativação inflamatória persistente e aumento da rigidez vascular. Grande parte desses efeitos adversos está associada à estimulação prolongada de receptores

acoplados à proteína Gs (BURCHFIELD, XIE e HILL, 2013 e LYMPEROPOULOS, RENGO e KOCH, 2013)

Nesse contexto, a via de sinalização acoplada à proteína Gi emerge como uma alternativa funcionalmente distinta e potencialmente cardioprotetora. Evidências experimentais indicam que a ativação colinérgica, particularmente por meio do eixo acetilcolina–receptor muscarínico M2–proteína Gi (ACh-M2-Gi), exerce efeitos benéficos sobre o coração. Entretanto, o papel específico do CM como mediador central dessa cardioproteção permanece pouco esclarecido, uma vez que a maioria dos estudos disponíveis utiliza estratégias que aumentam a atividade colinérgica de forma sistêmica e não célula-específica. Considerando que, mesmo no ambiente cardíaco, a ACh pode atuar sobre diferentes tipos celulares incluindo macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e CMs desencadeando respostas celulares distintas e, por vezes, opostas (VANG *et al.*, 2021 e WESSLER e KIRKPATRICK, 2008). Os mecanismos moleculares responsáveis por seus efeitos cardioprotetores permanecem incompletamente compreendidos. Diante desse cenário, o presente trabalho busca preencher essa lacuna da literatura por meio do emprego de modelo transgênico de última geração, que permite a ativação seletiva e específica da via Gi exclusivamente em CMs.

Nossa hipótese central é que os CMs atuam como elemento-chave na orquestração da cardioproteção induzida pelo eixo ACh–M2–Gi, modulando diretamente processos fundamentais do remodelamento cardíaco, como sobrevivência celular, controle do metabolismo, resposta ao estresse, inflamação e comunicação parácrina com outras populações celulares do miocárdio. Dessa forma, propomos que a ativação seletiva da via Gi nos CMs é suficiente para desencadear um programa cardioprotetor capaz de atenuar os efeitos deletérios da hiperativação simpática crônica e limitar a progressão da insuficiência cardíaca.

4. OBJETIVOS (Capítulo I)

4.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar o impacto da ativação da via Gi seletivamente no cardiomiócito em condição patológica induzida pela hiperestimulação adrenérgica sistêmica (Figura 5)

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- A) Caracterizar o modelo DREADD-Gi cardíaco:
- B) Investigar o impacto da ativação da via Gi no CM na prevenção do remodelamento cardíaco induzido pela hiperestimulação adrenérgica.
- C) Investigar o impacto da ativação da via Gi no CM na reversão do remodelamento cardíaco já instalado.

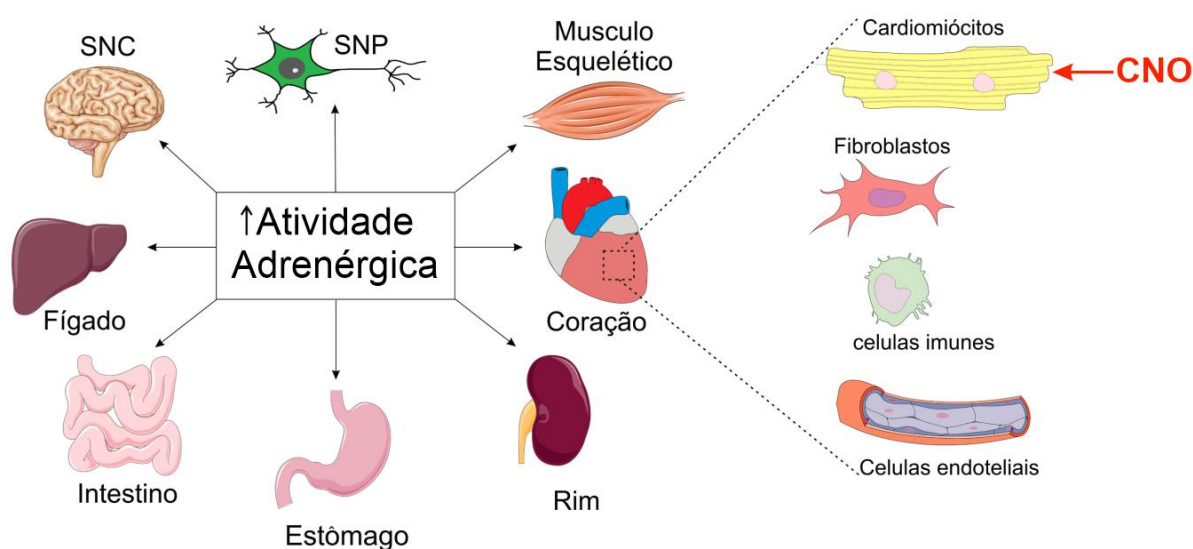


Figura 5: Representação do modelo de ativação adrenérgica sistêmica comparado ao nosso modelo DREADD, ativado por CNO, de ativação Gi-cardiomiócito-específica. O diagrama ilustra o a capacidade do ISO de aumentar a atividade colinérgica de forma sistêmica. Em destaque, a seta vermelha indica o CNO como agente de ativação seletiva, direcionando a ativação da via Gi especificamente nos cardiomiócitos. O detalhamento à direita enfatiza tipos celulares presentes no microambiente cardíaco, que são alvos da ação adrenérgica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS (Capítulo I)

5.1 Animais: Camundongos R26-LSL-hM4Di-DREADD (generosamente doados por Bryan Roth (University of North Carolina) e Ute Hochgeschwender (Central Michigan University), estirpe JAX; RRID:IMSR_JAX:026219, foram cruzados com camundongos Myh6-CRE (estirpe JAX; RRID:IMSR_JAX:011038) para gerar os camundongos Myh6-Cre/hM4Di. Isto permite a expressão do receptor hM4Di restritamente aos CMs (uma variante do receptor muscarínico M4 humano) que responde ao CNO, mas não à ACh ou qualquer outro ligante endógeno. Para nossos experimentos, utilizamos camundongos machos e fêmeas com 8-10 semanas de idade. Os camundongos foram alojados no biotério da UFMG sob condições de temperatura controlada (25-28°C) e um ciclo claro-escuro de 12/12h. Os companheiros de ninhada Myh6-CRE e hM4Di foram utilizados como controles nos experimentos. Os camundongos foram tratados e estudados à medida que foram ficando disponíveis, e os resultados de todas as experiências foram compilados para análise. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da UFMG (CEUA:102/2022 e 63/2025) e da University of Western Ontario (2020-162). O estudo foi conduzido de acordo com o National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

5.2 Genotipagem: A genotipagem dos animais provenientes dos cruzamentos supracitados foi realizada a partir de DNA genômico extraído de fragmentos da orelha. A identificação dos genótipos foi conduzida por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando um termociclador e oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região mutada. A presença da dupla mutação (DREADD-Gi e Cre) foi confirmada pela detecção de fragmentos amplificados de aproximadamente 200 pb e 700 pb, respectivamente. A amplificação de um fragmento de aproximadamente 300 pb foi utilizada como indicativo de animais do tipo selvagem (WT) (Figura 6). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão descritas a seguir:

DREADD Forward: 5' CGAAGTTATTAGGTCCCTCGAC 3';

DREADD Reverse: 5' TCATAGCGATTGTGGGATGA 3';

WT Forward: 5' AAGGGACCTGCAGTGGAGTA 3';

WT reverse: 5' CCGAAAATCTGTGGGAAGTC 3'.

CRE Forward: 5' GTCCAATTTACTGACCGTACACC 3'

CRE Reverse: 5' GTTATTCGGATCATCAGCTACACC 3'

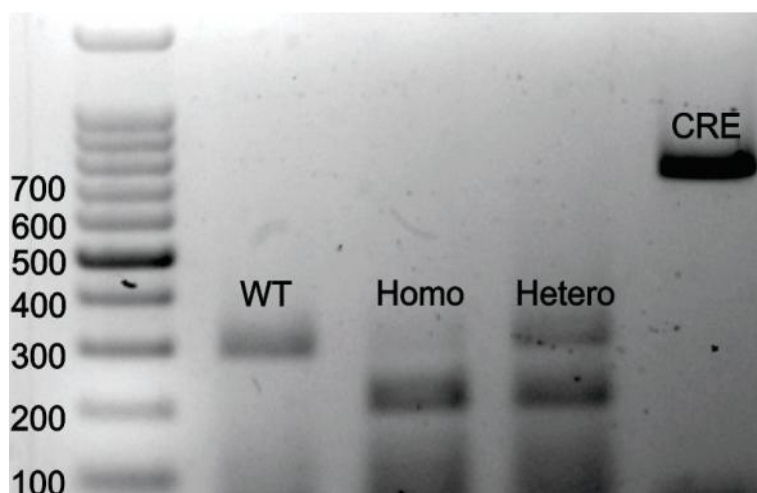


Figura 6: Bandas obtidas a partir da genotipagem de animais Myh6-Cre/hM4Di: Revelação do gel de agarose com amplicons de 200pb identificando animais DREADD homozigotos (+/+), 300pb identificando animais WT; 200+300pb identificando animais heterozigotos (+/-) e 700pb identificando os animais Cre+. Após separação em gel de agarose 1% em TAE 1x, a presença das bandas foram reveladas no equipamento ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager por estimulação ultravioleta.

5.3 Modelo de isoproterenol e tratamento de camundongos com CNO: Para a indução do modelo hiperadrenérgico, camundongos foram tratados diariamente com (-/-) isoproterenol (ISO, Sigma, St. Louis, MO, EUA) por 7 dias (25 mg/kg/dia, via intraperitoneal). O tratamento com CNO foi realizado em duas condições: 1) Protocolo de Prevenção: Camundongos foram tratados diariamente com CNO (0,5 mg/kg/dia, via intraperitoneal) concomitantemente à injeção de ISO por 7 dias (Figura 14B). Como controle, grupos separados de camundongos receberam CNO isoladamente (0,5 mg/kg/dia) ou injeção de solução salina pelo mesmo período. Para avaliar a capacidade de CM-Gi⁺ em reverter danos cardíacos preestabelecidos e determinar o momento ideal para a intervenção com CNO, os efeitos temporais do tratamento com ISO no coração foram caracterizados por meio da administração de 1, 2 ou 3 doses diárias de ISO (25 mg/kg/dia, via intraperitoneal) em camundongos Myh6-Cre/hM4Di (Figura 18A). Os corações foram coletados no quarto dia e analisados. Vale ressaltar que em todos os experimentos realizamos um comparativo inicial para avaliarmos se havia diferença na resposta ao CNO e nos efeitos observados em animais homo x heterozigotos, machos x fêmeas. Nenhuma diferença foi detectada.

2) Protocolo de Tratamento: Uma vez identificado que 3 doses de ISO foram suficientes para estabelecer dano cardíaco, os camundongos foram submetidos ao segundo protocolo para avaliar o potencial terapêutico da ativação da sinalização Gi nos CMs (Figura 19A), que incluiu sete doses de ISO e quatro doses de CNO. O tratamento com CNO foi iniciado no quarto dia do regime de ISO (7 dias no total) e continuado até o final do protocolo. A eutanásia foi realizada por meio de deslocamento cervical.

5.4 Isolamento de miócitos ventriculares: Os CMs foram isolados seguindo um método previamente descrito (GUATIMOSIM *et al.*, 2001). Em resumo, os corações foram removidos cirurgicamente e perfundidos retrogradamente por aproximadamente 13 minutos, utilizando uma solução de Tyrode modificada, desprovida de íons Ca^{2+} e contendo colagenase tipo 2 (1 mg/mL). Em seguida, foram utilizados processos mecânicos de digestão e filtração nas câmaras ventriculares. Posteriormente, foi realizada a reintrodução gradual de íons Ca^{2+} extracelulares, atingindo uma concentração final de 500 $\mu\text{mol/L}$. Após o processo de isolamento, os miócitos foram mantidos em solução de Tyrode (em mmol/L: 140 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl_2 , 1,8 CaCl_2 , 10 glicose e 5 HEPES; pH 7,4 ajustado com NaOH). Os CMs ventriculares isolados foram então utilizados para medições dos ciclos de contração-relaxamento e análises morfométricas. As células foram isoladas de camundongos Myh6-Cre/hM4Di, Myh6-CRE e hM4Di.

5.5 Aquisição da contratilidade: Para adquirir a contratilidade, os miócitos ventriculares foram expostos a N-óxido-de clozapina (CNO, 100 nmol/L, Abcam, catálogo #ab141704), acetilcolina (ACh, 100 nmol/L, Sigma-Aldrich #A5751), isoproterenol (ISO, 50 nmol/L, Sigma-Aldrich #16504), ou uma combinação de ISO+CNO durante 15 min. Para medições contrácteis, as células foram sujeitas a estimulação eléctrica utilizando eléctrodos de platina, com uma frequência de impulsos de 1 Hz e uma tensão de 30V, cada impulso com uma duração de 5 milissegundos. Foi utilizada uma câmara CMOS digital de alta velocidade (SILICON VIDEO 642 M, EPIX, Inc) para captar imagens das células, funcionando a 200 imagens por segundo. As imagens tinham uma resolução de 640x480 pixels, um tamanho de pixel de 0,25 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ e uma profundidade de 8 bits. Os dados de contratilidade celular foram obtidos de acordo com um protocolo previamente descrito (Scalzo *et al.*, 2022). O processamento e a análise das imagens foram efetuados com o software CONTRACTIONWAVE, utilizando o método de fluxo óptico denso (Scalzo *et al.*, 2021).

5.6 Morfometria: Para avaliar a área celular dos CMs isolados e a área de secção transversal dos miócitos nas amostras de tecido, utilizamos o software de análise ImageJ versão 1.8.0. (Schneider, Rasband e Eliceiri, 2012).

5.7 Avaliação da lesão miocárdica: A captação do corante azul de Evans (Evans Blue Dye-EBD) (Sigma-Aldrich catálogo #E2129, 10 mg/Kg; IP) foi usada para avaliar o nível de lesão miocárdica como descrito anteriormente. Os camundongos receberam EBD 16-18 horas antes de cada coleta do coração. Subsequentemente, os corações foram colhidos e processados conforme descrito na secção 2.7. Foram tiradas fotografias com uma ampliação de 20x e analisadas com o programa ImageJ (versão 1.8.0). Os dados são apresentados como a percentagem de área corada por campo.

5.8 Imunofluorescência: A imunofluorescência de cortes cardíacos foi realizada como previamente descrito por nós (ROCHA-RESENDE *et al.*, 2019). As secções foram coradas com anticorpos primários para CD68 (macrófagos) e α -SMA (miofibroblastos), seguidas de incubação com anticorpos secundários conjugados (ver Tabela 1 para detalhes). Para determinar a viabilidade celular, utilizamos o kit live-dead (Cat. Invitrogen #L3224) e incubamos CMs recém-isolados durante 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, fixamos as células em paraformaldeído a 4% durante 15 minutos. A aquisição de imagens foi realizada no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando o microscópio confocal LSM 880 (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) com objetivas de 20x ou 40x. O número total de macrófagos CD68+DAPI+, fibroblastos α -SMA+DAPI+ e a análise da viabilidade celular foram feitos com o software ZEN 3.6 blue edition.

5.9 Histologia: Os corações foram perfundidos com uma solução de 1 ml de KCl a 10% através do ventrículo, seguida de fixação em paraformaldeído a 4% durante 48 horas. Posteriormente, foram armazenados em álcool a 70% durante 24 horas. Na sequência, os corações foram incluídos em parafina e cortados em secções de 3 μ m de espessura. Estas secções foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As imagens foram obtidas por meio de um scan panorâmico MIDI II (3D HISTECH) e uma objetiva Zeiss (20x/0,8 NA) localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) da Universidade Federal de Minas Gerais

5.10 PCR em tempo real: O RNA total foi extraído com o reagente TRI de acordo com o protocolo do fabricante. O pellet de RNA foi ressuspendido em água tratada com DEPC e tratado com o kit Turbo DNA-free. 1 μ g de RNA tratado com DNase foi

transcrito reversamente para cDNA utilizando a transcriptase reversa M-MLV. A qRT-PCR foi efetuada utilizando o iTaq Universal SYBR Green Supermix e o sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems). O gene de referência utilizado foi o S26. As sequências dos *primers* utilizados foram as seguintes: *COL3A1* (forward) 5'-GGTGGTTTTTCAGTTCAGCTATGG-3'; *COL3A1* (reverse) 5'-CTGGAAAGAAGTCTGAGGAATGC-3'; *COL1A1* (forward) 5'-CCTCACCTACAGCACCCCTTGTG-3'; e (inverso) 5'-GATGACTGTCTTGCCCCAAGTT-3'; S26 (forward) 5'-CGTGCTTCCCAAGCTCTATGT-3'; e reverse: 5'-CGATTCCTGACAACCTTGCTA-3'. Os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5.11 Eletrocardiograma: Os experimentos de eletrocardiograma foram realizados como descrito anteriormente (SILVA *et al.*, 2021). Os animais foram anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio (5% para indução e 1,5-2% para manutenção) e instrumentados com eletrodos subcutâneos para registro do eletrocardiograma (ECG). Os eletrodos foram exteriorizados na região interescapular. Após 48 horas de recuperação cirúrgica, os eletrodos foram ligados a um amplificador bioelétrico (Animal BioAmp FE136; ADInstruments), acoplado a uma interface analógico-digital (PowerLab, ADInstruments) e amostrados (4 kHz) num IBM/PC utilizando o software LabChart (ADInstruments, Dunedin, NZ). Os registros foram efetuados de forma consistente à mesma hora do dia para evitar influências circadianas nos resultados. Durante os registros, os animais estavam acordados e podiam movimentar-se livremente. Após o período de estabilização da FC, os animais foram tratados com CNO (0,5 mg/kg, I.P; ver Figura 11, 0 min), e o registro foi mantido durante 90 minutos. Os experimentos de ECG foram realizados no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

5.12 Ecocardiografia: A função cardíaca sistólica e diastólica foi determinada de forma não invasiva por ecocardiografia transtorácica, conforme descrito anteriormente (Omoto *et al.*, 2021). Os camundongos foram anestesiados (1,5% de isoflurano), utilizando-se um sistema de imagem de alta resolução Vevo 2100 (FAPESP 2009/54010-1) equipado com um cabeçote de varredura de 21 MHz (VisualSonics, Toronto, Canadá). As aquisições foram realizadas nos modos movimento (M) e brilho (B) do eixo curto paraesternal. As imagens foram analisadas com o software

VisualSonics Cardiac Measurements. Para cada parâmetro, foram realizadas medidas de três a seis ciclos cardíacos diferentes, sendo calculados os valores médios. A espessura do septo interventricular (SIV) e o diâmetro interno do ventrículo esquerdo (DVE) foram medidos em sístole e diástole a partir de cortes no eixo longo da abordagem paraesternal e a fração de ejeção (FE) foi calculada. Os experimentos ecocardiográficos foram realizados no Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

5.13 Citometria de fluxo: O tecido cardíaco foi digerido e preparado para experiências de citometria de fluxo como previamente descrito por nós (ROCHA-RESENDE *et al.*, 2019). As suspensões de células únicas cardíacas foram coradas com anticorpos (ver Tabela 2) durante 30 minutos a 4 °C. Os controles de compensação foram gerados utilizando UltraComp ebeads (Invitrogen; catálogo 01-2222-42). A estratégia de seleção é apresentada na figura 24 A. Os dados foram adquiridos em Becton Dickinson LSR Fortessa no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO), Faculdade de Farmácia, UFMG, e analisados usando o software FlowJo v.X.0.7.

5.14 SDS-PAGE e imunoblotting: As proteínas extraídas do tecido cardíaco foram solubilizadas em tampão de Laemmli, separadas em géis de poliacrilamida a 7,5% e transferidas para membranas de PVDF, conforme descrito previamente (MARTINS, BAILEY e GIRARDI, 2020). As membranas foram bloqueadas por 1 hora em solução de Blotto (5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween 20 em PBS, pH 7,4), seguida de incubação overnight com anticorpo Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrate (Cell Signaling #9621L; RRID: AB_330304), diluído no mesmo tampão de bloqueio. Após lavagens com Blotto, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários conjugados à peroxidase de raiz-forte (HRP) (diluição 1:2.000 em Blotto). As lavagens finais consistiram em cinco lavagens em Blotto e duas em PBS (pH 7,4). A detecção do sinal foi realizada utilizando um sistema de quimioluminescência aprimorada (ECL) (GE Healthcare®). A visualização das bandas foi realizada utilizando o ImageScanner III (GE Healthcare®), e a análise foi conduzida de forma cega por meio do software Scion Image (Scion®, Frederick, MD).

5.15 Análise estatística: Os dados são apresentados como média \pm SEM, derivados de pelo menos três experimentos independentes. As análises estatísticas entre os

grupos foram realizadas da seguinte forma: o teste de Shapiro-Wilk foi inicialmente aplicado para avaliar a normalidade. Para dados normais, foi usado um teste t de Student não pareado, ANOVA unidirecional com teste post hoc de Tukey ou ANOVA bidirecional seguido pelo teste post hoc de Šidák. Para conjuntos de dados que não atenderam aos critérios de normalidade, foi empregado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U ou Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post hoc de Games-Howell quando apropriado. O nível de significância foi definido em $p < 0,05$ para todas as análises. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism, versão 10.1.2.

Tabela 1: Anticorpos e sondas utilizados nos experimentos de imunofluorescência e Western Blot

Anticorpos e sondas	Clone	Fabricante	Número de catálogo	Diluição	RRID
CD68	ED1	Biorad	MCA341R	1:300	AB_2291300
α SMA	1A4	Invitrogen	MA1 06110	1:200	AB_557419
WGA	_____	Thermo	W32464	1:200	_____
Ki67	SolA15	Invitrogen	14-5698-82	1:80	AB_10854564
α Actinina	EA-53	Sigma-Aldrich	A7811	1:400	AB_476766
DAPI	_____	Thermo	D3571	1:500	_____
Evans Blue	_____	Sigma-Aldrich	E2129	10mg/kg/IP	_____
Live-Dead	_____	Invitrogen	L3224	1:1000	_____
Anticorpos secundários	Clone	Fabricante	Número de catálogo	Diluição	RRID

Alexa Fluor 488 (Anti-Rabbit)	—	Invitrogen	710369	1:1000	AB_2532697
Alexa Fluor 488 (Anti-Rat)	—	Invitrogen	11006	1:1000	AB_2534074
Alexa Fluor 488 (Anti-mouse)	—	Invitrogen	A11001	1:1000	AB_10077726
Western Blot					
Phospho-(Ser/Thr) PKA substrate	—	Cell Signaling	9621L	1:1000	AB_330304
Donkey Anti-Rabbit IgG	—	Jackson ImmunoResearch	711-035-152	1:2000	AB_10015282

Tabela 2: Lista de anticorpos utilizados para experimentos de citometria de fluxo.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Número de catálogo	Diluição	RRID
CD45/PerCP-Cy5	30-F11	BioLegend	103132	1:200	AB_2291300
Ly6G/FITC	1A8	BioLegend	127606	1:200	AB_1236494
CD64/PE	X54-5/7.1	BioLegend	139304	1:200	AB_10613467
CCR2/BV421	SA203 G11	BioLegend	150605	1:200	AB_2872424
MHC-II/APC-Cy7	M5/114 .15.2	BioLegend	107628	1:200	AB_2069377

6 RESULTADOS (Capítulo I)

6.1 Caracterização do modelo Myh6-Cre/hM4Di:

Neste trabalho, nós desenvolvemos pela primeira vez um modelo que expressa o receptor DREADD-Gi nos CMs (Myh6-hM4Di). Embora o receptor DREADD-Gq cardíaco já tenha sido utilizado por Kaiser *et al.*, (2019) através do promotor MCK (Muscle Creatine Kinase), utilizamos neste trabalho um promotor ainda mais específico, o Myh6. Para isso, cruzamos animais Myh6-CRE com animais hM4Di. Esse cruzamento permite que a enzima CRE, sob o controle do promotor Myh6 (específico para CMs), clive os sítios lox-P, removendo o códon de parada que impedia a transcrição do receptor DREADD-Gi. Com a remoção desse códon de parada, o receptor DREADD-Gi é expresso exclusivamente nos CMs (Figura 7A). Acoplada à sequência genética do receptor DREADD, encontramos a proteína repórter mCitrina, uma proteína autofluorescente, que nos permite identificar CMs que expressam o receptor (Figura 7B). Devido à expressão da mCitrina, neste trabalho representamos graficamente os CMs Myh6-Cre/hM4Di em amarelo e os CMs sem mutação em rosa.

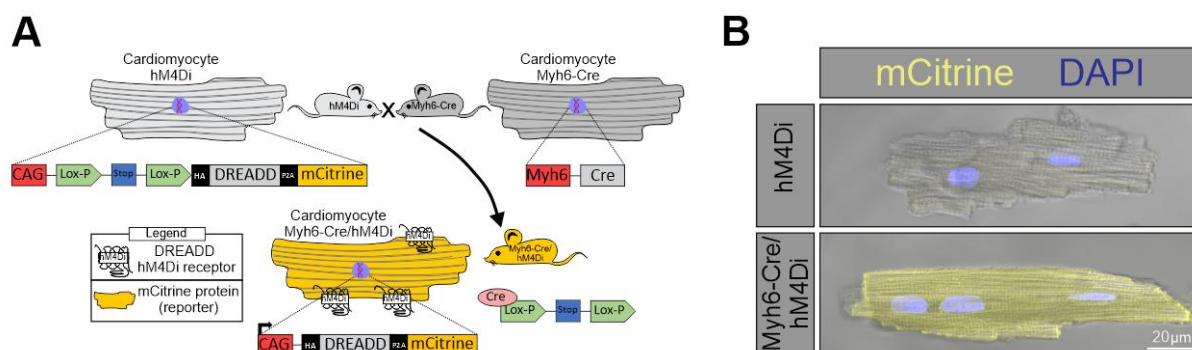


Figura 7: Representação esquemática do modelo Myh6-Cre/hM4Di e expressão direcionada do DREADD-Gi em cardiomiócitos. A) Visão geral da metodologia utilizada para a geração do camundongo transgênico Myh6-Cre/hM4Di. **B)** Imagem representativa mostra cardiomiócitos ventriculares obtidos de camundongos hM4Di e Myh6-Cre/hM4Di. As células que expressam o receptor DREADD são identificadas pela presença do repórter mCitrina (amarelo) no modelo Myh6-Cre/hM4Di. Barra de escala = 20 μm .

Para confirmarmos a expressão do receptor hM4Di seletivamente nos CMs, avaliamos a fluorescência da mCitrina em fatias cardíacas de camundongos Myh6-Cre/hM4Di. Como mostrado na Figura 8, a expressão de mCitrina em camundongos Myh6-Cre/hM4Di foi observada apenas em CMs, sendo esta ausente em coronárias ou células que compõem a matriz extracelular. Como comparação, apresentamos

imagens de cortes cardíacos de camundongos hM4Di e Myh6-CRE, nos quais a recombinação não ocorre e, conseqüentemente, a mCitrina não é expressa.

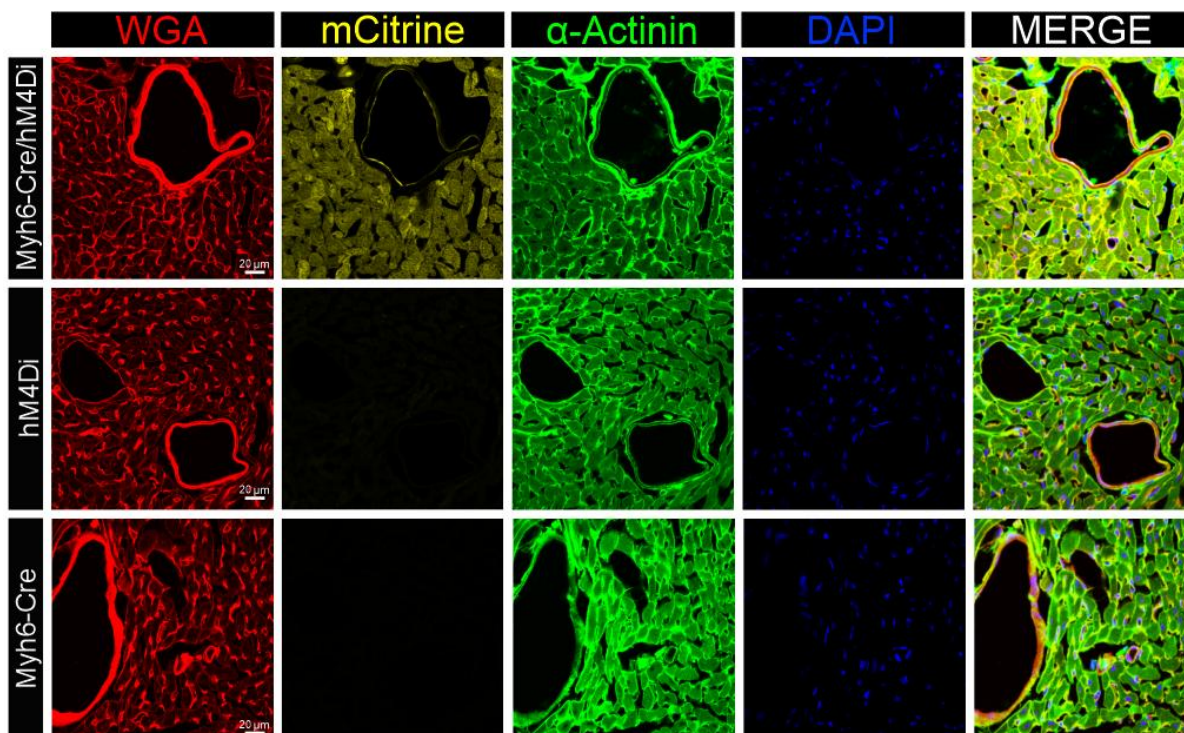


Figura 8: A expressão de mCitrina é observada em cardiomiócitos de camundongos Myh6-Cre/hM4Di. Cortes cardíacos provenientes de camundongos Myh6-Cre/hM4Di e dos seus irmãos de ninhada Myh6-CRE e hM4Di foram corados com WGA (vermelho), anticorpo anti- α -actinina (verde) e DAPI (azul). A fluorescência da mCitrina foi observada exclusivamente no coração dos camundongos Myh6-Cre/hM4Di. Sua expressão era restrita aos cardiomiócitos e estava ausente das coronárias e das células presentes no espaço extracelular.

Por se tratar de um modelo inédito na literatura, nosso próximo passo foi testar a funcionalidade e seletividade do modelo *in vitro*. Para isso, isolamos CMs de animais Myh6-Cre/hM4Di e os incubamos *in vitro* com CNO para avaliar o encurtamento celular considerando que a ativação da via Gi é conhecida por reduzir a contratilidade dos CMs. As imagens representativas obtidas de CMs com vetores espaciais adquiridos durante um ciclo de contração-relaxamento são apresentadas na Figura 9 A. A ACh foi utilizada como controle positivo para a redução da contratilidade. Como apresentado na Figura 9B, tanto o CNO quanto a ACh foram eficientes para reduzir a área de encurtamento dos CMs isolados, por meio da interação com receptores diferentes (hM4Di e M2, respectivamente). Esse resultado demonstra a funcionalidade do nosso modelo e sugere que a expressão do receptor mutante não altera a funcionalidade basal da via Gi (ativada pela ACh mediada pelo receptor M2),

indicando que, na ausência de CNO, os CMs mutantes apresentam comportamento contrátil semelhante ao de CMs controle.

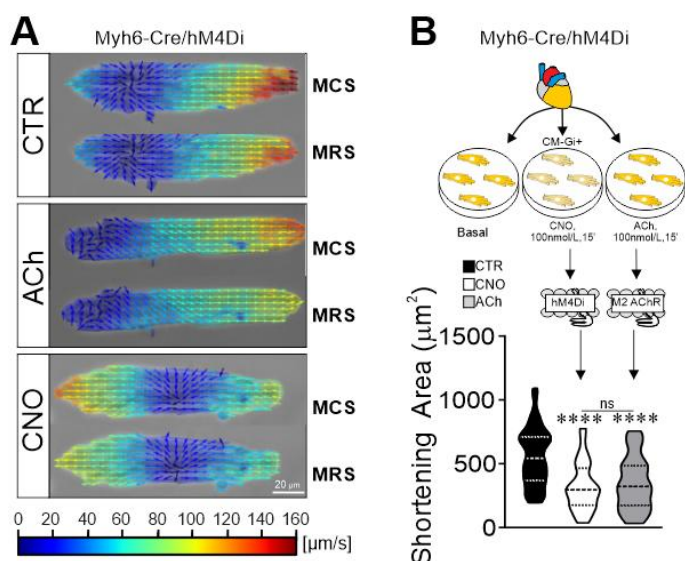


Figura 9: Tratamento com CNO reduz a contratilidade de CMs-Gi+. **A)** Imagens representativas dos vetores de movimento obtidos durante a velocidade máxima de contração (MCS) e de relaxamento (MRS) de CMs ventriculares Myh6-Cre/hM4Di em condição basal (controle, CTR) ou após tratamento com ACh ou CNO. Barra de escala = 20 µm. **B)** Painel superior: esquema do tratamento com ACh e CNO em CMs ventriculares isolados de camundongos Myh6-Cre/hM4Di. Painel inferior: gráfico do tipo violino mostrando a redução da área de encurtamento dos CMs induzida por CNO, mimetizando o efeito da ACh (controle positivo). N=40–42 células /3 corações por grupo. Linhas tracejadas grossas e finas nos gráficos do tipo violino indicam, respectivamente, as medianas e os percentis 25 e 75. As comparações estatísticas foram realizadas por One Way-ANOVA seguida do teste de Tukey. ns= não significativo, **** p<0.0001 vs CTR.

respectivamente, as medianas e os percentis 25 e 75. As comparações estatísticas foram realizadas por One Way-ANOVA seguida do teste de Tukey. ns= não significativo, **** p<0.0001 vs CTR.

No cardiomiócito a ativação da via Gi é classicamente conhecida por antagonizar os efeitos da ativação adrenérgica (CAPOTE, MENDEZ PEREZ e LYMPEROPOULOS, 2015). Dessa forma, do ponto de vista mecanístico, avaliamos a ativação da via Gi em nível intracelular por meio da análise da fosforilação de substratos da PKA, utilizando Western blot (Figura 10). Conforme esperado, o tratamento com CNO preveniu o aumento da fosforilação desses alvos induzido, *in vitro*, pelo tratamento com ISO (Figura 10C). Esse efeito é consistente com a inibição da adenilato ciclase mediada por proteínas Gi, resultando na diminuição dos níveis intracelulares de AMPc e, conseqüentemente, na atenuação da atividade da PKA. Além disso, o tratamento *in vivo* por 7 dias de camundongos Myh6-Cre/hM4Di com CNO, induziu a redução da fosforilação de alvos da PKA (Figura 10D-F). Em conjunto, esses dados fornecem evidência molecular direta de que o CNO foi capaz de ativar vias classicamente ativadas pela sinalização Gi, corroborando mais uma vez a funcionalidade do receptor hM4Di no modelo experimental.

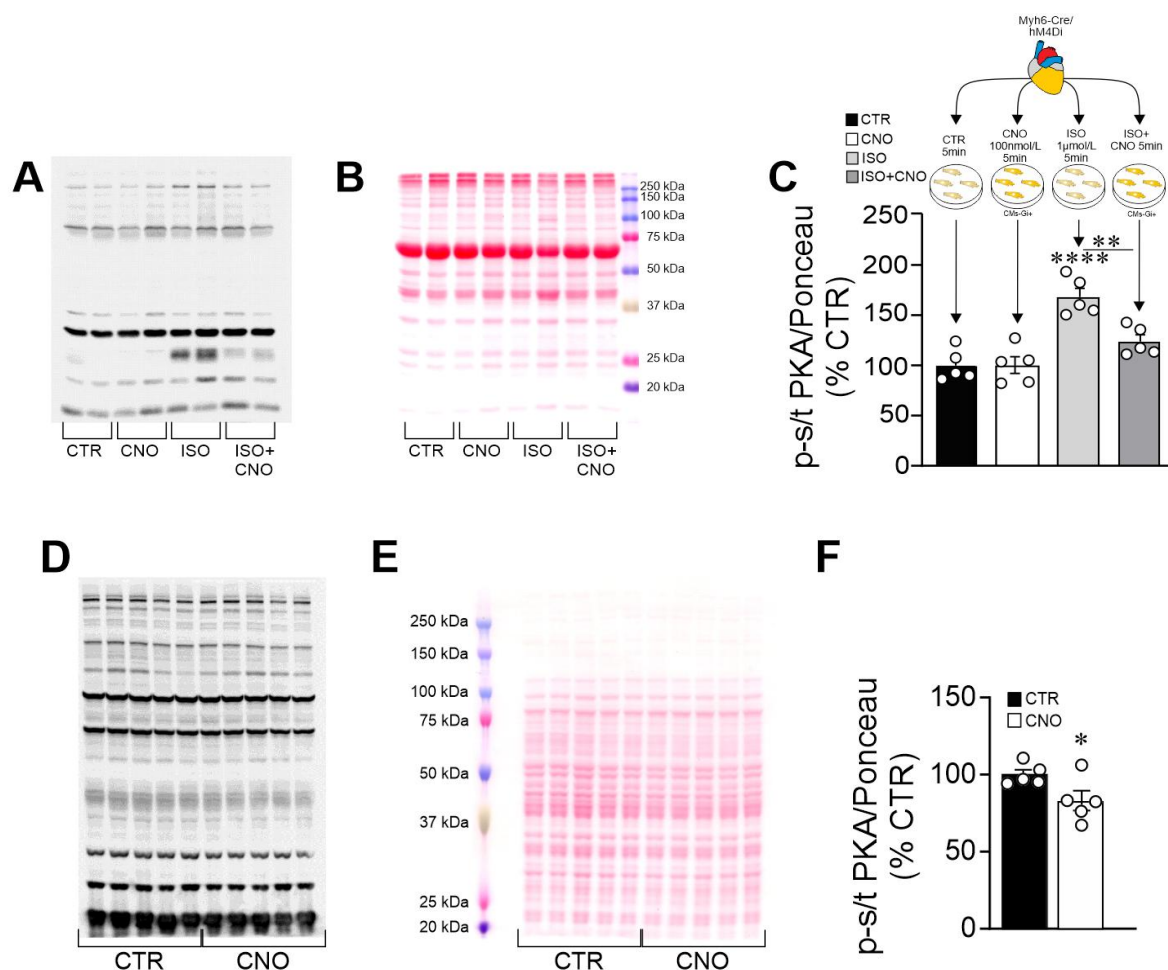


Figura 10: A ativação da via Gi pelo CNO reduz a fosforilação de substratos da PKA após o tratamento crônico e agudo. (A) Imunoblot representativo de alvos fosforilados em CMs tratados *in vitro* com CNO, ISO ou ISO+CNO por 5 minutos. **(B)** Imagem representativa da membrana corada com Ponceau. **(C)** Quantificação densitométrica dos substratos fosforilados da PKA (resíduos de serina e treonina) em amostras de cardiomiócitos isolados. **(D)** Imunoblot representativo de alvos fosforilados pela PKA no coração de animais Myh6-Cre/hM4Di tratados ou não com CNO por 7 dias. **(E)** Imagem representativa da membrana corada com Ponceau. **(F)** Quantificação densitométrica dos substratos fosforilados da PKA (resíduos de serina e treonina) em amostras de tecido cardíaco. n = 5 corações por grupo. As comparações estatísticas foram realizadas por One Way-ANOVA seguida do teste de Tukey (C) e teste t-Student bicaudal. *p < 0,05, ** p<0.01 e **** p<0.0001.

Na sequência, partimos para demonstrar a funcionalidade da via Gi ativada pelo CNO *in vivo*. Sabendo que o M2-AChR é conhecido por induzir bradicardia através da sinalização Gi, avaliamos os efeitos *in vivo* do tratamento com CNO na frequência cardíaca (FC) utilizando o ECG (Figura 11). Como apresentado na Figura, a administração de CNO (0,5mg/kg I.P) induziu uma rápida diminuição da FC, de até 83%, que permaneceu baixa por pelo menos 90 minutos. Camundongos hM4Di tratados com CNO, por outro lado, não apresentaram qualquer alteração na FC. Vistos em conjunto, esses resultados fornecem evidências do sucesso na geração de um modelo experimental que apresenta expressão direcionada do receptor DREADD-

hM4Di nos CMs e confirmam que o tratamento com CNO em animais Myh6-Cre/hM4Di desencadeia eventos fisiológicos característicos da sinalização Gi.

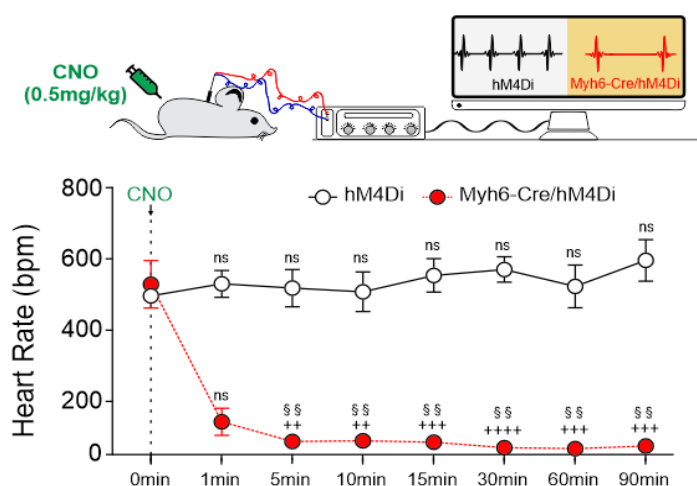


Figura 11: o tratamento com CNO *in vivo* induz a redução da frequência cardíaca (FC): A injeção de CNO reduziu rapidamente a FC de camundongos Myh6-Cre/hM4Di, sem apresentar efeito em camundongos controle hM4Di, conforme demonstrado por registros eletrocardiográficos. N=6 camundongos/grupo. As comparações estatísticas foram realizadas por Two-Way-ANOVA seguida do teste de Tukey. ns= não significativo, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 e ++++ p < 0,0001 vs. camundongos hM4Di nos respectivos tempos, e §§ p < 0,01 vs. 0 min dentro do mesmo grupo.

A seletividade do modelo foi também testada *in vitro*, ao isolarmos CMs de camundongos controle littermates (hM4Di e Myh6-Cre) e dos animais Myh6-Cre/hM4Di, e incubá-los com CNO (Fig. 12A-B). Como observado na Figura 12, nenhuma diferença na resposta contrátil foi observada em resposta ao CNO. Esses resultados indicam que a resposta ao CNO e, portanto, a expressão funcional do receptor hM4Di estão estritamente condicionadas aos cardiomiócitos Myh6-Cre/hM4Di.

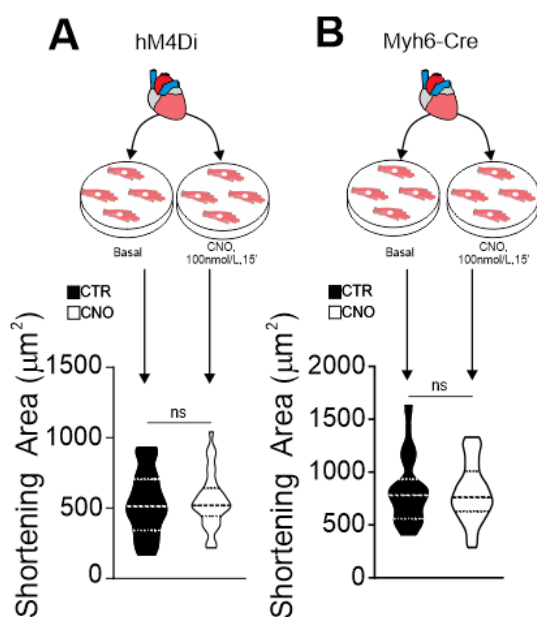


Figura 12: Cardiomiócitos provenientes de animais hM4Di e Myh6-Cre não respondem ao tratamento com CNO. A) Pannel superior: esquema do tratamento com CNO em CMs ventriculares isolados de camundongos hM4Di. Pannel inferior: o gráfico do tipo violino mostra a ausência de efeito do CNO em CMs de camundongos hM4Di. N = 34 células / 3 corações por grupo. A) Pannel superior: esquema do tratamento com CNO em CMs ventriculares isolados de camundongos Myh6-Cre. Pannel inferior: o gráfico do tipo violino mostra a ausência de efeito do CNO em CMs Myh6-Cre. N=35–38 células / 3 corações por grupo. Linhas tracejadas grossas e finas nos gráficos do tipo violino indicam, respectivamente, as medianas e os percentis 25 e 75. As comparações estatísticas foram realizadas por teste t de Student bicaudal. ns= não significativo.

Mostramos anteriormente que o CNO foi capaz de antagonizar o efeito do ISO na fosforilação de alvos da PKA. Assim, decidimos investigar se o CNO poderia prevenir

também o efeito clássico do ISO na contratilidade de CMs *in vitro*. Para tal tratamos CMs provenientes de camundongos Myh6-Cre/hM4Di com CNO, ISO e ISO+CNO (Figura 13). Confirmando resultados prévios, o CNO reduziu a contratilidade dos CMs, enquanto o ISO aumentou drasticamente esse parâmetro. Com a incubação de ISO+CNO, verificamos que o CNO prevenia o aumento da contratilidade induzido pelo ISO, mantendo os níveis contráteis próximos ao basal (Figura 13). Este achado confirma mais uma vez que o tratamento com CNO é capaz de antagonizar os efeitos do ISO.

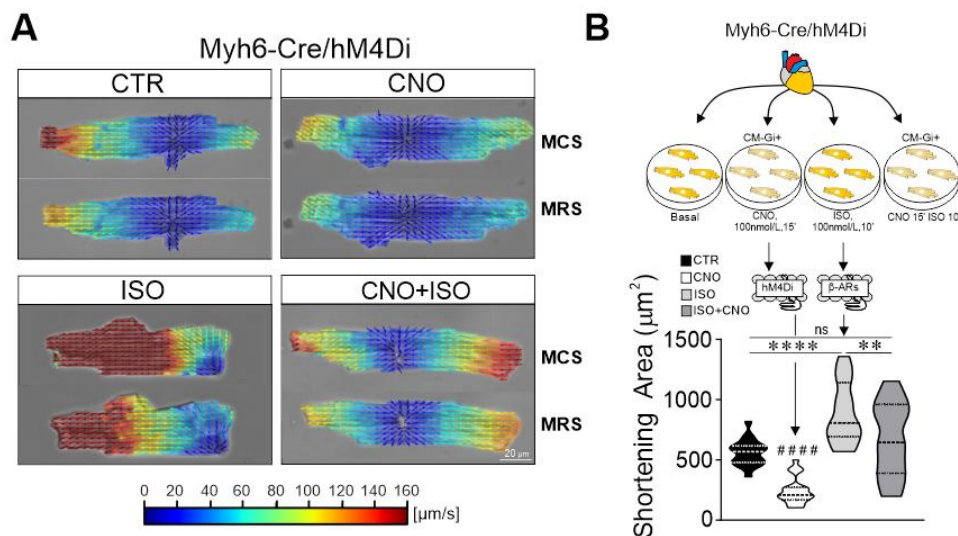


Figura 13: Tratamento com o CNO reduz o aumento da contratilidade de cardiomiócitos induzida pelo isoproterenol: A) Imagens representativas dos vetores de movimento obtidos durante a velocidade máxima de contração (MCS) e de relaxamento (MRS) de CMs ventriculares Myh6-Cre/hM4Di em condição basal (controle, CTR) ou após tratamento com CNO, ISO ou ISO+CNO. Barra de escala = 20 μm . **B)** Painel superior: esquema do tratamento com CNO e ISO em CMs ventriculares. Painel inferior: o gráfico do tipo violino mostra o aumento da área de encurtamento induzido por ISO, prevenido pela ativação da via Gi mediada por CNO. N = 16–21 células / 3 corações por grupo. Linhas tracejadas grossas e finas nos gráficos do tipo violino indicam, respectivamente, as medianas e os percentis 25 e 75. As comparações estatísticas foram realizadas por One Way-ANOVA seguida do teste de Tukey. ns= não significativo, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. ##### $p < 0.0001$ vs demais grupos.

6.2 O tratamento com CNO previne o remodelamento cardíaco induzido pelo ISO.

Com base nos dados obtidos acima, investigamos em seguida se a ativação da via Gi restrita aos CMs (CM-Gi⁺) poderia prevenir o remodelamento patológico induzido pelo tratamento *in vivo* de camundongos com ISO por 7 dias (Figura 13A). Como amplamente estabelecido, o ISO induz uma série de eventos cardiodeletérios, incluindo hipertrofia dos CMs, morte celular e, em administrações prolongadas, até mesmo insuficiência cardíaca. O mecanismo envolve o aumento crônico da atividade do sistema renina e alterações no manejo intracelular do Ca²⁺, que acabam

promovendo o aumento do tamanho dos CMs por diferentes vias (GRIMM, 1998). Para testar se a ativação da via Gi poderia antagonizar esses efeitos, injetamos CNO 30 minutos antes de cada dose de ISO, conforme ilustrado na Figura 14B. A dose de 25 mg/kg já havia sido estabelecida pelo nosso grupo (PARREIRA *et al.*, 2020b). Observamos que o ISO induziu hipertrofia do coração (figura 14C) e hipertrofia dos CMs isolados (figura 14D-E), enquanto no grupo ISO+CNO essa hipertrofia não ocorreu.

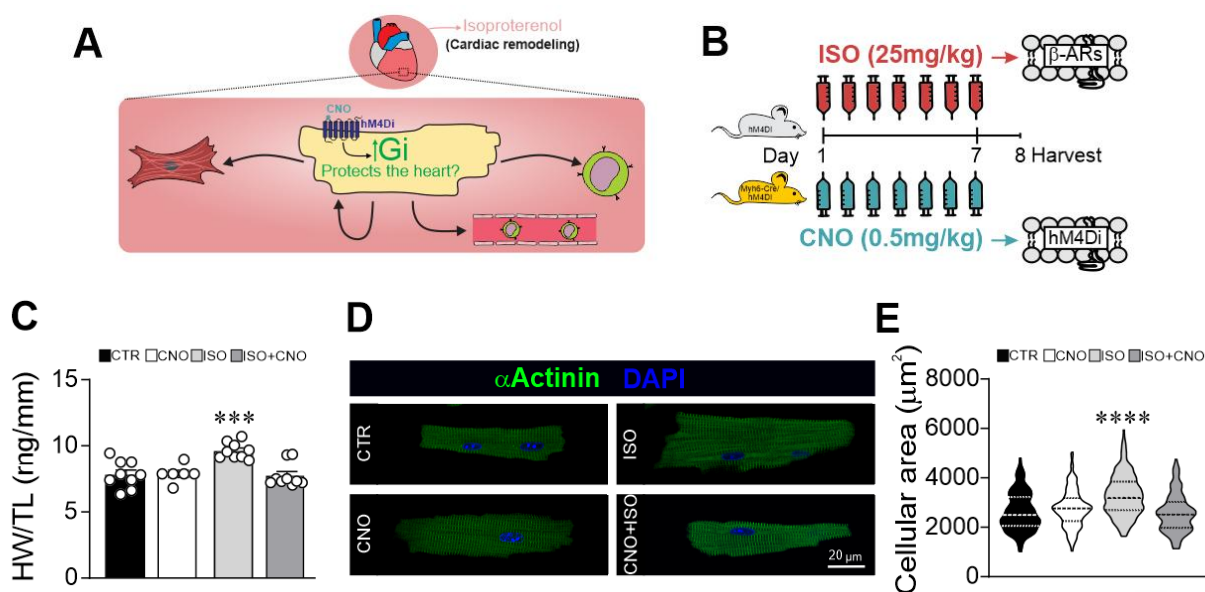
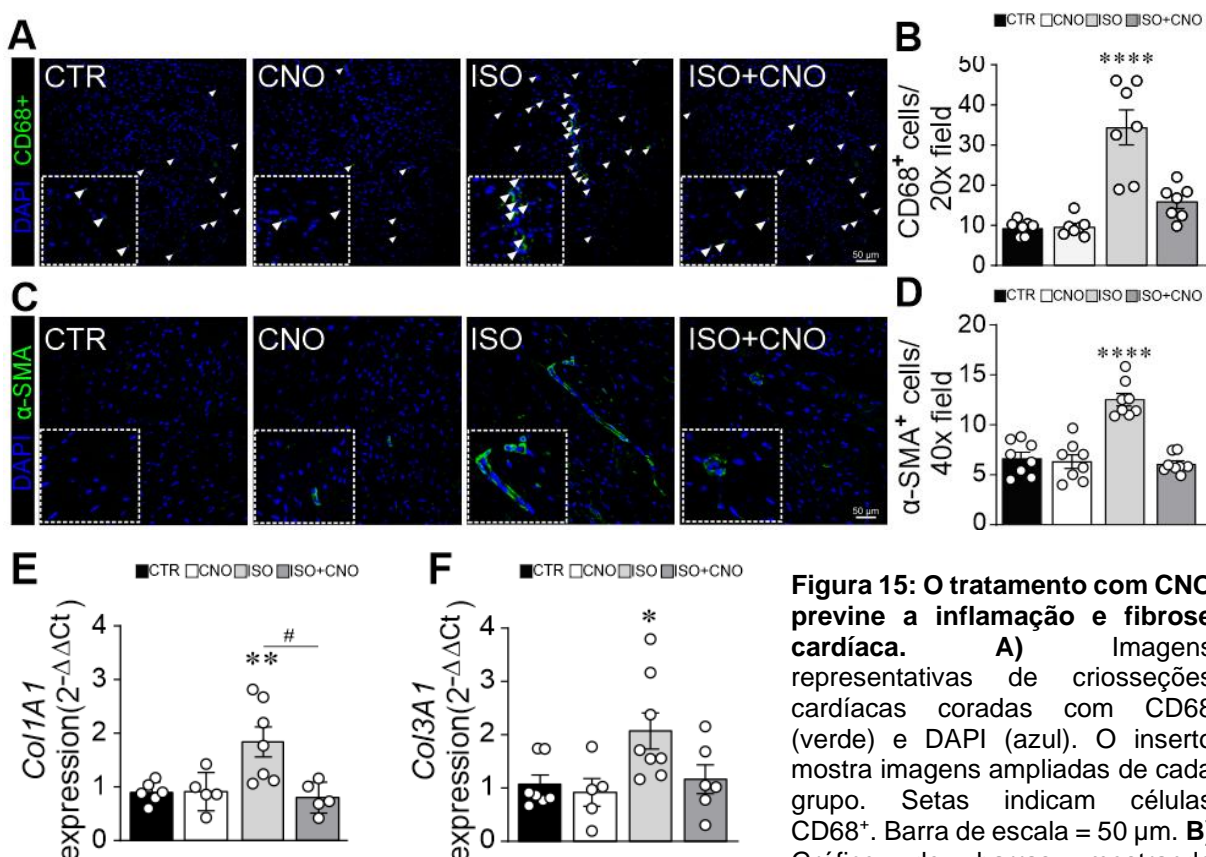


Figura 14: O tratamento *in vivo* com CNO previne a hipertrofia cardíaca: **A)** Esquema ilustrativo da questão central do estudo: a sinalização Gi específica em CMs confere proteção contra o remodelamento cardíaco induzido por estímulo adrenérgico? **B)** Linha do tempo das injeções de ISO e CNO em camundongos (protocolo de prevenção). **C–E)** O tratamento com CNO bloqueou os aumentos induzidos por ISO no peso cardíaco/comprimento da tíbia (HW/TL) e na área dos CMs, enquanto o CNO isoladamente não apresentou efeito detectável sobre esses parâmetros. Em **C**: N=6–9 corações/grupo. **D)** Imagens representativas de CMs isolados corados com α -actinina (verde) e DAPI (azul). Barra de escala = 20 μm . Em **E**: N = 134–259 células / 6–10 corações. As comparações estatísticas foram realizadas por teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Games–Howell (**C**). Linhas tracejadas grossas e finas nos gráficos do tipo violino indicam as medianas e os percentis 25 e 75 e ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey (**E**). **** $p < 0.0001$ vs demais grupos.

Esses resultados levantaram a dúvida de se o benefício da ativação de Gi nos CMs se estenderia ao microambiente cardíaco, prevenindo os efeitos do ISO em nível tecidual, como inflamação e fibrose, eventos mediados por leucócitos e fibroblastos, respectivamente. Avaliamos a quantidade de células inflamatórias no tecido cardíaco através da imunofluorescência para a proteína CD68, que está presente de forma predominante em macrófagos. Assim como os resultados descritos anteriormente, apenas o grupo ISO apresentou aumento na quantidade de células CD68+, que podem ser observadas em verde nas fatias de tecido cardíaco (Figura 15 A-B) e de

células α -SMA⁺ (Figura 15 C-D). Esta última é um dos principais marcadores da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, que passam a ser expressos no coração em situação de estresse (TARBIT *et al.*, 2019). De forma importante, o efeito do ISO, foi mitigado no grupo tratado concomitantemente com CNO. Uma das principais funções atribuídas aos miofibroblastos, é a alta capacidade de formação de colágeno para a conclusão do processo cicatricial (KUROSE e MANGMOOL, 2016). Durante o remodelamento cardíaco, ocorre o aumento importante na síntese de colágeno do tipo I e III (CLEUTJENS *et al.*, 1995). Confirmando nossos achados relativos à presença de miofibroblasto nos corações tratados com ISO, este grupo apresentou aumento da expressão do mRNA para colágeno do tipo I e III, efeito que foi mitigado na presença do CNO (Figura 15E-F). Vale salientar que os grupos que receberam apenas CNO, não apresentaram, em todos os resultados supracitados, qualquer alteração significativa, sugerindo que o CNO num contexto basal é incapaz de induzir quaisquer alterações morfológicas importantes.



aumento no número de células CD68⁺ no grupo ISO, mas não nos camundongos tratados com ISO+CNO. N = 7 corações/grupo. **C)** Imagens representativas de crioseções cardíacas coradas com α SMA (verde) e DAPI (azul). O quadrado menor mostra imagens ampliadas de cada grupo. Barra de escala = 50 μ m. **D)** O gráfico de barras mostra a quantificação de células α SMA⁺ por campo, que aumenta no grupo ISO, mas não no grupo ISO+CNO. N=8 corações/grupo. **E-F)** Gráficos de barras mostrando a expressão relativa de mRNA de colágeno 1 (N = 5–7 corações/grupo) e colágeno 3 (N =

5–8 corações/grupo), respectivamente. Os dados dos gráficos de barras são apresentados como média \pm erro padrão (EP). As comparações estatísticas foram realizadas por One-Way-ANOVA seguida do teste de Tukey. ns= não significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs demais grupos. # $p < 0.05$ vs ISO+CNO.

O remodelamento adaptativo por exposição crônica a catecolaminas, induz a morte dos CMs por apoptose (LEONE; ALBANÈSE; MARTIN, 2002) e necrose (GARG e KHANNA, 2014; SAROFF e WEXLER, 1970), fenômenos que estão intimamente ligados ao aumento de células inflamatórias. Por este motivo, utilizamos o corante Evans Blues Dye (EBD), que penetra em células que possuem alta permeabilidade membranar para avaliar o processo de morte celular. Como os CMs no basal são células que possuem baixa permeabilidade membranar, a penetração desta sonda só é possível se houver alteração na integridade da membrana, indicando células que estão cursando para um processo de morte celular. Como pode ser observado na Figura 16A, apenas o grupo ISO apresentou células com prejuízo na integridade membranar, enquanto nos demais grupos não se observa marcação para o EBD (Figura 16B). Para confirmarmos este fenômeno, realizamos o ensaio de Live-dead após o tratamento de CMs com CNO e/ou ISO *in vitro*. Constatamos que o ISO reduzia a viabilidade da preparação de CMs, enquanto o tratamento com ISO+CNO impedia a redução da viabilidade (Figura 16C). Estes resultados sugerem importante papel cardioprotetor da via-Gi no processo de morte celular.

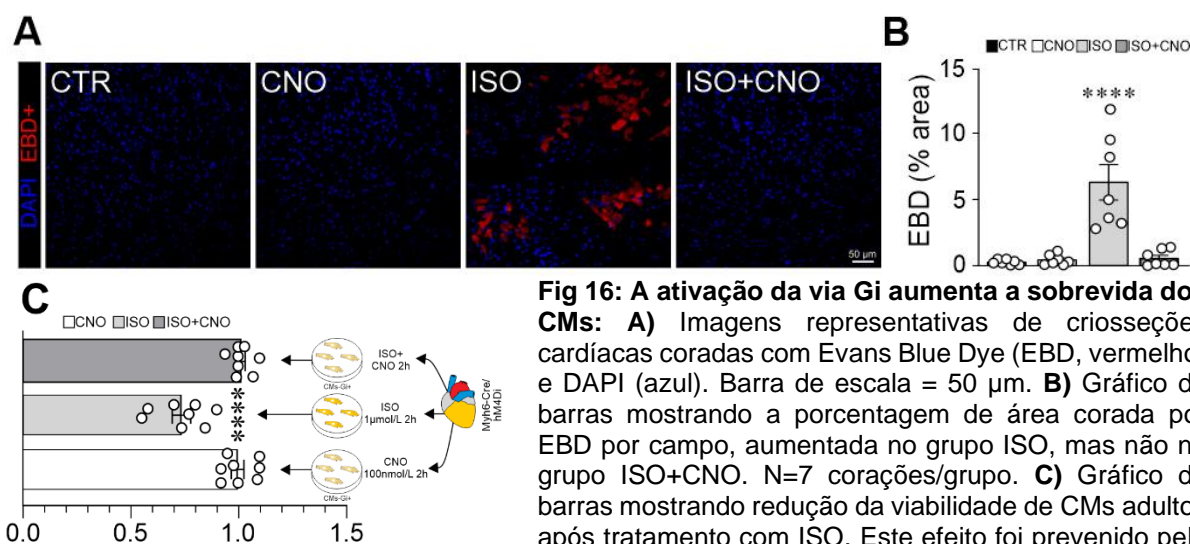


Fig 16: A ativação da via Gi aumenta a sobrevivência dos CMs: A) Imagens representativas de crioseções cardíacas coradas com Evans Blue Dye (EBD, vermelho) e DAPI (azul). Barra de escala = 50 μ m. **B)** Gráfico de barras mostrando a porcentagem de área corada por EBD por campo, aumentada no grupo ISO, mas não no grupo ISO+CNO. N=7 corações/grupo. **C)** Gráfico de barras mostrando redução da viabilidade de CMs adultos após tratamento com ISO. Este efeito foi prevenido pelo tratamento concomitante com CNO. Cada ponto no

gráfico representa a média do número de células vivas e mortas quantificadas a partir de um coração. Os valores foram normalizados com seus respectivos controles. N = 8 corações/grupo. Os dados dos gráficos de barras são apresentados como média \pm erro padrão (EP). As comparações estatísticas utilizadas foi one-way-ANOVA seguida do teste de Tukey. **** $p < 0.0001$ vs demais grupos.

Do ponto de vista funcional, observamos um aumento dos parâmetros contráteis nos CMs isolados provenientes de animais tratados com ISO (Figura 17A), tais como área

de encurtamento (Figura 17B), o que não foi observado no grupo que recebeu CNO previamente. O aumento da contratilidade induzida pelo ISO é o primeiro estágio do remodelamento cardíaco. Este aumento aparece como mecanismo compensatório em resposta à redução de tecido viável após a morte celular e, é acompanhado também da hipertrofia dos CMs. Curiosamente, o tratamento com CNO de forma isolada por 7 dias, induz aumento da contratilidade celular tal qual o ISO.

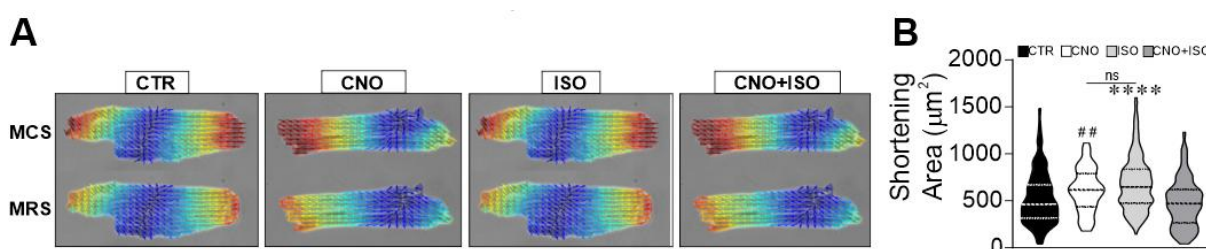


Figura 17: O tratamento com CNO normaliza a contratilidade de cardiomiócitos provenientes de animais tratados com ISO: A) Imagens representativas dos vetores de movimento obtidos durante a velocidade máxima de contração (MCS) e a velocidade máxima de relaxamento (MRS) de CMs ventriculares oriundos de animais Myh6-Cre/hM4Di tratados por 7 dias. Barra de escala = 20 µm. **B)** Gráfico do tipo violino mostra o aumento da área de encurtamento induzido por ISO, prevenido pela ativação da via Gi mediada por CNO. N = 171-279 células / 8 corações por grupo. Linhas tracejadas grossas e finas nos gráficos do tipo violino indicam, respectivamente, as medianas e os percentis 25 e 75. As comparações estatísticas foram realizadas por One-Way-ANOVA seguida do teste de Tukey. ns= não significativo, ****p<0.0001 vs CTR e ISO+CNO. # # p<0.01 vs CTR e ISO+CNO.

6.3 Evolução temporal do remodelamento cardíaco induzido por ISO:

Dado o efeito benéfico preventivo da ativação direcionada da via Gi nos CMs no modelo de cardiomiopatia induzida por ISO, decidimos, em uma próxima etapa, avaliar o potencial terapêutico dessa via. Para tal, avaliamos em qual momento o dano cardíaco induzido pelo ISO se torna detectável, a partir da análise da progressão temporal da lesão administrando uma, duas ou três doses diárias consecutivas de ISO como apresentado na Figura 18A. Constatamos o desenvolvimento gradual da hipertrofia cardíaca que acompanhava as doses consecutivas de ISO (Figura 18B), juntamente com o aumento na área de secção transversa dos CMs (Figura 18C-D). No terceiro dia, observamos um aumento significativo na morte celular (Figura 18E), acompanhado de um acúmulo de leucócitos CD68+ (Figura 18F). Nessa fase, miofibroblastos α SMA+ ainda não eram detectados de forma significativa (Figura 18G), uma vez que a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos ocorre entre 3 e 10 dias após o insulto (BRETHERTON *et al.*, 2020). Esse resultado indica que o

remodelamento cardíaco se encontrava na fase inflamatória, que precede o reparo tecidual mediado por miofibroblastos.

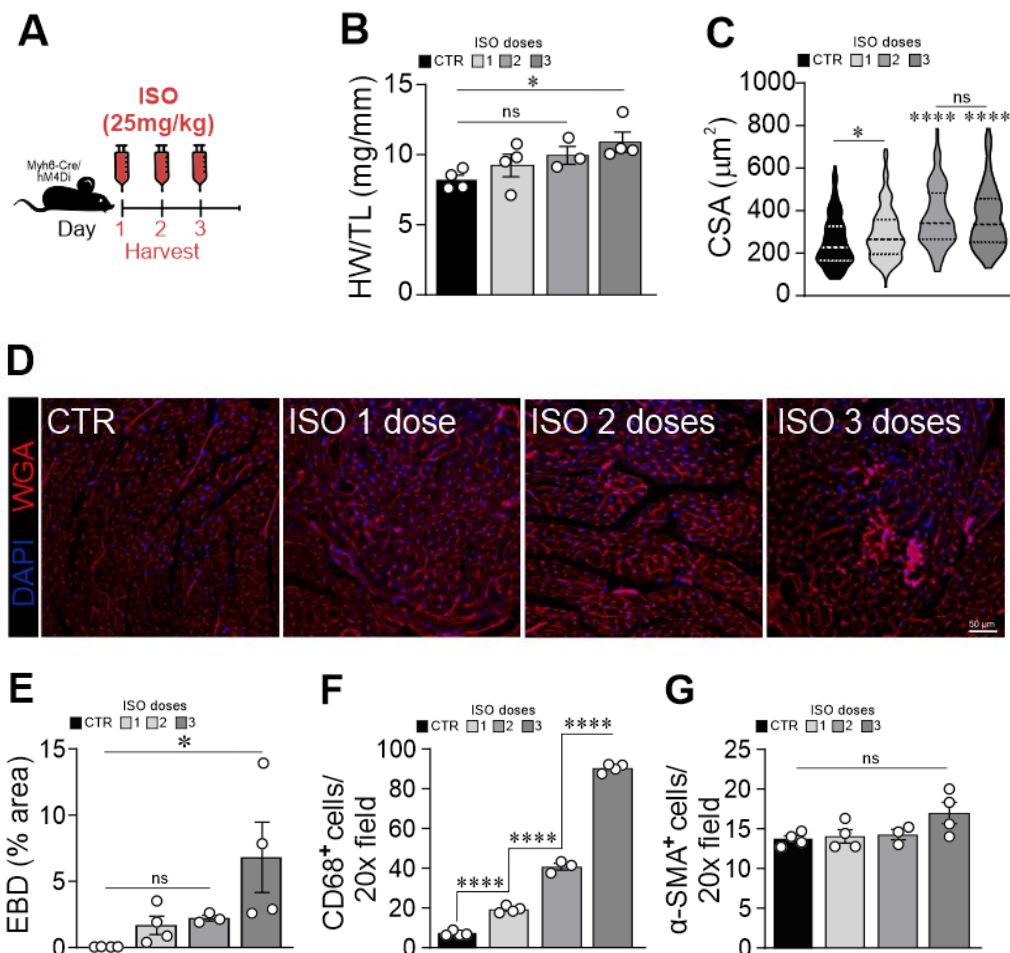


Fig 18: Avaliação temporal do remodelamento patológico induzido por isoproterenol (ISO). (A) Esquema ilustrativo do protocolo de administração de 1, 2 ou 3 doses consecutivas de ISO e coleta cardíaca. (B) Gráfico de barras demonstrando o aumento temporal da razão peso do coração/comprimento da tíbia (HW/TL) após 1, 2 ou 3 doses de ISO. $n = 3-4$ corações/grupo. (C) Imagens representativas de criossecções cardíacas coradas com WGA (vermelho) e DAPI (azul). Barra de escala = $50 \mu\text{m}$. (D) Gráfico de violino mostrando o aumento temporal da área de secção transversal dos CMs após 1, 2 ou 3 doses de ISO. $n = 118-174$ células/3-4 corações. (E-G) Aumento temporal da porcentagem de área corada por EBD (E), células CD68⁺ (F) e células α -SMA⁺ (G) por campo em resposta a 1, 2 ou 3 doses de ISO. $n = 3-4$ corações por grupo experimental. Os dados dos gráficos de barras são apresentados como média \pm erro padrão (SE). As linhas tracejadas grossas e finas nos gráficos de violino indicam as medianas e os percentis 25 e 75, respectivamente. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Games-Howell (D) e One-Way-ANOVA de Tukey (B, E, F e G). ns = não significativo; * $p < 0,05$ versus o grupo controle; **** $p < 0,0001$ versus os demais grupos.

6.4 A ativação tardia da via Gi em CMs repara o microambiente cardíaco do dano induzido pelo ISO:

Após compreendermos a cinética de desenvolvimento do remodelamento cardíaco no modelo de ISO, modificamos o protocolo de tratamento *in vivo* com CNO, que passou

a ser iniciado no 4^o dia, enquanto o protocolo com ISO foi mantido por 7 dias. O objetivo foi avaliar o impacto terapêutico da ativação de CMs-Gi⁺ após o estabelecimento da lesão cardíaca. O desenho experimental desse protocolo está apresentado na Figura 19A, denominado ativação tardia de CM-Gi⁺ (ISO7+CNO4). É importante ressaltar que o grupo tratado apenas com CNO não foi incluído no Protocolo 2, pois, de acordo com os dados anteriores, não apresentou diferença em relação ao grupo controle na maioria dos parâmetros avaliados.

Como mostrado nas Figuras 19B e 19C-D, a ativação direcionada de CM-Gi⁺ durante essa fase tardia promoveu a regressão da hipertrofia cardíaca e dos CMs, respectivamente. Cortes histológicos transversais do tecido cardíaco são representados na figura 19D, evidenciando tanto o pronunciado efeito lesivo do ISO, bem como o efeito cardioprotetor conferido pelo CNO.

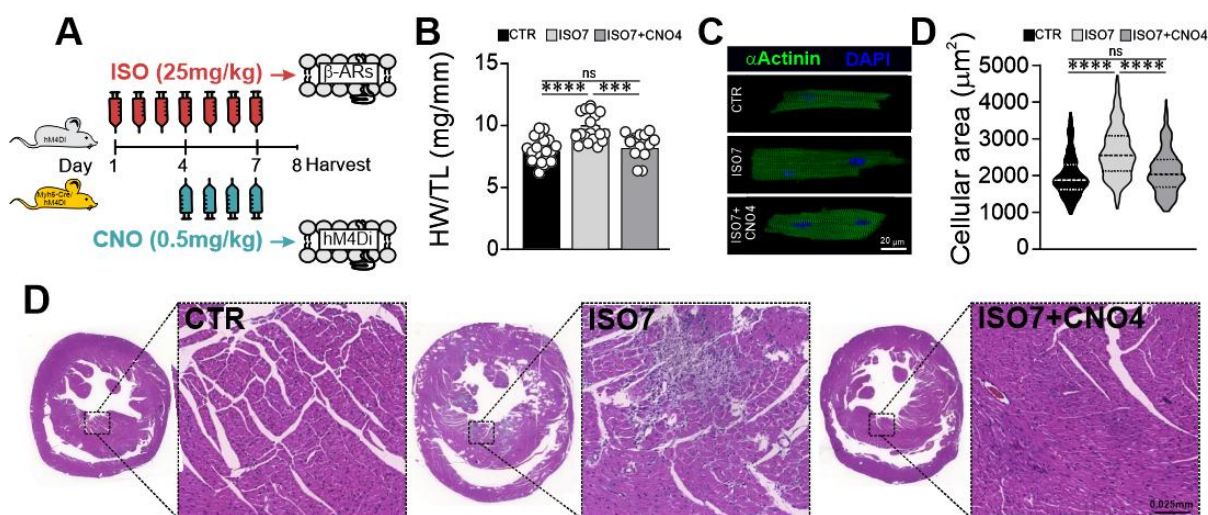


Figura 19: A ativação tardia da via Gi em cardiomiócitos reverte a hipertrofia cardíaca induzida por ISO em camundongos. A) Visão geral do protocolo experimental: ISO administrado uma vez ao dia por 7 dias; CNO coadministrado nos dias 4–7 (protocolo de tratamento). **B)** Gráfico de barras mostrando o aumento da razão peso cardíaco/comprimento da tíbia (HW/TL) após o tratamento com ISO e sua reversão após ativação tardia da via Gi em CMs. N=17–20 corações/grupo. **C)** Gráfico do tipo violino mostrando o aumento da área dos CMs induzido por ISO e sua reversão pelo tratamento tardio com CNO. N = 222–247 células / 5–4 corações. **D)** Cortes histológicos transversais de tecido cardíaco. A direita, demonstramos uma ampliação do tecido cardíaco. Observa-se a presença de área de infiltração leucocitária no coração de camundongos ISO. Barra de escala = 0,025 mm. Os dados dos gráficos de barras são apresentados como média ± erro padrão (EP). Linhas tracejadas grossas e finas nos gráficos do tipo violino indicam as medianas e os percentis 25 e 75. As comparações estatísticas foram realizadas por teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Games–Howell (D) e One-Way-ANOVA seguida do teste de Tukey. ***p<0.001 e ****p<0.0001.

Para avaliar o impacto da ativação tardia de CM-Gi⁺ na função cardíaca, realizamos, em seguida, medidas ecocardiográficas (Figuras 20 A-E). Camundongos tratados com ISO apresentaram redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE),

juntamente com aumento do diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole (LIVIs) e na diástole (LVIDd), bem como maior espessura da parede anterior do ventrículo esquerdo (LVAWs). Confirmando o efeito protetor da ativação CM-Gi⁺, a ecocardiografia revelou restauração da FEVE (Figura 20 B), normalização do diâmetro interno do VE (Figura 20 C-D) e recuperação da hipertrofia da parede anterior (Figura 20 E) aos níveis de controle em camundongos tratados com ISO7+CNO4.

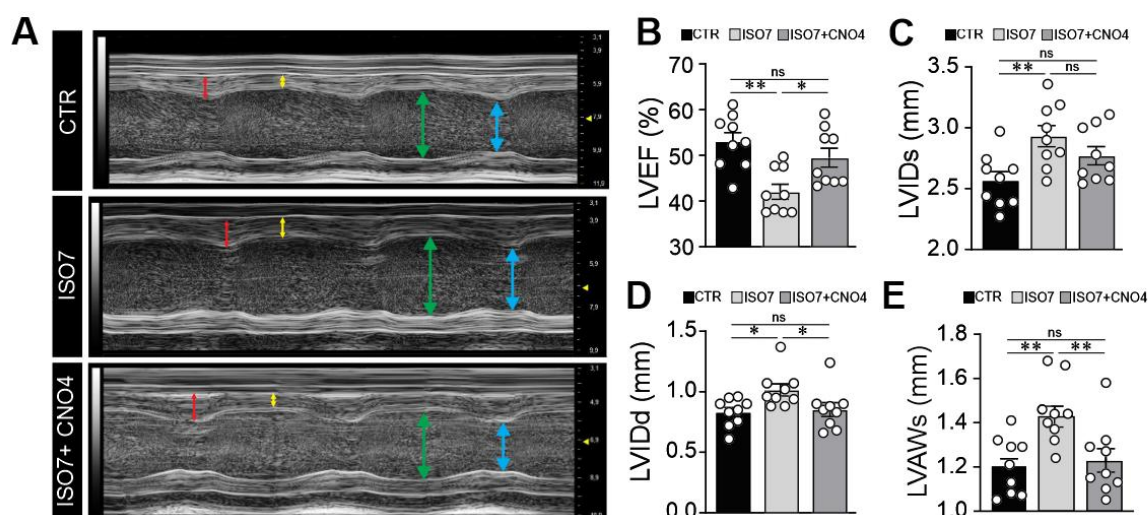


Figura 20: O tratamento tardio com CNO restaura parâmetros ecocardiográficos de camundongos tratados com ISO aos níveis basais: **A)** Imagens representativas da ecocardiografia realizada no modo M. As setas vermelhas indicam a parede anterior do VE durante a sístole, as setas amarelas indicam a parede anterior do VE durante a diástole, as setas azuis indicam o tamanho da câmara durante a sístole e as setas verdes indicam o tamanho da câmara durante a diástole. Análises ecocardiográficas mostram alterações na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) (**B**), no diâmetro interno da câmara durante sístole e diástole (LVIDs e LVIDd) (**C-D**) e na parede anterior do ventrículo esquerdo (**E**) induzidas pelo tratamento com ISO. A ativação tardia da via Gi em CMS normalizou a função cardíaca dos camundongos ISO aos níveis basais. Número de camundongos por grupo = 9. Os dados dos gráficos de barras são apresentados como média \pm erro padrão (EP). As análises estatísticas foram feitas utilizando One-Way ANOVA seguida do teste de Tukey. ns= não significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Seguindo os parâmetros analisados em nosso trabalho, avaliamos a quantidade de células inflamatórias no tecido cardíaco. A análise de imunofluorescência revelou um maior número de macrófagos CD68⁺ e miofibroblastos no coração de animais ISO, quando comparados a animais CTR (Figura 21), confirmando dados prévios. A ativação tardia de CM-Gi⁺ reduziu significativamente o número de macrófagos CD68⁺ (Figura 21A-B) e de miofibroblastos α SMA⁺ (Figura 21C-D). Apesar do efeito parcial sobre o número de células α -SMA⁺, a administração tardia de CNO impediu completamente a regulação positiva dos transcritos de mRNA de colágeno 1 e 3 em camundongos tratados com ISO (Figura 21E-F).

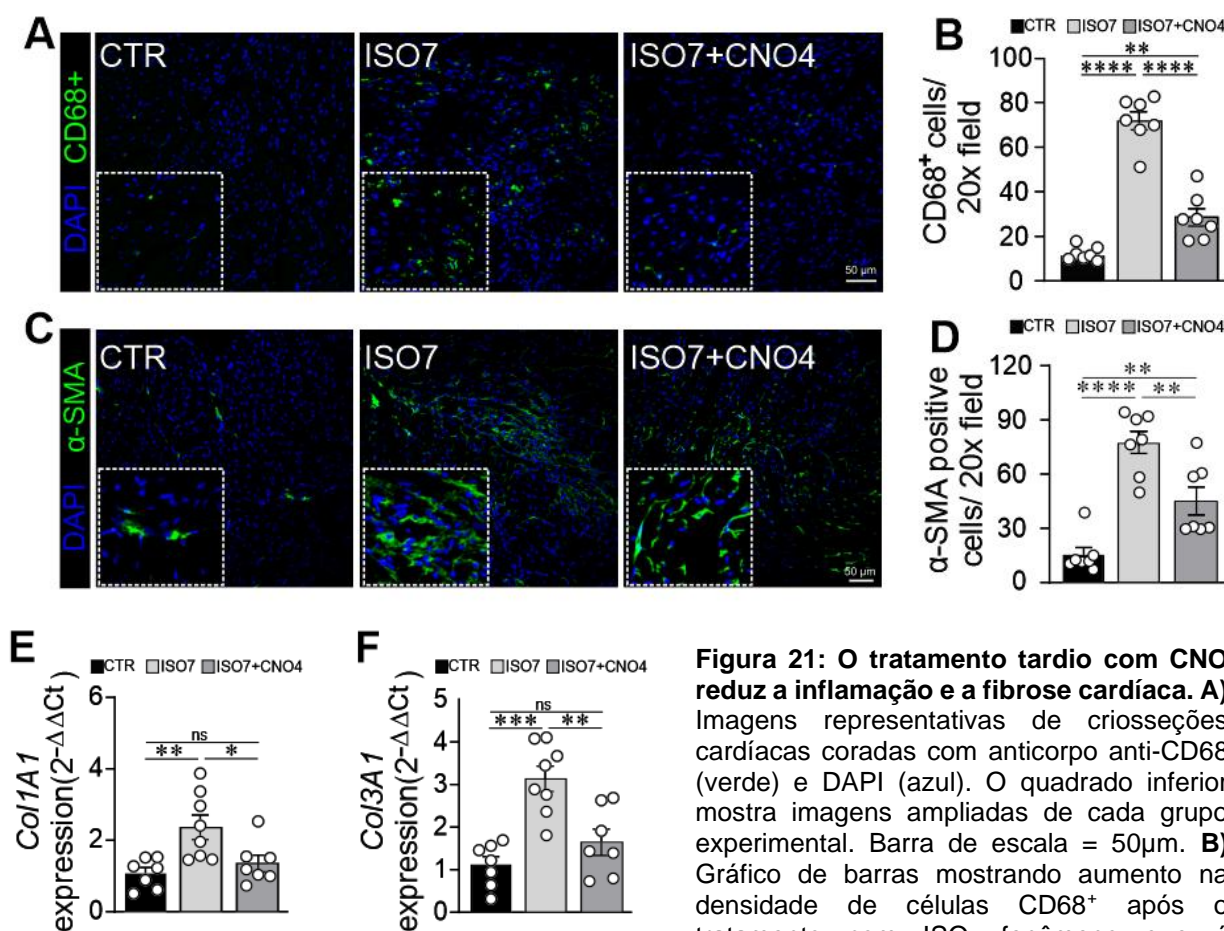


Figura 21: O tratamento tardio com CNO reduz a inflamação e a fibrose cardíaca. A) Imagens representativas de criossecções cardíacas coradas com anticorpo anti-CD68 (verde) e DAPI (azul). O quadrado inferior mostra imagens ampliadas de cada grupo experimental. Barra de escala = 50µm. **B)** Gráfico de barras mostrando aumento na densidade de células CD68⁺ após o tratamento com ISO, fenômeno que é

revertido pela ativação tardia da via Gi em CMs. N=7 corações/grupo. **C)** Imagens representativas de criossecções cardíacas coradas com anticorpo anti-αSMA (verde) e DAPI (azul). O quadrado inferior mostra imagens ampliadas de cada grupo experimental. Barra de escala: 50µm. **D)** Gráfico de barras mostrando a quantificação de células αSMA⁺ por campo e seu aumento em resposta ao tratamento com ISO. Este efeito é parcialmente revertido após a ativação tardia da via Gi em CMs. N=7 corações/grupo. **E-F)** Gráficos de barras mostrando que o aumento na expressão dos transcritos de mRNA para colágeno 1 e 3 induzido pelo ISO é atenuado pela ativação tardia da via Gi em CMs. N=7-8 corações/grupo. Os dados dos gráficos de barras são apresentados como média ± erro padrão (EP). As comparações estatísticas foram realizadas por One-Way ANOVA seguida do teste de Tukey. ns = não significativo, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001.

A menor produção de colágeno contribui para uma melhor funcionalidade a nível celular e tecidual (KONG, CHRISTIA E FRANGOGIANNIS, 2014; SCHUSTER *et al.*, 2023). Com o intuito de avaliarmos o impacto destas alterações no plano celular, em seguida avaliamos o efeito tardio do tratamento com CNO na função contrátil dos CMs de camundongos tratados com ISO (Figura 22). Os cardiomiócitos provenientes de camundongos tratados com ISO exibiram aumento da área de encurtamento (Figura 22B) e velocidades de contração-relaxamento (Figura 22C-D), consistentes com o fenótipo hipertrófico reportado para este grupo. De forma interessante, a sinalização tardia de CM-Gi⁺ restaurou esses parâmetros funcionais aos níveis basais do grupo controle, corroborando mais uma vez o conceito de recuperação funcional dos CMs. Esse achado está em consonância com a normalização de parâmetros

ecocardiográficos observada na Figura 20. Coletivamente, nossos achados demonstram a eficácia da ativação direcionada de Gi em CMs, mesmo quando iniciada após o estabelecimento da patologia, em interromper a progressão da doença e promover um remodelamento favorável que sustenta o reparo cardíaco.

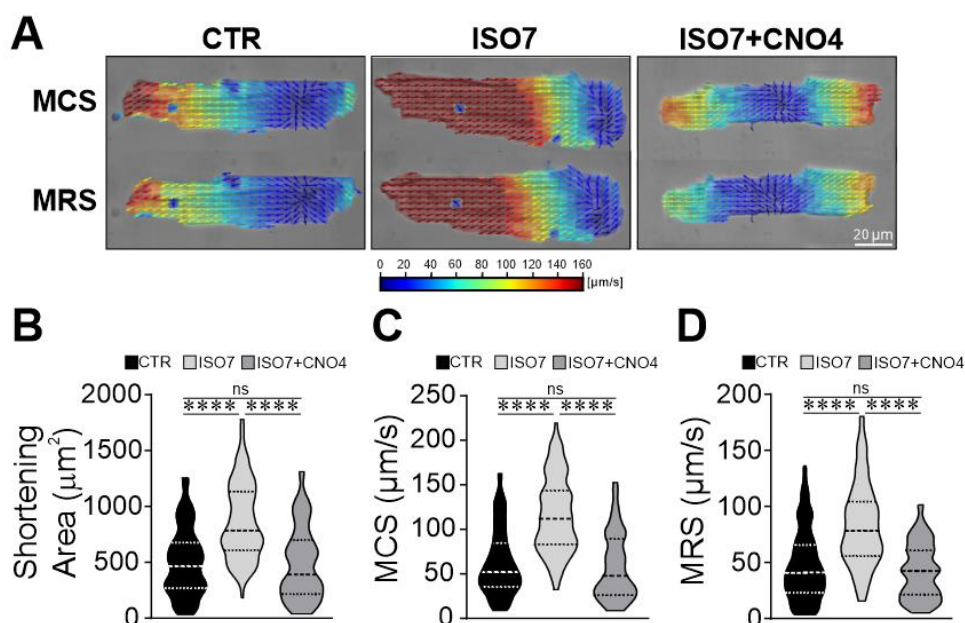


Figura 22: A ativação tardia da via Gi em camundongos tratados com ISO normaliza a função contrátil em miócitos ventriculares. **A)** Imagens representativas dos vetores de movimento obtidos durante a velocidade máxima de contração (MCS) e de relaxamento (MRS) de miócitos ventriculares dos grupos salina (controle), ISO7 e ISO7+CNO4. Barra de escala = 20 µm. **(B–D)** Gráficos de violino mostram o aumento da área de encurtamento (B) e das velocidades máximas de contração e relaxamento (C-D) em miócitos ventriculares de animais tratados com ISO. A ativação tardia da via Gi nos CMs de animais ISO normalizou esses parâmetros para níveis semelhantes aos do grupo controle. As linhas tracejadas grossas e finas indicam as medianas e os percentis 25 e 75, respectivamente. n = 81–97 células/4–5 corações. As comparações estatísticas foram realizadas por meio do teste de Kruskal–Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Games–Howell. ns = não significativo; ****p < 0,0001.

6.5 CNO é mais eficiente que repouso para a recuperação cardíaca:

Durante a obtenção dos resultados do protocolo de reversão, surgiu a dúvida sobre o real benefício do tratamento com CNO em relação ao repouso absoluto, isto é, à simples interrupção do tratamento com ISO. Em outras palavras, investigamos se a suspensão do estímulo patológico seria suficiente para promover a recuperação completa do coração. Para abordar essa questão, incluímos um grupo de repouso no protocolo de tratamento com ISO, conforme esquematizado na Figura 23A. Após a administração de três doses de ISO, um dos grupos foi mantido em repouso por quatro dias (ISO3+Repouso4), permitindo a recuperação espontânea do tecido cardíaco,

enquanto outro grupo, após as 3 doses de ISO, foi tratado apenas com CNO por 4 dias (ISO3+CNO4).

Embora no protocolo de repouso (recovery) a hipertrofia cardíaca global não tenha sido mais detectada nos grupos que receberam ISO (Figura 23B) a análise celular revelou diferenças importantes entre eles. Especificamente, observou-se aumento da área de secção transversal dos CMs no grupo ISO3+Repouso4, efeito que não foi identificado no grupo tratado com CNO (ISO3+CNO4) (Figura 23C). De forma semelhante, a quantidade de células inflamatórias no tecido cardíaco permaneceu elevada no grupo ISO3+Repouso4 em comparação ao grupo controle, enquanto foi significativamente atenuada no grupo ISO3+CNO4 (Figura 23D). Esses resultados indicam que, embora o repouso seja capaz de reverter parcialmente as alterações macroscópicas induzidas pela sobrecarga adrenérgica, a ativação direcionada da via Gi por meio do CNO promove uma recuperação mais eficiente no plano do cardiomiócito e inflamatório.

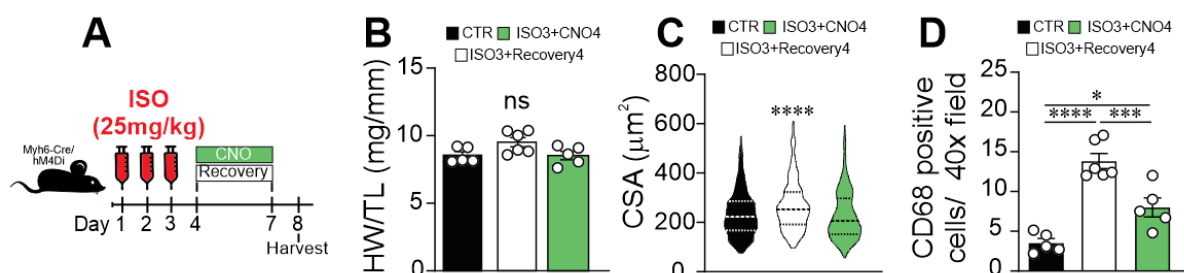


Figura 23. O tratamento com CNO após 3 dias de ISO promove recuperação superior ao repouso com CNO na hipertrofia e inflamação cardíaca: A) Resumo do desenho experimental utilizado. **B)** Gráfico de barras mostra o peso do coração normalizado pelo comprimento da tíbia de animais CTR, ISO+repouso e ISO3+CNO4. N = 5-6 corações por grupo. **C)** Gráfico de violino demonstrando a área de secção transversal dos CMs nos respectivos grupos experimentais. **D)** Gráfico de barras mostrando a quantidade de células CD68+ por campo nos respectivos grupos experimentais. N = 5-6 corações por grupo. Os dados dos gráficos de barras são apresentados como média ± erro padrão (SE). As linhas tracejadas grossas e finas nos gráficos de violino indicam as medianas e os percentis 25 e 75, respectivamente. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando One-Way seguido do teste de Tukey. ns = não significativo, * p < 0,05, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001.

6.6 CNO favorece a recuperação cardíaca através da modulação do perfil inflamatório cardíaco:

Tendo esclarecido a questão acima, retornamos ao nosso protocolo ISO7+CNO4 com o objetivo de compreender mais profundamente os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos da ativação tardia da via CM-Gi+ no modelo de ISO. No terceiro dia

do protocolo ISO, a morte celular dos CMs já é evidente. Nessa fase, a resposta inflamatória desempenha um papel crítico na condução do processo de remodelamento cardíaco. Nossa observação de que o tratamento tardio com CNO reduziu o número de células CD68⁺ nos corações de camundongos tratados com ISO sugere fortemente que essa intervenção modula as respostas imunes. Para investigar melhor os mecanismos subjacentes a este efeito, realizamos uma análise de citometria de fluxo. A estratégia de gating utilizada para a triagem celular por citometria de fluxo (FACS) é apresentada na Figura 24A. Como esperado em um contexto inflamatório, a administração de ISO levou a um aumento significativo de leucócitos CD45⁺ (figura 24B), neutrófilos Ly6G⁺ (figura 24C) e monócitos CD64⁺ (figura 24D) em comparação aos controles. Notavelmente, esse perfil inflamatório foi revertido pelo tratamento tardio com CNO. Em condições basais, a população de macrófagos cardíacos é composta predominantemente por células residentes; entretanto, após lesão tecidual, o recrutamento de monócitos/macrófagos CCR2⁺ aumenta e está associado ao remodelamento adverso (Adamo *et al.*, 2020). Assim, investigamos se a ativação tardia de CM-Gi⁺ impactaria o influxo de células CCR2⁺ induzido por ISO, que representam a principal população infiltrante em situação de estresse (MURRAY e WYNN, 2011). A análise FACS confirmou um aumento significativo de monócitos/macrófagos CCR2⁺ em corações tratados com ISO em comparação aos controles (Figura 23F). Surpreendentemente, a ativação direcionada de Gi em CMs aboliu o influxo de monócitos CCR2⁺ para o coração. Essa achado reforça a ideia de que a ativação de Gi em CMs interrompe a progressão da doença e remodela o ambiente miocárdico por meio de efeitos imunomoduladores.

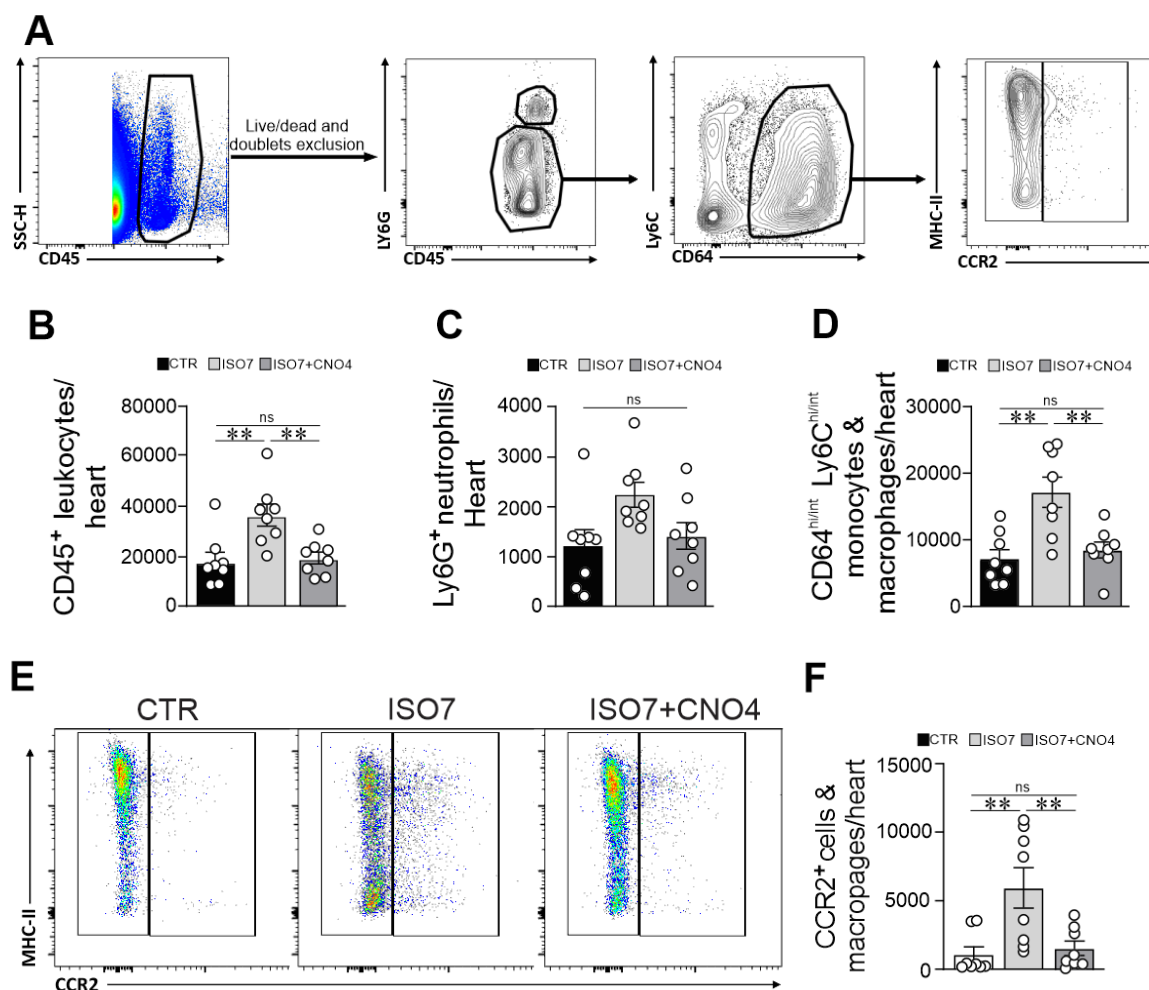


Figura 24: A ativação tardia da via Gi em cardiomiócitos previne o influxo de células CCR2⁺ para o coração em resposta ao dano induzido por ISO. As populações leucocitárias foram analisadas por citometria de fluxo. Leucócitos foram definidos como CD45⁺. Neutrófilos foram identificados como CD45⁺Ly6G⁺, enquanto macrófagos foram definidos como CD45⁺Ly6G⁻CD64^{lo/hi}Ly6C^{lo/hi}. Monócitos e macrófagos derivados de monócitos foram identificados como CD45⁺Ly6G⁻CD64^{lo/hi}Ly6C^{lo/hi}CCR2⁺. **A)** Estratégia de gating utilizada para citometria de fluxo. Os gráficos apresentados ilustram diferentes aspectos da resposta inflamatória cardíaca. **B)** Gráfico de barras mostrando o número total de leucócitos CD45⁺ no tecido cardíaco. **C)** Avaliação específica da infiltração de neutrófilos, identificados pela expressão de Ly6G⁺. **D)** Gráfico de barras mostrando a caracterização de subpopulações com expressão alta ou intermediária de CD64 (CD64^{hi/int}) e Ly6C (Ly6C^{hi/int}). **E)** Imagem representativa de citometria de fluxo demonstrando a população de células CCR2⁺ e MHC-II⁺ no tecido cardíaco. **F)** Gráfico de barras mostrando a quantificação da infiltração de células CCR2⁺ no coração. Número de corações por grupo: 8 por grupo. Os dados dos gráficos de barras são apresentados como média ± erro padrão (EP). As comparações estatísticas foram realizadas por ANOVA de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. ns = não significativo, * p < 0,05, ** p < 0,01.

7 DISCUSSÃO (Capítulo I)

Os principais achados do capítulo I são: I)- O desenvolvimento e a caracterização do modelo DREADD Gi cardíaco, Myh6-Cre/hM4Di; II) A demonstração de que a ativação da via Gi restrita aos CMs previne o desenvolvimento do remodelamento cardíaco patológico induzido por sobrecarga adrenérgica; III) A constatação de que, quando ativada de forma tardia, esta via é capaz de reverter ou atenuar o remodelamento cardíaco já estabelecido; e IV) a indicação que esse efeito benéfico ocorre por meio da citoproteção de CMs e, ao menos em parte, envolve ação imunomoduladora. Esta última possivelmente é consequência de efeitos parácrinos dos CMs em leucócitos.

Nosso estudo amplia de forma significativa a compreensão da sinalização Gi específica de CMs como um mediador central da cardioproteção colinérgica e do reparo miocárdico, estabelecendo bases conceituais e experimentais para intervenções de precisão, direcionadas a tipos celulares específicos. Demonstramos que modular a via colinérgica/Gi em um cenário de estimulação simpática sustentada não apenas interrompe, mas também reverte o remodelamento cardíaco mal-adaptativo induzido pela sobrecarga adrenérgica persistente. Um avanço central deste trabalho é a demonstração inequívoca da citoproteção conferida pela sinalização Gi em CMs. Ao evidenciarmos seu papel direto e específico na preservação da integridade dos miócitos ventriculares, fornecemos suporte mecanístico sólido de que a contenção da morte celular é um ponto de inflexão crítico para limitar a inflamação e favorecer o reparo, mesmo quando outros tipos celulares permanecem vulneráveis ao insulto adrenérgico. Notavelmente, mesmo quando iniciada após o estabelecimento da patologia e em um contexto de morte miocitária ativa, a ativação tardia da via Gi foi capaz de interromper a progressão da doença ao reduzir o recrutamento de monócitos CCR2⁺. Esses achados consolidam o potencial terapêutico da ativação Gi como uma estratégia celular para preservação e reparo do miocárdio.

7.1 O modelo Myh6-Cre/hM4Di como ferramenta de estudo da sinalização Gi:

Geramos e validamos o camundongo Myh6-Cre/hM4Di como um novo modelo de ativação da sinalização Gi específica em CMs. Nesse modelo, o receptor DREADD hM4Di é expresso seletivamente em CMs e responde exclusivamente a ligantes exógenos, como o CNO, permitindo controle temporal preciso da ativação da via Gi.

Após a administração de CNO, observamos efeitos fisiológicos consistentes com a ativação da sinalização Gi, incluindo redução da frequência cardíaca (FC) (SALAZAR, CHEN e ROCKMAN, 2007), diminuição da fosforilação de alvos da PKA e atenuação da contração induzida por ISO (WANG, GARERI e ROCKMAN, 2018a). Esses efeitos provavelmente resultam da inibição da produção de AMPc mediada por Gi (DeGEORGE *et al.*, 2008). A expressiva redução da FC observada após o tratamento com CNO se assemelha aos achados descritos por Redfern *et al.*, (2000) em um modelo distinto de ativação cardíaca de Gi. É importante ressaltar que os efeitos do CNO foram observados exclusivamente nos camundongos Myh6-Cre/hM4Di e estiveram ausentes nos controles littermates, descartando ações off-target do CNO ou efeitos inespecíficos da expressão do transgene.

7.2 Via Gi em situações de estresse cardíaco

É bem estabelecido que ocorre um aumento na densidade de receptores muscarínicos, predominantemente do subtipo M2 no coração durante o desenvolvimento de doenças cardíacas (BRODDE e MICHEL, 1999; GULUDEC, Le *et al.*, 1997). Paralelamente, a sinalização mediada pela proteína Gi também se encontra elevada em condições patológicas, incluindo a insuficiência cardíaca. Neste sentido Feldman *et al.*, (1988) relataram níveis elevados de mRNA de Gi em corações humanos insuficientes, sustentando a hipótese de uma regulação transcricional positiva da Gi.

Ainda permanece em debate se esse aumento de Gi em corações doentes é representa um mecanismo compensatório ou um fator que contribui para a progressão da doença. Apoiados em um papel causal, Redfern *et al.*, (2000) demonstraram que a ativação sustentada de Gi por 8 semanas, mediada por um receptor controlado por transativador de tetraciclina em CMs, resulta em cardiomiopatia letal, fibrose e arritmias. De forma complementar, Kouchi *et al.* (2000) observaram o aumento da expressão de Gi em corações de rato 10 semanas após o infarto, reforçando a associação entre a ativação exacerbada dessa via e o remodelamento adverso. De forma interessante, este aumento só foi detectado em animais SHR, ou seja, esse efeito só foi observado em corações que já sofriam de injúria por um longo período. Interessantemente, esse e outros trabalhos demonstram que a expressão do mRNA para a proteína Gs bem como a responsividade a catecolaminas seguem inalteradas

ou reduzidas. Nosso estudo não revelou fenótipo cardíaco patológico basal em camundongos Myh6-Cre/hM4Di tratados com CNO. Embora diferenças na duração da ativação de Gi impeçam comparações diretas entre os estudos, é plausível que a ativação de curto prazo de Gi possivelmente mais próxima da sinalização fisiológica, não desencadeie efeitos cardíacos adversos. Ainda assim, estudos adicionais são necessários para avaliar o impacto da ativação prolongada de Gi em nosso modelo.

Durante fases menos avançadas do remodelamento cardíaco, também é possível detectar um aumento na expressão de mRNA de Gi2. Eschenhagen *et al.*, (1992) demonstraram que a infusão de ISO por quatro dias resultou em um aumento de aproximadamente 49% nos níveis de mRNA de Gi2. De forma interessante, o tratamento concomitante com carbacol, um agonista muscarínico, potencializou o efeito inotrópico negativo, sugerindo que o aumento da expressão de Gi2 atua em fases menos avançadas do remodelamento como um mecanismo compensatório frente à exposição crônica a catecolaminas. Essa interpretação é corroborada pelo fato de que a elevação dos níveis de mRNA de Gi2 foi antagonizada pela infusão de propranolol, um bloqueador β -adrenérgico que atenua a superatividade das catecolaminas, eliminando a necessidade de aumento da sinalização via Gi para contrabalançar os efeitos mediados por Gs. Esse mecanismo ocorre porque o aumento da atividade de Gi promove a dessensibilização do eixo β -AR–adenilato ciclase, contribuindo, conseqüentemente, para a redução da função contrátil cardíaca exacerbada, que leva ao remodelamento patológico. Portanto, os efeitos na prevenção do remodelamento cardíaco podem passar pela dessensibilização de adenilato ciclase com conseqüente redução de cAMP e atividade da PKA.

Evidências robustas confirmam os efeitos benéficos da ativação colinérgica no coração durante o desenvolvimento de patologias (LIU CHUNG MING, WANG e GENTILE, 2024), inclusive em modelos de hiperestimulação adrenérgica (GAVIOLI *et al.*, 2014). Além disso, a secreção não neuronal de ACh, que amplifica a sinalização colinérgica, pode atuar como um mecanismo compensatório na insuficiência cardíaca (ROY *et al.*, 2013). Em consonância com isso, trabalhos prévios de nosso grupo demonstraram que o aumento da sinalização colinérgica por meio do inibidor da acetilcolinesterase (AChE) piridostigmina previne o remodelamento cardíaco patológico induzido por ISO em ratos (GAVIOLI *et al.*, 2014). Entretanto, esse tipo de

fármaco apresenta efeitos adversos e tolerabilidade limitada (PRIYA NAIR, V e JENNIFER M HUNTER, 2004 e TATTERSALL, 2018). A estratégia de ativação direcionada apresentada neste estudo oferece uma alternativa mais eficaz e específica para maximizar a cardioproteção mediada pela sinalização colinérgica. Além disso, o modelo murino desenvolvido constitui uma ferramenta valiosa para explorar essa abordagem em outros contextos de doenças cardíacas.

Um importante insight mecanístico emergente deste estudo é que uma parcela substancial da cardioproteção colinérgica decorre da sinalização Gi direta nos CMs, na qual seus efeitos citoprotetores são determinantes. Essa observação se baseia em achados prévios obtidos em camundongos Tg-GiCT, nos quais a inibição direcionada da sinalização Gi exacerbou a lesão por isquemia/reperfusão (DeGEORGE *et al.*, 2008), resultando em infartos maiores e pior função contrátil do ventrículo esquerdo em comparação a camundongos não transgênicos. Esses efeitos foram associados ao aumento da morte de CMs e à perda de miocárdio viável. Além disso, a isquemia/reperfusão aumentou a expressão de mRNA de Gi em corações selvagens, sugerindo um mecanismo compensatório. Nossos dados avançam esse mecanismo ao demonstrar que a ativação específica de Gi em CMs não apenas interrompe a progressão da doença, mas também promove ativamente o reparo cardíaco em um contexto de estresse adrenérgico sustentado. Para além de seus efeitos citoprotetores, o CNO reduziu a FC nos camundongos Myh6-Cre/hM4Di. Embora a FC não tenha sido avaliada em animais tratados com ISO, dados de ECG sugerem que o CNO pode contribuir para a restauração do equilíbrio autonômico prejudicado pela hiperativação adrenérgica (GAVIOLI *et al.*, 2014), reforçando ainda mais seu potencial terapêutico (tópico discutido melhor adiante)

7.3 Via Gi e o remodelamento cardíaco reverso:

Demonstramos que a ativação da via Gi é capaz de promover a reversão, ainda que parcial, do remodelamento cardíaco patológico. Uma hipótese plausível seria que o início do tratamento com CNO a partir do quarto dia apenas neutralizasse funcionalmente as quatro últimas doses de ISO, e que a melhora observada fosse consequência primária da interrupção do estímulo adrenérgico, e não de um efeito ativo da sinalização Gi. No entanto, conforme demonstrado na Figura 23, o período de repouso isolado mostrou-se menos eficaz do que o tratamento com CNO na

reversão do remodelamento cardíaco patológico, indicando um papel ativo da via Gi nesse processo.

Esses achados são corroborados por estudos prévios, como o de Yoganathan *et al.*, (2023), que, por meio de uma abordagem integrada envolvendo análises proteômicas e experimentos moleculares, demonstraram que mesmo uma única dose de ISO, em concentração duas vezes superior à utilizada neste estudo (50 mg/kg), é suficiente para induzir reprogramações cardíacas persistentes, caracterizadas por aumento de marcadores de inflamação, fibrose e hipertrofia, especialmente evidentes após 7 dias, *timepoint* também adotado em nossos experimentos. Outras evidências como as encontradas por Ellison *et al.*, (2007), que aplicou uma única dose de 5 mg/kg em ratos, sustentam a ideia de que o remodelamento cardíaco induzido por estímulos adrenérgicos se estabelece rapidamente e não é revertido de forma espontânea em curtos períodos de tempo. Neste trabalho, três doses de ISO foram capazes de desencadear, alterações moleculares profundas nos CMs, incluindo ativação persistente de vias pró-apoptóticas e disfunção da sinalização intracelular, que se mantêm mesmo após a retirada do estímulo inicial.

Em conjunto, esses dados reforçam a noção que a exposição adrenérgica precoce é suficiente para induzir um estado de reprogramação celular duradouro, reforçando a noção de que a interrupção do estímulo, por si só, não garante recuperação cardíaca em janelas temporais curtas. Assim, os efeitos benéficos observados com a ativação da via Gi em nosso modelo não podem ser atribuídos apenas à cessação funcional do estímulo β -adrenérgico, mas sim a um mecanismo ativo capaz de modular e atenuar processos de remodelamento já em curso, destacando assim a ativação da via Gi como um mecanismo ativo de modulação e reversão parcial desse fenótipo patológico.

7.4 Mecanismos da ativação Gi na regulação do ambiente inflamatório cardíaco:

Um resultado relevante da ativação tardia de Gi foi a modulação do perfil inflamatório nos corações submetidos ao estresse por ISO, caracterizada não apenas pela reversão da infiltração imune já estabelecida, mas também pela supressão do recrutamento adicional de células, incluindo o subgrupo pró-inflamatório de células CCR2⁺. Esses achados levantam duas questões centrais. A primeira delas é: de que

forma a ativação tardia de CM-Gi⁺ reduz o influxo de monócitos/macrófagos induzido por ISO? A seguir, descrevemos os principais mecanismos propostos.

7.4.1 Citoproteção direta:

Como demonstrado em nossos resultados, a ativação da via Gi em CMs promove proteção celular, prevenindo a morte dessas células tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Esse efeito citoprotetor representa, provavelmente, um mecanismo importante pelo qual a sinalização Gi contribui para a preservação da integridade miocárdica, uma vez que a morte de CMs atua como um potente gatilho para a amplificação da resposta inflamatória e para o estabelecimento de ciclos de retroalimentação deletérios no tecido cardíaco, principalmente através da liberação de DAMPs e outras moléculas sinalizatórias, que recrutam fortemente os macrófagos, estimulando a eferocitose. (DeGEORGE Jr e KOCH, 2008; WHELAN, KAPLINSKIY e KITSIS, 2010).

Evidências prévias sustentam esse conceito. Ellison *et al.*, (2007) demonstraram que a ativação da via Gi aumenta significativamente a sobrevivência de CMs submetidos ao estresse oxidativo induzido por H₂O₂. Nesse estudo, o efeito protetor foi atribuído à ativação da via PI3K, uma vez que a citoproteção foi abolida tanto pelo pré-tratamento com o inibidor de PI3K LY294002, quanto pela inibição seletiva da via Gi com toxina pertussis. Esses achados reforçam que a sinalização Gi exerce seus efeitos de sobrevivência celular por meio de uma via não canônica, mediada pelo complexo βγ, que culmina na ativação do eixo PI3K–AKT, conforme descrito mais recentemente por Wang *et al.*, (2022).

7.4.2 Via colinérgica como agente anti-inflamatório:

O efeito anti-inflamatório da sinalização colinérgica vem sendo descrito em diferentes modelos, inclusive em receptores muscarínicos. Chen *et al.*, (2022) demonstraram que os receptores muscarínicos estão relacionados com a supressão do processo inflamatório em zebrafish. Este trabalho demonstra que o tratamento com agonista colinérgico reduz a migração de neutrófilos e, conseqüentemente, a produção de citocinas pró-inflamatórias, como tnf-α, IL-1β, IL-6 e IL-8. Por outro lado, o efeito inflamatório era potencializado na presença da atropina, um antagonista muscarínico. O mesmo trabalho mostra que esse efeito era relacionado com a

redução da atividade da proteína arginase, que também pode ser localizada nos CMs, onde é relacionada com a modulação na contração do miocárdio (Steppan *et al.*, 2006)

Outros trabalhos relataram os efeitos anti-inflamatórios atribuídos à atividade colinérgica. Bezerra *et al.*, (2017) demonstraram que o uso do anticolinesterásico piridostigmina conseguiu modular o perfil inflamatório cardíaco após a submissão de ligadura da artéria coronária. Os achados incluem redução na concentração de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10, além de redução do estresse oxidativo cardíaco. Com um protocolo semelhante, Barboza *et al.*, (2019) demonstraram que o tratamento prévio com a piridostigmina por 60 dias conseguiu condicionar o coração e melhorar o prognóstico pós-infarto. Dentre os fatores avaliados, notou-se uma redução significativa nos níveis de IFN- γ , IL-6 e IL-1 β . De forma semelhante ao nosso trabalho, os autores associam os achados à manutenção da integridade do balanço autonômico, na qual o colinesterásico conseguiu reduzir a atividade simpática e, conseqüentemente, os efeitos deletérios relacionados ao sistema simpático. A ACh de origem não neuronal também pode exercer um papel importante relacionado a efeitos anti-inflamatórios (ROCHA-RESENDE *et al.*, 2021). Han *et al.*, (2024) demonstraram que a estimulação vagal ativa a via IL-10/STAT, que polariza os macrófagos para o subtipo M2, tipo celular descrito como anti-inflamatório e associado a melhores prognósticos quando estimulados durante a lesão. Além dos trabalhos supracitados, revisões recentes compilam os efeitos anti-inflamatórios associados ao sistema colinérgico, especulando diferentes mecanismos e papéis emergentes de outros tipos celulares (SHEN *et al.*, 2025). Pela primeira vez mostramos o papel específico dos CMs nesse processo anti-inflamatório, sugerindo que o CM possa funcionar como importante pivô desses mecanismos anti-inflamatórios.

Além de fatores solúveis que possam ser secretados por CMs e interferir no recrutamento de leucócitos pro-inflamatórios (tópico discutido a seguir), outros mecanismos intracelulares canônicos podem estar envolvidos. Por exemplo, a redução do eixo cAMP-PKA-ROS pelo CNO reduz a inflamação, visto que esta via está relacionada com o aumento na atividade da proteína *myeloid differentiation 2* (MD2), que se mostra importante via relacionada ao recrutamento de macrófagos pelo ISO (QIAN *et al.*, 2024). Estudos semelhantes correlacionam o tratamento com ISO ao aumento na expressão de CD14, um receptor que medeia respostas inflamatórias e a produção de citocinas por meio da regulação transcricional do NF- κ B. Observou-

se que a inflamação cardíaca era aumentada em células tratadas com ISO, e que esse aumento era mediado por PKA, visto que a inibição de PKA com o fármaco H-89, bem como o seu silenciamento via siRNA aboliam os efeitos pro-inflamatórios do ISO. (MUTHU *et al.*, 2010).

7.4.3 Ação parácrina cardiomiócitos-macrófagos:

O ISO é capaz de ativar macrófagos diretamente, independentemente de outros mecanismos de propagação inflamatória, atuando principalmente por meio do eixo β 2AR–cAMP–PKA–ROS (QIAN *et al.*, 2024). Nesse contexto, considerando a seletividade do CNO, é plausível supor que a ausência de células inflamatórias observada na figura 15A, bem como a redução da inflamação geral demonstrada nas figuras 21C e 24, estejam relacionadas à ativação específica de CM-Gi⁺. Assim, uma possibilidade plausível é que a ativação de CM-Gi⁺ promova um microambiente cardíaco mais reparador, possivelmente por meio de comunicação dinâmica entre CMs e macrófagos, mediada por contato célula–célula, sinalização parácrina e, principalmente, pela troca de vesículas extracelulares (KOREN *et al.*, 2015 e YANG *et al.*, 2023). Embora o eixo mecanístico dessa possível ação parácrina ainda não esteja completamente elucidado, ele já foi associado ao sistema colinérgico em diferentes órgãos e tecidos, sendo amplamente atribuído à capacidade dessa via de inibir a secreção de quimiocinas pró-inflamatórias, como como TNF α (GALLOWITSCH-PUERTA e PAVLOV, 2007) e CCL2 (ROCHA-RESENDE *et al.*, 2019), um mediador-chave do recrutamento de monócitos CCR2⁺. Nesse cenário, a modulação colinérgica da sinalização quimiotática pode representar um elo funcional entre a ativação de CM-Gi⁺ e a redução do influxo de monócitos inflamatórios no miocárdio lesionado

Nos últimos anos, um número crescente de evidências tem demonstrado que os CMs atuam como um regulador ativo do recrutamento e da ativação de células adjacentes por meio da secreção de fatores solúveis (BOLLINI *et al.*, 2018) . Durante a homeostase, foi demonstrado que os CMs produzem um ou mais mediadores parácrinos capazes de manter os macrófagos em estado de quiescência funcional, contribuindo para a preservação do microambiente cardíaco. No entanto, perturbações no equilíbrio funcional dos CMs como estresse mecânico, metabólico ou neuro-hormonal, levam à desorganização desse eixo cardiomiócito–macrófago,

resultando na secreção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-6, IL-1 β e MMP-9, e culminando na perda da manutenção da homeostase macrófágica mediada pelos CMs (LI et al., 2012).

Corroborando esse conceito, Yu *et al.*, (2021) demonstraram que CMs hipertrofiados secretam microRNAs por meio de exossomos capazes de induzir a polarização dos macrófagos para um fenótipo inflamatório, caracterizado pelo aumento da produção de citocinas como IL-6 e IL-8. A análise de RNA sequencing revelou que sete microRNAs estavam diferencialmente expressos nos exossomos derivados de CMs hipertrofiados, sendo quatro regulados positivamente e três regulados negativamente. Dentre esses, o miR-155 destacou-se como o principal indutor da mudança fenotípica dos macrófagos, reforçando o papel do cardiomiócito como fonte de sinais capazes de reprogramar funcionalmente as células imunes cardíacas.

Tian *et al.*, (2013) demonstraram de diferentes maneiras, que CMs são capazes de secretar vesículas contendo HSP60, que por sua vez contribuem de forma significativa para progressão da inflamação cardíaca. O mecanismo sugerido consiste na superexpressão de TLR2 e TLR4, que ativam eixos inflamatórios culminando no aumento da produção de p38, TNF α e IL-6. Nesta linha, Hu *et al.*, (2018) demonstraram que os CMs funcionam como reguladores ativos do microambiente cardíaco por meio de sinalização parácrina mediada por exossomas. Foi demonstrado que CMs submetidos a estresse liberam exossomos capazes de transmitir sinais deletérios a células adjacentes, promovendo a ativação de vias pró-apoptóticas e redução de mecanismos de sobrevivência em células transplantadas a um coração infartado. Esses achados sustentam a noção de que o secretoma miocitário, particularmente o componente vesicular, constitui um importante mecanismo de comunicação parácrina capaz de modular profundamente o comportamento de células no microambiente cardíaco, com implicações diretas para processos inflamatórios e de remodelamento tecidual.

Em conjunto, essas evidências sustentam o conceito de que os CMs não apenas respondem passivamente à inflamação cardíaca, mas atuam como orquestradores centrais da resposta imune local, regulando o fenótipo e a função dos macrófagos também por meio de fatores solúveis. Assim, a compreensão dos mecanismos pelos quais os CMs controlam a ativação macrófágica é o nosso foco de investigação atual,

principalmente por emergir como uma estratégia promissora para intervenções terapêuticas que visem modular a inflamação cardíaca de forma mais precisa e célula-específica.

7.4.4 Redução da frequência cardíaca:

Outro aspecto relevante refere-se à relação entre a redução da frequência cardíaca mediada por CNO e a cardioproteção. A redução da FC, por si só, tem sido proposta como um mecanismo cardioprotetor relevante em estudos clínicos e pré-clínicos (ALTMAN et al., 2025), principalmente por diminuir a demanda metabólica do miocárdio. Evidências recentes indicam ainda que a redução da FC pode promover mudanças no metabolismo cardíaco, incluindo maior utilização de glicose e melhora relativa da eficiência da produção de ATP, favorecendo a saúde e a recuperação dos CMs (TAN et al., 2022). Estudos como o de Kleinbongard et al., (2015) relatam que a redução da FC através do pré-tratamento com Ivabradina, um fármaco que induz bradicardia através do bloqueio da corrente *If* ou "funny", era capaz de melhorar a viabilidade de CMs remanescentes após a submissão do infarto. Além disso, o tratamento com ivabradina também conseguiu reduzir a produção de ROS, o que impacta diretamente no recrutamento de leucócitos para o coração. Acreditamos que a redução da FC possa contribuir parcialmente para os efeitos benéficos observados em nosso modelo, uma vez que menores frequências cardíacas estão associadas à redução da demanda de oxigênio e à atenuação do remodelamento mal-adaptativo. No entanto, é improvável que a redução da FC, isoladamente, explique a magnitude e a diversidade das alterações estruturais e imunológicas observadas após a ativação de CM-Gi⁺. É importante ressaltar que, em condições *in vitro* onde a frequência de estimulação e a duração do pulso foram rigorosamente controladas (pacing), a ativação de Gi pelo CNO preservou a viabilidade dos CMs apesar da estimulação β-adrenérgica sustentada, demonstrando um efeito citoprotetor independente da frequência cardíaca. Até onde sabemos, a literatura existente não descreve efeitos imunológicos marcantes em protocolos experimentais ou clínicos baseados exclusivamente na redução da FC. Em contraste, nossos achados revelam uma redução expressiva da infiltração de monócitos CCR2⁺ após a ativação de CM-Gi⁺, indicando que a sinalização Gi nos CMs envolve mecanismos cardioprotetores adicionais, para além da simples redução da FC. Assim, os efeitos benéficos da ativação de CM-Gi⁺ provavelmente resultam de uma combinação entre o aumento da

sobrevida dos CMs, redução da FC e a modulação direta do microambiente cardíaco por meio de interações célula–célula.

7.5 Os efeitos antifibróticos associados a via Gi:

Outro importante achado nesse trabalho, foi a atenuação da resposta pró-fibrótica induzida pelo ISO. Embora a fibrose reparativa seja importante para a manutenção do arcabouço cardíaco após a lesão, ela frequentemente forma tecidos desproporcionais em locais de morte e em áreas adjacentes, o que compromete a função do coração podendo levar a insuficiência (SHINDE e FRANGOGIANNIS, 2014). portanto a regulação da fibrose se faz necessária para que haja um melhor prognóstico (JIAN *et al.*, 2023). Observamos uma redução no mRNA para colágeno 1 e 3, além da menor diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Essas alterações moleculares, associadas a melhora do desfecho funcional do coração, são compatíveis com uma menor ativação de vias associadas ao desenvolvimento de fibrose, ainda que análises histológicas diretas sejam necessárias para confirmar esse desfecho. Os possíveis mecanismos associados a esses resultados são discutidos a seguir.

7.5.1 Redução da fibrose secundária a redução da inflamação

Um dos possíveis mecanismos associados ao desfecho antifibrótico, é a redução da fibrose secundária à inflamação. A redução no processo inflamatório cardíaco, mais especificamente na quantidade de macrófagos CCR2⁺, pode explicar a redução na expressão de colágeno dos tipos I e III, uma vez que esses macrófagos são fortemente associados a geração de mediadores fibrogênicos (YANG *et al.*, 2024). Além disso, os macrófagos CCR2⁺ derivados de monócitos têm sido consistentemente associados ao remodelamento cardíaco patológico e à inflamação crônica em diversos modelos experimentais. Estudos demonstraram que a inibição farmacológica ou a supressão genética dessa subpopulação atenua o remodelamento cardíaco adverso induzido por sobrecarga de pressão (PATEL *et al.*, 2018). Revisões recentes reforçam o papel central dos monócitos/macrófagos CCR2⁺ na progressão e manutenção do remodelamento cardíaco adverso (YERRA e ADVANI, 2022). Esses efeitos são parcialmente atribuídos à elevada sensibilidade dessa população ao eixo quimiocina CCL2/CCR2, que regula o recrutamento de monócitos circulantes para o miocárdio lesionado, amplificando a resposta inflamatória, promovendo a ativação de fibroblastos e contribuindo para a disfunção ventricular e pior prognóstico.

Fazendo um paralelo com os nossos achados, o estudo de Qian *et al.*, (2024) demonstrou que a inflamação induzida pelo ISO (que, como já discutido, pode atuar diretamente sobre macrófagos, independentemente de vias inflamatórias secundárias) é capaz de promover hipertrofia e fibrose cardíaca por meio de efeitos parácrinos sobre CMs e fibroblastos. Um dos mecanismos propostos envolve a capacidade dos macrófagos de produzir Ang II, uma vez que essas células expressam componentes essenciais para sua síntese, como angiotensinogênio e enzima conversora de angiotensina. A Ang II derivada de macrófagos atua tanto de forma autócrina quanto parácrina via receptor AT1. No eixo autócrino, estimula os próprios macrófagos a produzirem TGF- β 1; já no eixo parácrino, induz fibroblastos a aumentarem a síntese desse fator. Em ambos os contextos, o aumento de TGF- β 1 (considerado o principal indutor da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos) favorece a expansão dessa população celular, que apresenta maior atividade na síntese e deposição de matriz extracelular, contribuindo para o processo fibrótico (WEBER *et al.*, 2013).

Outros mecanismos também são descritos, como a capacidade dos macrófagos de secretarem componentes pró-fibróticos como fator de crescimento de fibroblastos (FGFs), IL-10 e IGF-1 (JIAN *et al.*, 2023; SHINDE e FRANGOIANNIS, 2014). Uma outra via possível é a secreção de exossomas pelos fibroblastos, contendo proteínas, mas principalmente microRNAs como o miR-138 que estimulam a diferenciação de fibroblastos e a síntese de matriz extracelular, o que agrava a fibrose cardíaca (WANG *et al.*, 2021). Todos esses mecanismos são bem descritos na literatura.

Um mecanismo menos explorado, porém, potencialmente relevante, é a capacidade de macrófagos cardíacos adquirirem características fenotípicas semelhantes às de fibroblastos, passando a expressar genes e proteínas tipicamente associados a essas células (HAIDER *et al.*, 2019). Esses achados expandem a compreensão do papel dos macrófagos na fibrose cardíaca, sugerindo que essas células podem contribuir não apenas de forma indireta (por meio da secreção de citocinas e fatores pró-fibróticos responsáveis pelo recrutamento e ativação de fibroblastos), mas também potencialmente de forma direta, participando da deposição e remodelação da matriz extracelular. Dessa forma, os macrófagos deixam de ser vistos exclusivamente como moduladores do processo fibrótico e passam a ser considerados elementos celulares plasticamente adaptáveis, capazes de influenciar de maneira significativa a

progressão da fibrose cardíaca em resposta ao microambiente inflamatório e às demandas de reparo tecidual

7.5.2 Redução da fibrose por ação parácrina cardiomiócitos-fibroblatos

Embora nossos resultados apontem para a redução da fibrose secundária à inflamação, alguns mecanismos complementares podem estar envolvidos. Sabe-se que os cardiomiócitos exercem papel importante na modulação da resposta fibroblástica, especialmente em condições de estresse. CMs em apoptose liberam DAMPs, citocinas e vesículas capazes de influenciar fibroblastos. WALDENSTRÖM *et al.*, 2012, demonstraram que microvesículas derivadas de CMs alteram centenas de genes em fibroblastos e podem ser internalizadas e translocadas ao núcleo (Fig. 25). Além disso, CMs em estresse secretam osteopontina, ativando a via miR-21 e promovendo maior sobrevivência e proliferação fibroblástica (LORENZEN *et al.*, 2015).

Sob ativação adrenérgica crônica, há aumento da expressão e secreção de TGF- β 1, que favorece diferenciação em miofibroblastos e remodelamento cardíaco (WAMEL, VAN *et al.*, 2002), bem como maior secreção de FGF-2, associada à proliferação fibroblástica e deposição de matriz extracelular (JIMENEZ, 2004). Além dos mediadores proteicos clássicos, os CMs produzem angiotensina II localmente e liberam microRNAs e lncRNAs por vesículas extracelulares como miR-223, miR-221, miR-208a, miR-21, miR-195, AK139128 e AK307033 que modulam a diferenciação e atividade secretora dos fibroblastos (FLORES-VERGARA *et al.*, 2021). O estresse mecânico, também influencia fibroblastos que estão em contato com cardiomiócitos. (Kakkar e Lee, 2010). Diante das evidências apresentadas, é possível que a ativação da via Gi e o aumento do tônus colinérgico module o eixo cardiomiócito-fibroblasto, hipótese que ainda permanece em investigação.

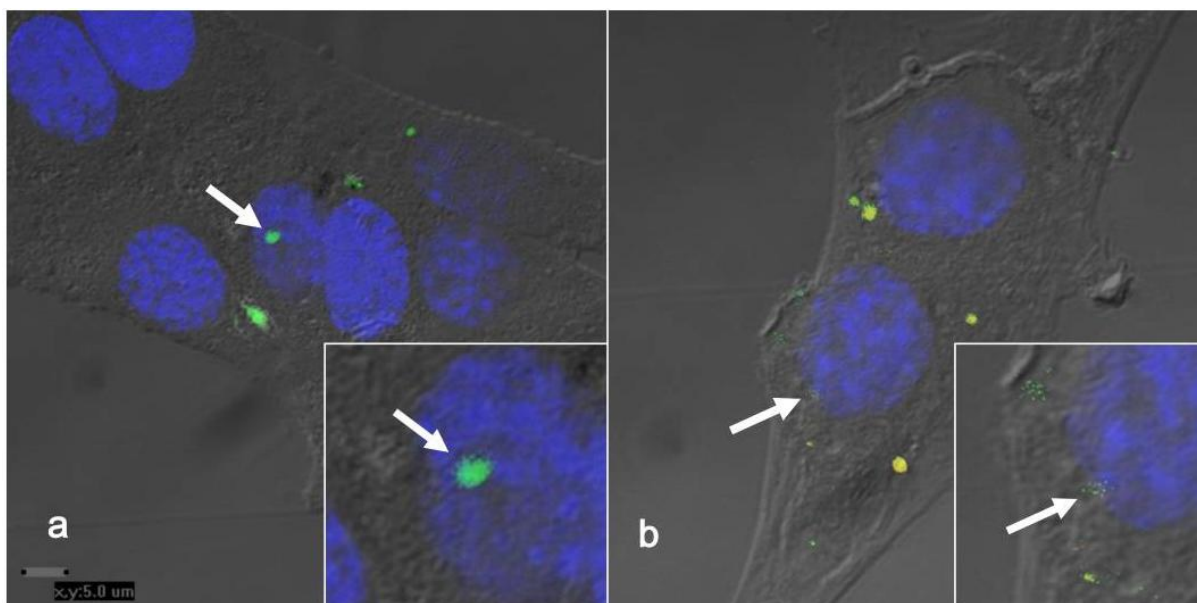


Figura 25: O fluxo de microvesículas de cardiomiócitos para fibroblastos: Imagem de cultura de fibroblastos tratados com vesículas extracelulares isoladas de CMs. As microvesículas foram coradas com laranja de acridina, que reconhece ácido nucleico e emite fluorescência em diferentes comprimentos de onda dependendo da sua interação (DNA e RNA). A figura demonstra que microvesículas/exossomos contendo ácidos nucleicos foram internalizados pelos fibroblastos após 3 horas de incubação. A coloração com laranja de acridina evidencia a presença de DNA (fluorescência verde) e RNA (fluorescência vermelha) no interior das células. A sobreposição dos sinais (amarelo) indica colocalização de DNA e RNA, sugerindo transferência simultânea de ambos os tipos de material nucleico para os fibroblastos. Figura retirada de Waldenström *et al.*, (2012).

8 CONCLUSÃO (capítulo I)

Em conclusão, este estudo identifica a sinalização Gi em CMs como um mediador central da cardioproteção colinérgica e do reparo miocárdico em um contexto de hiperativação adrenérgica. Ao demonstrar seu papel direto e específico em nível celular, fornecemos evidências mecânicas consistentes de que a preservação da integridade dos miócitos ventriculares é fundamental para a supressão de aspectos-chave do remodelamento patológico. Esses achados estabelecem as bases para intervenções terapêuticas de precisão, direcionadas a tipos celulares específicos, com o objetivo de modular vias colinérgicas/Gi sob condições de estimulação simpática sustentada. Os principais achados do capítulo 1 são demonstrados na figura 26, enquanto os possíveis mecanismos adjacentes relacionados à cardioproteção são demonstrados na figura 27.

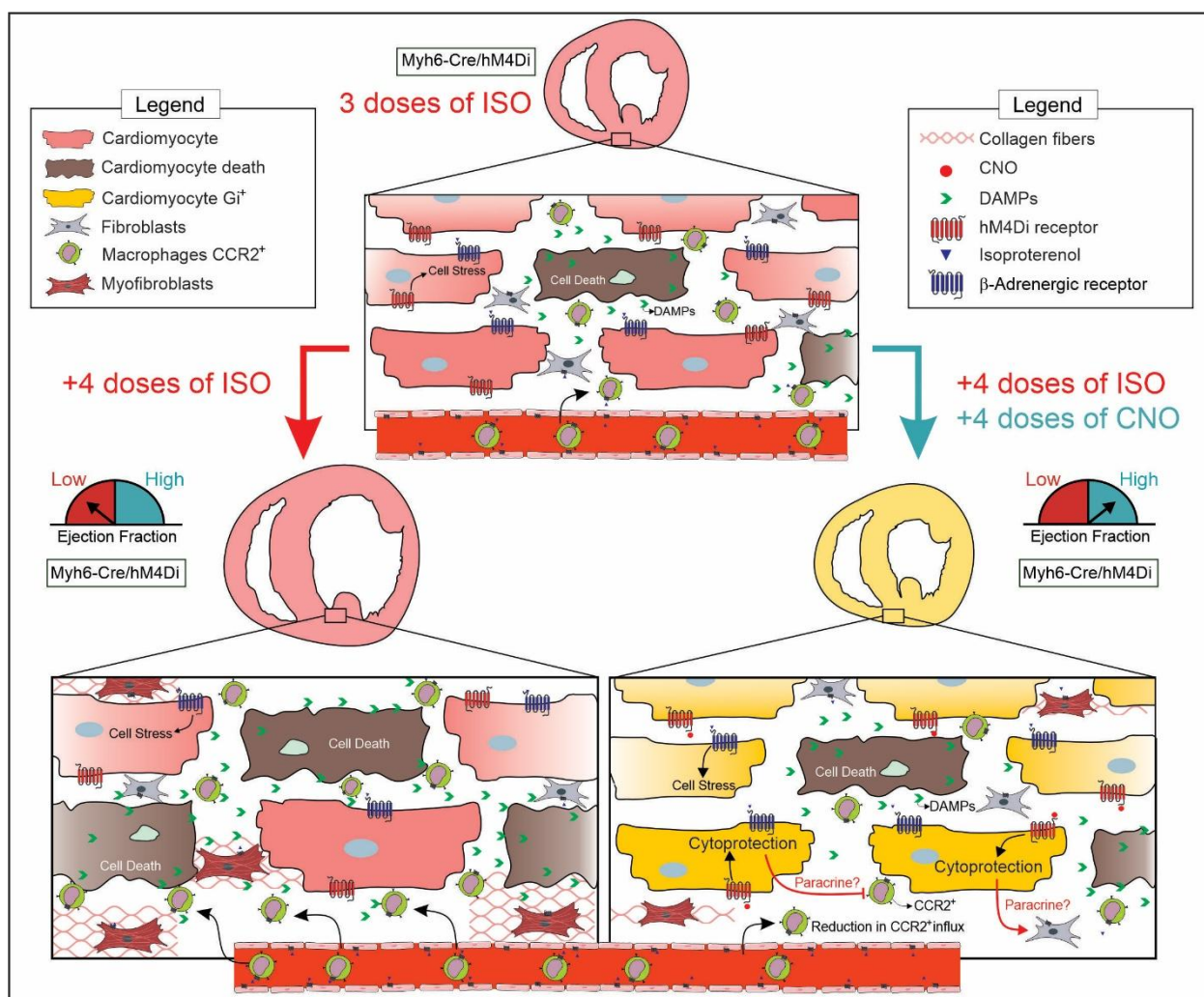


Figura 26. Resumo gráfico dos principais achados: A ativação seletiva da via Gi em CMs (modelo Myh6-Cre/hM4Di ativado por CNO) atenua o remodelamento cardíaco induzido por múltiplas doses de de

ISO. Enquanto o ISO promove estresse celular, morte de CMs, liberação de DAMPs, infiltração de macrófagos CCR2⁺ e ativação de fibroblastos com consequente fibrose e redução da fração de ejeção, a ativação concomitante da via Gi reverte esse fenótipo, preservando a função cardíaca e reduzindo inflamação e deposição de colágeno.

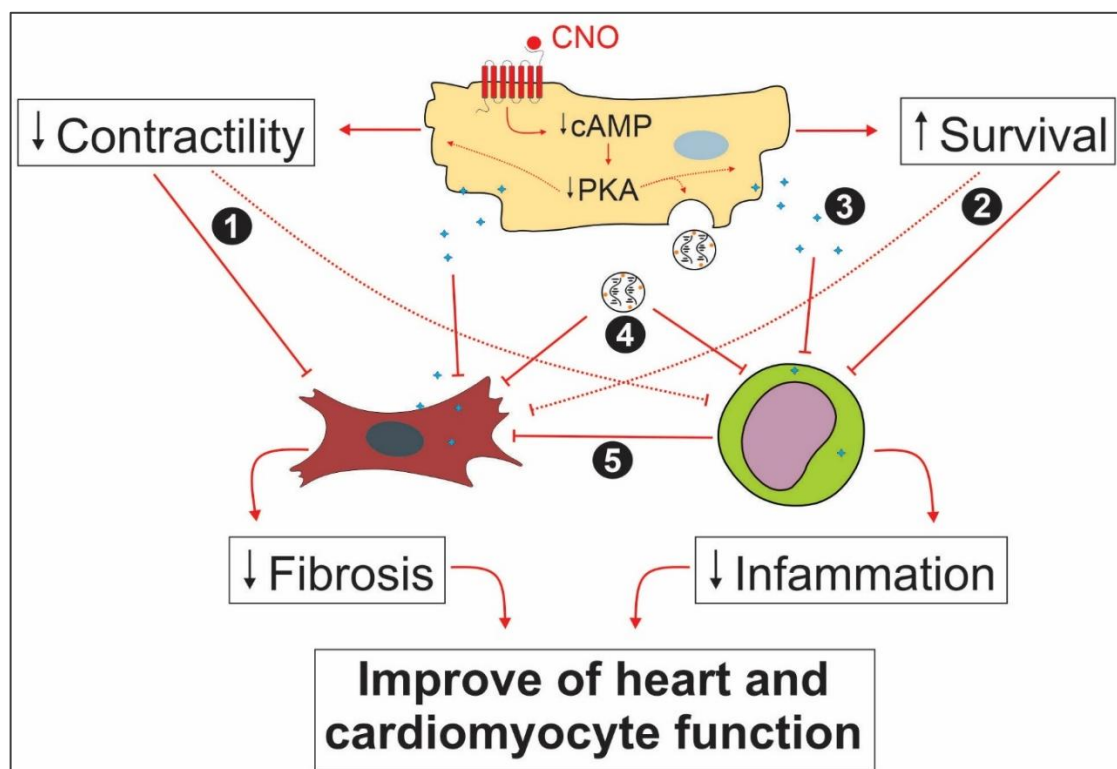


Figura 27. Principais mecanismos moleculares propostos: Os mecanismos propostos para a cardioproteção mediada por Gi incluem: (1) redução da contratilidade dos CMs e da estimulação β -adrenérgica via diminuição de cAMP/PKA; (2) aumento da sobrevivência dos CMs; (3) modulação parácrina do microambiente cardíaco por meio da secreção de fatores com propriedades anti-inflamatórias e anti-fibróticas; (4) liberação de exossomos contendo RNAs ou proteínas reguladoras capazes de modular fibroblastos e macrófagos; e (5) redução do influxo de macrófagos CCR2⁺ e da resposta inflamatória, culminando em menor fibrose e melhora global da função cardíaca.

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO (capítulo I)

Embora o modelo Myh6-Cre/hM4Di tenha possibilitado a ativação direcionada da sinalização Gi em CMs, a expressão do receptor hM4Di no nó sinoatrial resultou em uma redução acentuada da frequência cardíaca após a administração de CNO. Isso levanta a possibilidade de que os efeitos cardioprotetores observados sejam parcialmente atribuídos à bradicardia. Além disso, embora o modelo de sobrecarga adrenérgica forneça importantes insights mecanísticos, ele pode não reproduzir completamente o espectro de características fisiopatológicas observadas em condições cardíacas clinicamente relevantes. Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar a eficácia terapêutica dessa estratégia em diferentes contextos de doença.

CAPÍTULO II:

A acetilcolina regula a maturação pós-natal do cardiomiócito através da sinalização via receptor M2 e proteína Gi.

10 REVISÃO DE LITERATURA (Capítulo II)

10.1 O processo de maturação cardíaca:

Dentre todos os órgãos funcionais, o coração é o primeiro a se formar e iniciar sua atividade durante o desenvolvimento embrionário (LINDSEY, 2014). No entanto, embora a morfogênese cardíaca (responsável pela organização espacial das câmaras, válvulas e grandes vasos) esteja majoritariamente estabelecida ao nascimento, o coração neonatal ainda está longe de apresentar o fenótipo estrutural, metabólico e funcional observado no adulto. A maturação cardíaca constitui, portanto, a fase final do desenvolvimento do coração e envolve um conjunto coordenado de modificações celulares e moleculares que transformam CMs imaturos em células altamente especializadas, capazes de sustentar atividade contrátil contínua ao longo da vida (GUO e PU, 2020)

Esse processo pode ser dividido em períodos pré-natal, perinatal e pós-natal. Durante a vida intrauterina, predominam condições de baixa tensão de oxigênio, dependência glicolítica e intensa proliferação celular. No momento do nascimento ocorre uma transição metabólica abrupta, marcada pelo aumento da oxigenação tecidual, pela elevação da carga hemodinâmica e pelas mudanças hormonais significativas. O período pós-natal, foco deste capítulo, representa a fase de consolidação do fenótipo adulto, quando se estabelecem as principais transformações estruturais, elétricas e metabólicas dos CMs. Abaixo citaremos as principais mudanças morfoestruturais abordadas por importantes revisões (ELKHOORY *et al.*, 2024; GUO e PU, 2020; KARBASSI *et al.*, 2020; MAROLI e BRAUN, 2021)

Uma das primeiras mudanças observadas é a transição da hiperplasia para a hipertrofia. Em roedores, durante a primeira semana de vida, e em humanos ao longo dos primeiros 10 anos, os CMs progressivamente deixam o ciclo celular e entram em quiescência mitótica. A partir desse momento, o crescimento cardíaco passa a ocorrer predominantemente por aumento do volume celular. O volume de um CM pode aumentar de aproximadamente $2.000 \mu\text{m}^3$ no período neonatal para cerca de $40.000 \mu\text{m}^3$ no adulto, refletindo intensa reorganização estrutural intracelular. Essa saída do ciclo celular está associada à reorganização do citoesqueleto, ao aumento da carga

mecânica, mudanças na disponibilidade de oxigênio e ao estabelecimento de um novo programa metabólico mitocondrial.

Paralelamente, ocorre profunda reorganização do aparato contrátil. As miofibrilas tornam-se progressivamente alinhadas ao longo do eixo longitudinal da célula, e os sarcômeros aumentam de aproximadamente 1,6 μm no período neonatal para cerca de 2,2 μm no adulto, atingindo o comprimento ideal para geração máxima de força. Entre os dias pós-natais 7 e 14 em roedores, inicia-se a formação do sistema de túbulos-T, estrutura essencial para o acoplamento excitação–contração eficiente. A maturação dos túbulos-T ocorre em paralelo ao refinamento da maquinaria de manejo de Ca^{2+} , incluindo aumento da organização dos receptores de RyR2, maior expressão e funcionalidade dos canais de cálcio do tipo L, aprimoramento da atividade da SERCA2 e regulação mais precisa via fosfolamban. O resultado é a maior organização do fluxo de Ca^{2+} via retículo sarcoplasmático.

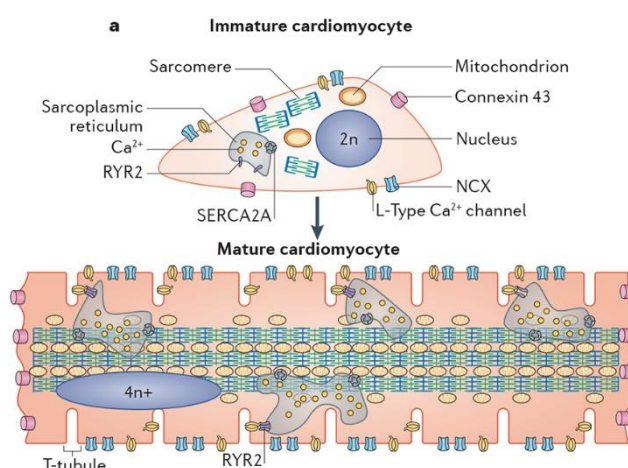
Do ponto de vista eletrofisiológico, CMs imaturos apresentam maior automaticidade espontânea, atribuída, em parte, à elevada expressão de canais HCN4, responsáveis pela corrente funny. Durante a maturação, a expressão desses canais diminui significativamente nas células ventriculares, reduzindo eventos de despolarização espontânea e consolidando a dependência do ritmo imposto pelo nó sinoatrial. Simultaneamente, há aumento da densidade e especialização de outros canais iônicos, contribuindo para encurtamento e estabilização do potencial de ação adulto.

A maturação metabólica constitui outro eixo central desse processo. CMs neonatais dependem predominantemente da glicólise anaeróbica como fonte energética, compatível com o ambiente intrauterino relativamente hipóxico. Após o nascimento, ocorre uma mudança progressiva para a fosforilação oxidativa mitocondrial como principal via de produção de ATP. O número e o volume das mitocôndrias aumentam substancialmente, passando de aproximadamente 5% do volume celular no período imaturo para 30–40% no fenótipo adulto. Em paralelo, há indução robusta de enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos, que passam a fornecer cerca de 70–80% do ATP utilizado pelo CM maduro, enquanto no período neonatal essa contribuição é inferior a 20%. Considerando que o coração humano adulto pode consumir cerca de 6 kg de ATP por dia, essa reorganização metabólica é essencial para sustentar a demanda energética crônica imposta pela atividade contrátil contínua.

Associada à saída do ciclo celular, observa-se ainda o fenômeno de polinucleação. Em roedores, entre os dias pós-natais 3 e 7, a maioria dos CMs sofre citocinese incompleta após replicação do DNA, originando células binucleadas; estima-se que cerca de 80% dos CMs adultos nesses animais sejam binucleados. Esse processo está relacionado ao aumento da capacidade de síntese proteica para sustentar crescimento celular, organização sarcomérica e expansão mitocondrial. A polinucleação também se associa à perda definitiva da competência proliferativa, consolidando o estado pós-mitótico da célula.

Além dessas transformações estruturais, elétricas e metabólicas, a maturação cardíaca envolve integração progressiva com o sistema vascular e o SNS, estabelecimento de junções intercelulares mais robustas (como discos intercalares maduros com conexinas organizadas), aumento da rigidez e organização da matriz extracelular e adaptação à carga mecânica sistêmica. Assim, a maturação cardíaca não deve ser entendida como um evento isolado, mas como um processo multidimensional que integra sinais mecânicos, metabólicos, hormonais e neurais para consolidar o fenótipo funcional adulto.

Essa complexidade explica por que a maturação completa de CMs *in vitro* ainda representa um dos maiores desafios da medicina regenerativa cardíaca, e reforça a importância de compreender, de forma integrada, os mecanismos que regulam essa transição do estado imaturo para o estado adulto.



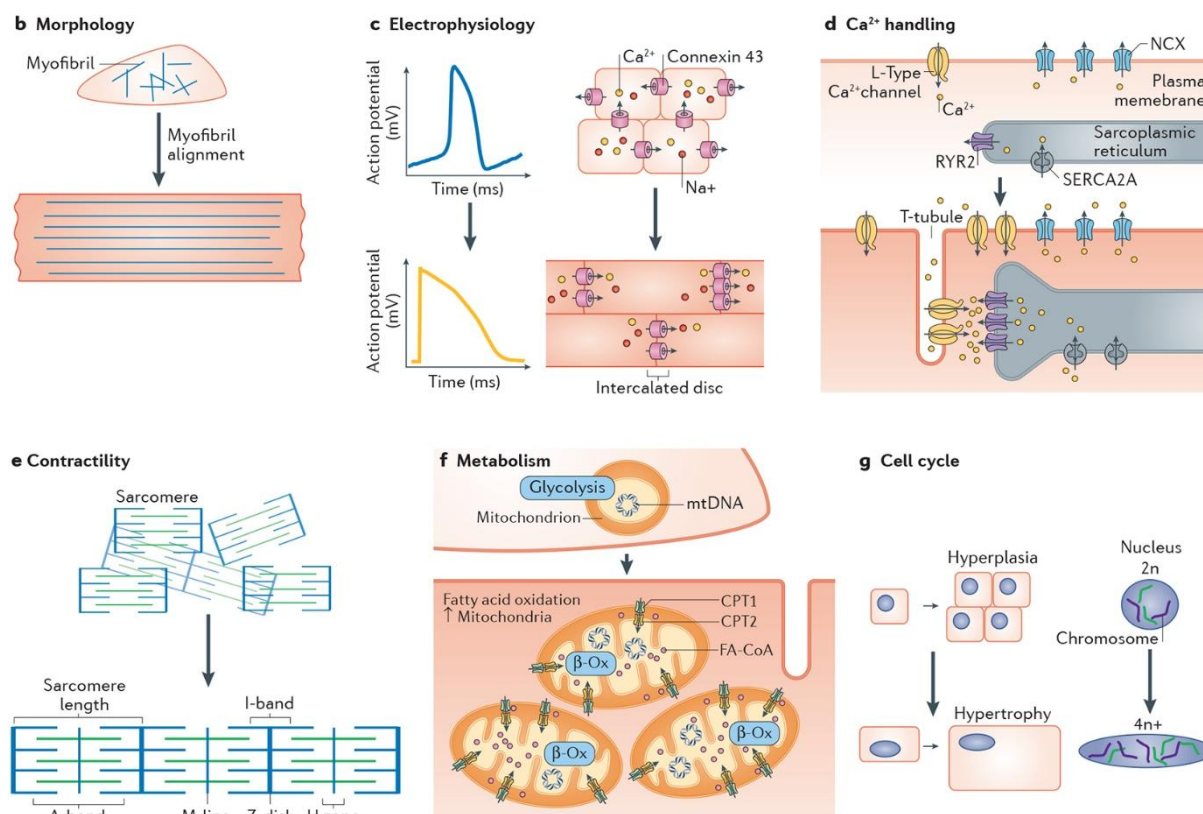


Figura 28: Características da maturação dos CMs. A maturação dos CMs ocorre como resultado de um conjunto de mudanças estruturais e dinâmicas. CPT: carnitina O-palmitoil transferase; FA-CoA: éster acil-CoA graxo; mtDNA: DNA mitocondrial; n: conteúdo haploide de cromossomos; NCX: trocador sódio-cálcio; RYR2: receptor de rianodina 2; SERCA2A: Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático/endoplasmático. Esquema retirado de: (Karbassi *et al.*, 2020)

10.2 Principais Fatores que influenciam na maturação cardíaca:

10.2.1 Fatores físicos e metabólicos: Diversos fatores físicos exercem papel determinante no desenvolvimento e na maturação dos CMs. Entre eles, destacam-se as propriedades mecânicas do microambiente ao qual essas células estão ancoradas, como a rigidez da matriz extracelular e a tensão mecânica gerada pela carga hemodinâmica. Evidências clássicas em mecanobiologia demonstram que a elasticidade do substrato regula diretamente organização citosquelética, alinhamento sarcomérico e força contrátil celular (ENGLER *et al.*, 2006). Substratos com rigidez semelhante à do miocárdio fisiológico promovem maior organização das miofibrilas e desenvolvimento estrutural mais próximo do fenótipo adulto, enquanto superfícies excessivamente rígidas ou excessivamente complacentes prejudicam essa organização.

Além da rigidez passiva do substrato, a aplicação ativa de carga mecânica constitui um potente indutor de maturação. Modelos de tecido cardíaco gerados por bioengenharia e submetidos a estimulação mecânica progressiva e estimulação elétrica demonstraram formação de túbulos-T funcionais, melhor acoplamento excitação–contração, maior densidade mitocondrial e propriedades eletrofisiológicas mais maduras (RONALDSON-BOUCHARD *et al.*, 2018). Esses achados indicam que estímulos mecânicos cíclicos, aplicados de forma regular e em intensidade fisiologicamente relevante, favorecem particularmente a organização e integridade dos sarcômeros, além de ativarem vias de mecanotransdução que modulam crescimento celular e saída do ciclo celular.

A própria geometria e dimensionalidade do cultivo também exercem influência crítica. De maneira consistente, culturas tridimensionais (3D) demonstram maior grau de maturação quando comparadas às culturas bidimensionais tradicionais. Sistemas 3D e co-culturas com fibroblastos cardíacos favorecem melhor alinhamento celular, formação mais robusta de discos intercalares, maior força contrátil e perfil de expressão gênica mais próximo do tecido cardíaco nativo (BEAUCHAMP *et al.*, 2020). A organização tridimensional permite não apenas melhor distribuição de forças mecânicas, mas também maior fidelidade na interação célula–matriz e célula–célula, elementos fundamentais para a consolidação do fenótipo adulto.

Além dos estímulos mecânicos, a composição metabólica do meio de cultura também exerce papel determinante na maturação dos CMs. A substituição parcial da glicose por substratos como galactose e ácidos graxos (mais condizentes com o metabolismo oxidativo predominante no miocárdio adulto) favorece a transição de um perfil glicolítico imaturo para um fenótipo metabolicamente mais maduro. Esse redirecionamento energético promove aumento da densidade e melhor alinhamento das miofibrilas, aprimoramento do manejo intracelular de Ca^{2+} , maior força contrátil e cinética de potencial de ação mais próxima do padrão fisiológico adulto (CORREIA *et al.*, 2017)

Em conjunto, esses dados demonstram que a maturação dos CMs não é determinada exclusivamente por programas genéticos ou fatores químicos solúveis, mas depende fortemente da integração de sinais físicos provenientes do microambiente. A rigidez da matriz, a carga mecânica cíclica e a arquitetura espacial do tecido atuam como

reguladores ativos do desenvolvimento estrutural e funcional cardíaco. Assim, compreender como esses estímulos físicos são traduzidos em respostas celulares é essencial para elucidar os mecanismos da maturação cardíaca *in vivo* e para aprimorar estratégias de engenharia tecidual e medicina regenerativa.

10.2.2 Fatores neuro-hormonais:

A maturação dos CMs é fortemente modulada por fatores solúveis sistêmicos e locais, que atuam coordenando crescimento celular, organização estrutural, metabolismo e função contrátil. Entre esses, destacam-se hormônios tireoidianos, glicocorticoides, Ang II, IGF-1 e peptídeos natriuréticos.

Os hormônios tireoidianos, especialmente o T3, exercem papel central na transição para o fenótipo adulto. Em modelo ovino, a infusão de T3 acelerou a maturação cardíaca, promovendo aumento do tamanho dos CMs (14%) e da taxa de binucleação (31%), concomitantemente à redução da proliferação celular (39%), indicando antecipação do programa maturacional em aproximadamente duas semanas (CHATTERGOON *et al.*, 2012). Em consonância, estudos *in vitro* demonstraram que o T3 induz hipertrofia, aumento da contratilidade e melhora da cinética do Ca^{2+} intracelular, além de estimular biogênese mitocondrial (YANG *et al.*, 2014). Em CMs derivados de células pluripotentes, o T3 promove maturação estrutural e funcional, incluindo melhor organização dos receptores de RyR2, dos canais de cálcio tipo L e aumento na formação de túbulos-T (HUANG *et al.*, 2020; PARIKH *et al.*, 2017). Esses achados consolidam o T3 como um importante indutor endócrino da maturação eletromecânica e metabólica.

De maneira semelhante, os glicocorticoides participam ativamente desse processo por meio da ativação do receptor de glicocorticoide (GR), codificado por *Nr3c1*. A mutação de *Nr3c1* compromete o alinhamento dos miócitos, promove desorganização sarcomérica e altera a expressão de genes envolvidos na montagem dos sarcômeros e na regulação do Ca^{2+} (ROG-ZIELINSKA *et al.*, 2013). Fisiologicamente, observa-se elevação acentuada dos níveis fetais de hidrocortisona nas fases finais da gestação ovina (MAGYAR *et al.*, 1979), sugerindo papel preparatório para o nascimento. Experimentalmente, a administração de cortisol em ovinos aumentou o peso cardíaco e marcadores mitóticos sem induzir hipertrofia, indicando possível efeito proliferativo dependente da dose (GIRAUD *et al.*, 2006). Em contraste, a exposição pré-natal a

glicocorticoides sintéticos, como dexametasona, reduziu a proliferação e favoreceu hipertrofia celular na prole, evidenciando efeito dose-dependente (SLOTKIN *et al.*, 1990). Em nível molecular Rog-Zielinska *et al.*, (2015) demonstraram que glicocorticoides fisiológicos promovem organização de discos Z, formação de miofibrilas maduras e aumento da atividade mitocondrial em CMs fetais, efeito mediado por indução de PGC-1 α ; o bloqueio dessa via compromete tanto a estrutura sarcomérica quanto a respiração mitocondrial, estabelecendo o eixo GR–PGC-1 α como mecanismo central da maturação (ROG-ZIELINSKA *et al.*, 2015). Além disso, a combinação de dexametasona com T3 induz formação inicial de túbulos-T e melhora da dinâmica do Ca²⁺ em CMs derivados de células-tronco, sugerindo ação sinérgica entre eixos hormonais (PARIKH *et al.*, 2017).

Ang II também atua como modulador maturacional. Em ovelhas, sua infusão aumentou o peso cardíaco, a área dos CMs e a proporção de células polinucleadas (SANDGREN, SCHOLZ e SEGAR, 2015). Em modelos derivados de células pluripotentes, a Ang II promoveu hipertrofia celular, aumento da expressão de genes sarcoméricos e melhor organização estrutural via ativação do receptor AT1 (WU *et al.*, 2013). Esses dados indicam que o sistema renina-angiotensina participa do crescimento e da reorganização estrutural miocárdica durante o desenvolvimento.

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo (IGF-1) representa outro eixo relevante, atuando por meio do IGF1-R e do receptor de insulina (INSR). Em CMs derivados de células pluripotentes, o tratamento com IGF-1 triplicou a proliferação e favoreceu maturação metabólica com incremento da fosforilação oxidativa (RUPERT e COULOMBE, 2017). Entretanto, o papel trófico do IGF-1 é complexo: a deleção simultânea de IGF1-R e INSR resultou em alterações sarcoméricas e mitocondriais graves, culminando em cardiomiopatia precoce nas primeiras semanas de vida (LAUSTSEN *et al.*, 2007). Esses achados indicam que o eixo IGF é essencial, mas paradoxal para o desenvolvimento (uma vez que IGF-1 se mostrou um fator trófico, mas também é capaz de induzir proliferação). Ainda assim, o IGF se mostrou importante tanto para o controle do crescimento quanto para a integridade estrutural, metabólica e proliferativa do miocárdio em maturação.

Por fim, os peptídeos natriuréticos (ANP e BNP) exercem papel regulador do crescimento cardíaco. Embora em adultos sejam secretados principalmente pelos

átrios em resposta ao estiramento, durante o desenvolvimento fetal tanto átrios quanto ventrículos produzem esses peptídeos. Diferentemente dos hormônios pró-hipertroficantes, ANP e BNP tendem a limitar a hipertrofia excessiva e modular o crescimento celular. Estudos demonstraram que o ANP regula o crescimento dos CMs e exerce efeito protetor contra hipertrofia exacerbada (ALEXANDER *et al.*, 2003; O'TIERNEY *et al.*, 2010). Em CMs embrionários isolados, o ANP aumentou a entrada na fase S bem como a síntese de DNA (KOIDE *et al.*, 1996). De forma semelhante, o tratamento com BNP em camundongos elevou o número total de CMs no coração, sendo mais um forte indicativo de sua atividade proproliferativa (BON-MATHIER *et al.*, 2022). Além disso, outros estudos reforçam o papel desses peptídeos, principalmente através de efeitos pró-proliferativos (ALI *et al.*, 2021; GIOVOU, GLADKA e CHRISTOFFELS, 2024).

Em conjunto, esses dados demonstram que a maturação cardíaca é profundamente influenciada por sinais neuro-humorais sistêmicos, os quais modulam de maneira integrada proliferação, hipertrofia, metabolismo e organização estrutural, determinando o momento e a direção da transição do fenótipo imaturo para o adulto.

10.2.3 Ação de outros tipos celulares no processo de maturação dos cardiomiócitos:

Durante a maturação cardíaca, células não miocitárias como fibroblastos, células endoteliais, células imunes e neurônios participam ativamente da organização estrutural e funcional dos CMs por meio de interações diretas (cross-talk) e/ou sinalização parácrina. Esse microambiente celular é determinante para que os CMs adquiram progressivamente um fenótipo adulto.

Os fibroblastos cardíacos, que correspondem a aproximadamente 27% das células do coração, são os principais responsáveis pela produção e remodelamento da matriz extracelular (MEC), tanto na fisiologia quanto na doença. Como discutido anteriormente, o substrato mecânico e estrutural ao qual os CMs estão ancorados é essencial para sua maturação adequada. Modelos de co-cultura demonstram que a presença de fibroblastos favorece a organização estrutural e a maturação contrátil dos CMs, enquanto sua ausência compromete esse processo (JANG *et al.*, 2025). Em modelos *in vivo*, a ablação genética de fibroblastos prejudica intensamente a formação

e o desenvolvimento dos CMs, sendo o colágeno identificado por análises de RNA-seq como um dos principais mediadores dessa maturação estrutural (WU, 2025). Além disso, *leda et al.*, (2009) demonstraram que fibroblastos exercem funções distintas conforme a fase do desenvolvimento: fibroblastos embrionários promovem proliferação de CMs via secreção de componentes da MEC, como fibronectina e colágeno, além de fatores semelhantes ao EGF, enquanto fibroblastos adultos contribuem para a organização sarcomérica por meio da secreção de citocinas como IL-6 e IL-1 α . Assim, os fibroblastos estabelecem o arcabouço estrutural e bioquímico necessário para a progressão maturacional dos CMs.

As células endoteliais, que representam a maior população celular do coração (~64%), também exercem papel central na maturação miocárdica. Em sistemas de co-cultura, CMs cultivados com células endoteliais apresentam maior densidade e alinhamento de sarcômeros, melhora da função contrátil e maior transição da isoforma de miosina Myh7 (fetal) para Myh6 (predominante no adulto) (LEE *et al.*, 2015). Entre os principais mediadores endoteliais destaca-se a neuregulina-1 (NRG-1), que atua por meio dos receptores ErbB2 e ErbB4 nos CMs, regulando vias pró-sobrevivência e crescimento celular (COLLIVA *et al.*, 2020). Além disso, a co-cultura com células endoteliais induz aumento de microRNAs como miR-125b-5p, miR-199a-5p, miR-221 e miR-222 nos CMs; a administração isolada desses microRNAs mimetiza os efeitos da co-cultura, promovendo melhorias estruturais e funcionais em CMs derivados de células pluripotentes (LEE *et al.*, 2015). Esses dados reforçam que o endotélio não atua apenas como componente vascular, mas como modulador ativo da maturação miocárdica.

Os leucócitos cardíacos residentes, que correspondem a cerca de 9% das células do coração, também participam desse processo. Macrófagos residentes exercem papel essencial na homeostase tecidual por meio da remoção de mitocôndrias disfuncionais e outros detritos celulares, contribuindo para a estabilidade metabólica do tecido (NICOLÁS-ÁVILA *et al.*, 2020). Durante o desenvolvimento, essa atividade fagocítica reduz estímulos pró-inflamatórios e favorece um ambiente permissivo à maturação estrutural, promovendo melhora na organização de proteínas sarcoméricas, aumento da força contrátil e otimização da cinética de relaxamento (HAMIDZADA *et al.*, 2024). Em modelos neonatais *in vivo*, a depleção transgênica de macrófagos compromete a

capacidade regenerativa e angiogênica do coração, indicando que essas células são necessárias para manutenção da proliferação dos CMs no período neonatal (AURORA *et al.*, 2014).

Todos esses achados demonstram que a maturação dos CMs não é um processo autônomo, mas um fenômeno multicelular coordenado, no qual matriz extracelular, vascularização, sinalização imune e modulação neural atuam de forma integrada. Por fim, os neurônios cardíacos também exercem influência relevante na maturação, especialmente por meio da modulação autonômica e da sinalização neuro-humoral. Considerando sua importância conceitual para o foco central deste capítulo, seu papel será discutido separadamente na seção seguinte.

10.3 SNA e maturação cardíaca.

No coração, a regulação neural é exercida predominantemente por fibras simpáticas e parassimpáticas, além de fibras sensoriais aferentes que participam do controle reflexo cardiovascular. Contudo, o sistema nervoso cardíaco não deve ser compreendido apenas como modulador do coração maduro. Ele coevoluiu com o órgão durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, participando ativamente da sua maturação estrutural e funcional. O crescimento e a organização espacial da inervação autonômica são guiados por fatores neurotróficos produzidos pelo próprio tecido cardíaco, como NGF (nerve growth factor) e BDNF (brain-derived neurotrophic factor), essenciais para sobrevivência, diferenciação e ramificação das fibras autonômicas (TAMPAKAKIS e MAHMOUD, 2021). Essa comunicação bidirecional estabelece um eixo coração–sistema nervoso fundamental para a organização do microambiente cardíaco.

A inervação simpática cardíaca inicia-se ainda no período pré-natal e continua a se expandir e especializar durante o período pós-natal, paralelamente à maturação estrutural e funcional do miocárdio (KREIPKE e BIRREN, 2015). O papel do SNS no desenvolvimento é tão crítico que sua ausência compromete a viabilidade embrionária: camundongos geneticamente modificados incapazes de sintetizar noradrenalina morrem majoritariamente ainda no ambiente intrauterino, e, dentre os poucos sobreviventes, apenas cerca de 5% atingem a idade adulta (THOMAS, MATSUMOTO e PALMITER, 1995). Esses dados evidenciam que a sinalização

adrenérgica não atua apenas como moduladora hemodinâmica, mas é fundamental para o desenvolvimento geral do animal.

Do ponto de vista celular, o SNS exerce influência direta sobre crescimento, organização sarcomérica e funcionalidade dos CMs (LINDSEY, 2014; NUNES *et al.*, 2013; TAMPAKAKIS e MAHMOUD, 2021). A ativação β -adrenérgica através do eixo β -AR/AMPC/PKA, promove aumento de contratilidade e estimula vias tróficas intracelulares associadas à hipertrofia fisiológica. Entretanto, sua participação na regulação do ciclo celular cardíaco tem se mostrado mais complexa. A simpatectomia química neonatal reduz o número total de CMs e o tamanho do coração, sugerindo que a inervação simpática é necessária para a redução da proliferação durante a janela pós-natal precoce (ELIEZECK *et al.*, 2024; KREIPKE e BIRREN, 2015). Por outro lado, Liu *et al.*, (2019) demonstraram que a deleção de receptores β -adrenérgicos ou o bloqueio farmacológico com atenolol aumentam a taxa proliferativa após infarto, indicando que a sinalização β -AR pode também participar do encerramento da janela proliferativa e da transição para crescimento hipertrófico. Esses achados sugerem que o SNS atua como regulador fino do “switch” proliferativo–hipertrófico, modulando a transição do crescimento hiperplásico para hipertrofia e especialização funcional. É plausível que essa regulação envolva controle de genes da citocinese, da organização sarcomérica e da reprogramação metabólica, coordenando o timing maturacional do miocárdio.

O SNP, por sua vez, também amadurece em paralelo ao desenvolvimento cardíaco. A inervação colinérgica origina-se principalmente do nervo vago (X par craniano) e é classicamente descrita como mais densa nos átrios e no nó sinoatrial; contudo, evidências anatômicas recentes demonstram a presença de fibras colinérgicas também nos ventrículos, especialmente durante o desenvolvimento (TAMPAKAKIS e MAHMOUD, 2021). Embora historicamente associado sobretudo ao controle cronotrópico negativo, o SNP parece exercer funções tróficas relevantes no coração imaturo.

Estudos experimentais demonstraram que a sinalização colinérgica pode exercer efeito positivo sobre a proliferação cardíaca no período neonatal, e que seu bloqueio farmacológico ou cirúrgico reduz a taxa proliferativa dos CMs (MAHMOUD *et al.*, 2015). Além disso, evidências do nosso grupo indicam que CMs possuem maquinaria

colinérgica endógena funcional, capaz de modular respostas hipertróficas e antagonizar efeitos tróficos mediados pela estimulação simpática (ROCHA-RESENDE *et al.*, 2012). Esses achados sustentam a hipótese de que o balanço adrenérgico–colinérgico seja determinante para o crescimento cardíaco adequado, influenciando tanto a duração da janela proliferativa quanto a transição para hipertrofia fisiológica.

Em conjunto, as evidências indicam que o crescimento e a maturação cardíaca não dependem da ativação isolada de vias simpáticas ou parassimpáticas, mas do equilíbrio dinâmico entre elas. O SNS parece favorecer a especialização funcional e a transição do crescimento proliferativo para a hipertrofia fisiológica, enquanto o sistema parassimpático pode atuar como modulador da duração da janela proliferativa e como freio de respostas hipertróficas excessivas. Assim, não é apenas a presença dessas vias que determina o desfecho maturacional, mas a intensidade relativa, o momento de ativação e o grau de predominância de cada uma ao longo do desenvolvimento. Esse balanço autonômico funciona de forma harmônica e alterações nesse equilíbrio, seja por hiperativação simpática, seja por redução excessiva da sinalização colinérgica ou o inverso, podem desorganizar esse processo coordenado, impactando a transição adequada entre proliferação e hipertrofia e comprometendo a maturação global do miocárdio.

Apesar desses avanços conceituais, as evidências sobre a influência direta e quantitativa da sinalização parassimpática na maturação estrutural ainda são limitadas. Assim, compreender como variações na atividade colinérgica modulam esse equilíbrio autonômico representa uma lacuna relevante no campo e pode revelar mecanismos regulatórios fundamentais do desenvolvimento pós-natal do coração.

11 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE CENTRAL (Capítulo II)

A medicina regenerativa consiste no campo da medicina voltado ao reparo, à substituição ou à regeneração de células, tecidos e órgãos danificados, com o objetivo de restaurar sua função estrutural e fisiológica. No contexto cardiovascular, essa abordagem assume relevância particular, uma vez que o coração humano apresenta capacidade regenerativa extremamente limitada. Estudos demonstraram que a taxa de renovação de CMs em humanos adultos é inferior a 1% ao ano, declinando progressivamente com a idade (BERGMANN et al., 2009).

Essa limitação biológica impõe um desafio central aos estudos sobre cardiologia. Durante eventos como o infarto agudo do miocárdio, ocorre morte maciça de CMs por necrose e apoptose decorrente da falta de suprimento sanguíneo. Como consequência, a região lesada é progressivamente substituída por tecido fibroso cicatricial, composto predominantemente por matriz extracelular sintetizada principalmente pelos fibroblastos (tópico já abordado). Embora esse processo seja essencial para a integridade estrutural da parede ventricular, o tecido cicatricial não apresenta atividade contrátil significativa, comprometendo a função sistólica e favorecendo remodelamento ventricular adverso e progressão para insuficiência cardíaca (FRANGOGIANNIS, 2015).

Nesse cenário, a proposta da medicina regenerativa cardíaca é teoricamente simples: substituir os CMs perdidos por novos CMs funcionalmente competentes, capazes de se integrar funcionalmente ao miocárdio remanescente. Entretanto, apesar de teoricamente simples, essa estratégia enfrenta obstáculos biológicos importantes. Atualmente, CMs podem ser obtidos a partir de células-tronco embrionárias ou células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), por meio da modulação sequencial de vias de sinalização do desenvolvimento cardíaco, como Wnt/ β -catenina. Contudo, os CMs derivados de células pluripotentes (hiPSC-CMs) apresentam fenótipo imaturo, semelhante ao de CMs fetais ou neonatais, o que compromete sua aplicação translacional (a comparação entre CMs adultos, neonatais e hiPSC-CMs pode ser observado na figura 29).

Do ponto de vista morfológico, CMs adultos humanos apresentam formato alongado e altamente organizado, com dimensões médias de aproximadamente 150 μ m de

comprimento, 20 μm de largura e 15 μm de altura, além de sarcômeros bem alinhados e sistema túbulo-T desenvolvido. Em contraste, hiPSC-CMs possuem morfologia mais arredondada ou fusiforme, com cerca de 30 μm de comprimento, 10 μm de largura e 5–10 μm de altura, organização sarcomérica incompleta e ausência de um sistema túbulo-T maduro. Curiosamente, esse padrão imaturo se mantém independentemente do tempo de cultura (KARBASSI *et al.*, 2020; SNIR *et al.*, 2003).

Além disso, as diferenças funcionais são ainda mais limitantes para o transplante funcional dessas células. hiPSC-CMs apresentam metabolismo predominantemente glicolítico, menor densidade mitocondrial, cinética de Ca^{2+} imatura e perfil eletrofisiológico caracterizado por elevada expressão de canais HCN4, associados à corrente I_f . Essa característica confere automaticidade aumentada às células transplantadas, o que pode resultar em arritmias ventriculares após o implante, fenômeno já observado em modelos pré-clínicos de primatas (GUO e PU, 2020; LIU *et al.*, 2018; MAROLI e BRAUN, 2021)

Autores como Guo e Pu,(2020) sugerem que a escassez de conhecimento acerca dos processos relacionados à maturação cardíaca é o principal limitante para o avanço da medicina regenerativa cardíaca. Portanto, entender os mecanismos que governam o desenvolvimento dos CMs é extremamente importante para o avanço de terapias que visam o transplante de células diferenciadas em cultura. Mostramos recentemente a influência do sistema adrenérgico no desenvolvimento maturacional cardíaco. Assim, considerando que o balanço autonômico exerce influência determinante sobre crescimento, metabolismo, excitabilidade e remodelamento (ELIEZECK *et al.*, 2024) hipotetizamos, que a sinalização colinérgica particularmente via receptores muscarínicos acoplados à proteína G_i desempenhe papel relevante na maturação estrutural e funcional dos CMs no período pós-natal.

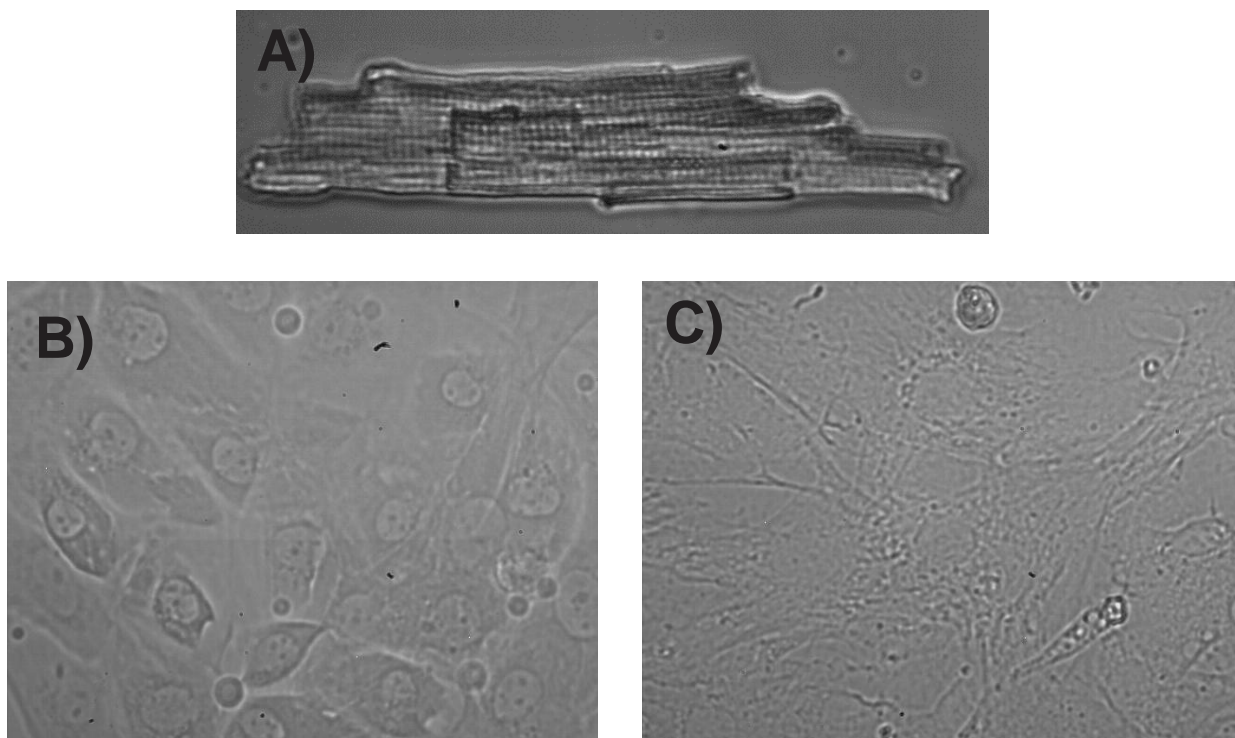


Figura 29: Comparativo morfoestructural entre diferentes CMs aislados A) adulto~12 semanas; B) Neonatal 1-3 días e C) hiPSCM. Imagens retiradas de Scalzo et.al., (2021)

12 OBJETIVOS (Capítulo II)

12.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar o papel da sinalização colinérgica e da via Gi no desenvolvimento cardíaco pós-natal.

12.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

12.2.1 Investigar o impacto de alterações da atividade colinérgica na maturação de CMs *in vivo*;

12.2.2 Investigar o impacto de alterações da atividade colinérgica na maturação de CMs *in vitro*;

13 MATERIAIS E METODOS (Capítulo II)

13.1 Animais:

13.1.1 Aumento sistêmico na disponibilidade de acetilcolina: Como modelo de aumento de disponibilidade de ACh, utilizamos o camundongos Chat-ChR2 (B 6.Cg - Tg(ChAT.COP4_H134R/EYFP,Slc18a3)6Gfng/J,C57BL/6,JAX; RID:IMSR_JAX:014546)(KOLISNYK *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2021). Esses camundongos exibem expressão aumentada do transportador vesicular de ACh (VACHT), como mostrado na Figura 30. CEUA 32/2025.

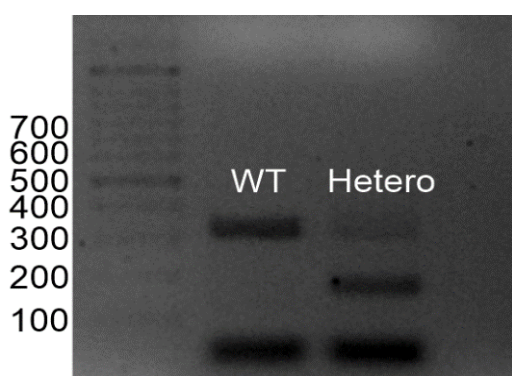


Figura 30: Bandas obtidas a partir da genotipagem de animais Chat-ChR2 (SuperVACHT): Revelação do gel de agarose com amplicons de 140pb identificando animais com o alelo mutante e 300pb identificando animais WT; 140+300pb identificando animais heterozigotos (+/-). Após separação em gel de agarose 1% em TAE 1x, a presença das bandas foi revelada no equipamento ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager por estimulação ultravioleta.

13.1.2 Diminuição sistêmica na disponibilidade de acetilcolina: Como modelo de redução da disponibilidade sistêmica de ACh, utilizamos os camundongos VACHT -KD^{HET} e VACHT -KD^{HOM} (PRADO *et al.*, 2006) . Ao contrário do animal anterior, esses animais apresentam expressão reduzida de VACHT resultando em menor armazenamento e liberação de ACh pelas vesículas (Figura 31).

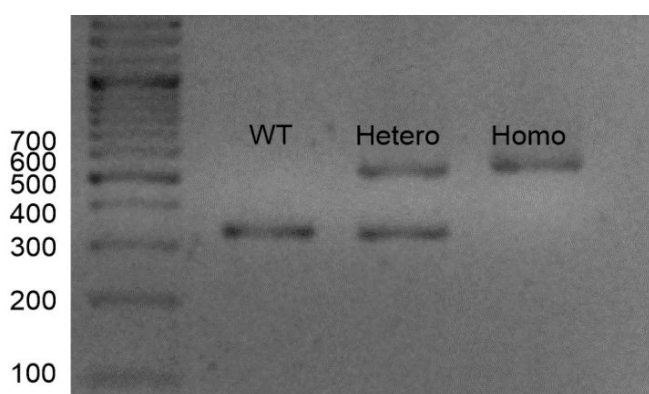
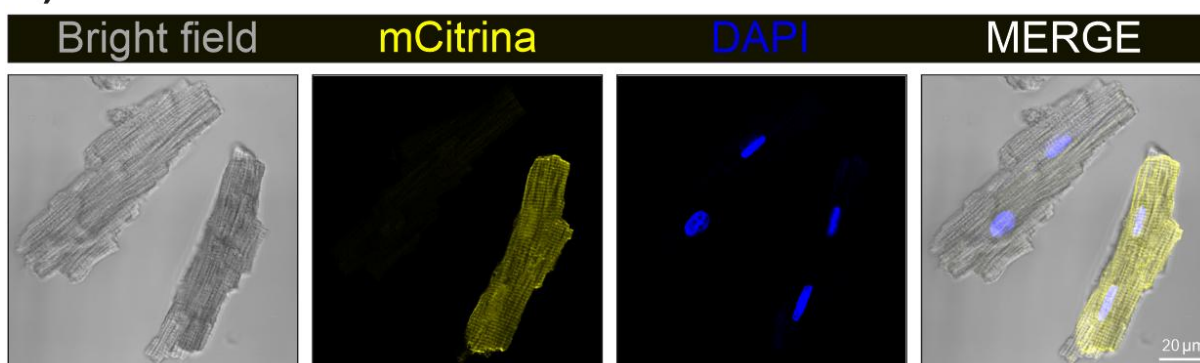


Figura 31: Bandas obtidas a partir da genotipagem de animais VACHT-KD. Revelação do gel de agarose com amplicons de 530pb identificando animais mutante homozigoto (+/+) e 330pb identificando animais WT; 330+530pb identificando animais heterozigotos (+/-). Após separação em gel de agarose 1% em TAE 1x, a presença das bandas foi revelada no equipamento ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager por estimulação ultravioleta.

13.1.3 Ativação Seletiva de Gi em Cardiomiócitos: Para ativar a sinalização de Gi especificamente em CMs, usamos um princípio semelhante ao descrito no item 5.1, porém, desta vez, oferecemos a enzima Cre por meio do vetor viral. Injetamos AAV9 contendo a recombinase Cre sob o controle do promotor da troponina T cardíaca

(BrainVTA #plasmid-1451; 0,3 μ l por animal ($\sim 1,7 \times 10^9$ partículas virais) em camundongos R26-LSL-hM4Di-DREADD previamente genotipados e com o genótipo confirmado de homozigose. Após a recombinação mediada por Cre, obteve-se um padrão em mosaico no qual $\sim 30\%$ dos CMs expressaram o receptor hM4Di-DREADD Figura 32. Essa abordagem permitiu a ativação seletiva da via Gi, correspondente à sinalização canônica desencadeada pelos receptores muscarínicos de ACh em CMs (ver Figura 32).

A)



B)

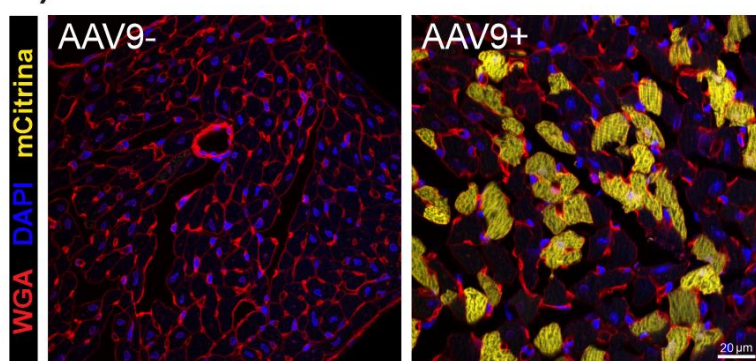


Figura 32. Eficácia da transdução pelo vetor viral AAV9: Imagem representativa de CMs isolados (A) e criocortes de tecido cardíaco (B) de animais hM4Di tratados ou não com o vírus adeno-associado demonstrando a expressão do receptor DREADD em CMs. A expressão do receptor foi confirmada pela detecção do repórter autofluorescente mCitrina (amarelo).

Os camundongos foram mantidos em instalações localizadas no Departamento de Fisiologia e Biofísica (UFMG) sob condições de temperatura controlada (25-28 °C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com acesso *ad libitum* a uma dieta padrão (Nuvilab CR1, Quimtia). Os procedimentos foram conduzidos seguindo protocolos aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da UFMG (32/2025 e 29/2021). Em todos os experimentos, irmãos não mutantes foram usados como controles.

13.2 Cultura primária de cardiomiócitos: CMs foram obtidos de corações de ratos Wistar de 1 a 3 dias de idade, utilizando um kit de dissociação enzimática (Worthington

Biochemical Corporation), conforme as instruções do fabricante. As células foram suspensas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg /ml) e anfotericina B (0,25 µg/ml). As culturas foram mantidas a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Após 48h, o meio foi substituído por DMEM fresco contendo 20 µg/mL de citosina β-D-arabinofuranosídeo (Ara-C) para suprimir a proliferação de células não miocitárias. As células foram utilizadas para os experimentos no quarto dia de cultura.

13.3 Tratamento de camundongos e células: Para os experimentos *in vivo*, os camundongos hM4Di receberam injeções intraperitoneais diárias de N-óxido de clozapina (CNO; 0,5 mg/kg/dia, número de catálogo da Abcam ab141704) do P11 ao P20.

Para os ensaios *in vitro*, os CMs neonatais em cultura foram expostos aos seguintes agentes farmacológicos: acetilcolina (ACh; 100 nmol/L; Sigma-Aldrich, número de catálogo A5751), vesamicol (Ves; 50 µmol/L; Sigma-Aldrich, número de catálogo V104), atropina (Atr; 10 µmol/L; Sigma-Aldrich, número de catálogo A0257) e piridostigmina (Pyr; 1 mmol/L; Sigma-Aldrich, número de catálogo P9797).

14. RESULTADOS (capítulo II)

Neste capítulo, investigaremos de forma sistemática as alterações precoces e tardias associadas a maturação cardíaca e o impacto da sinalização colinérgica nesta etapa do desenvolvimento. O coração murino apresenta uma dinâmica temporal bem caracterizada após o nascimento, marcada por uma fase inicial predominantemente proliferativa, seguida de alterações estruturais e funcionais. É amplamente descrito que a janela proliferativa dos CMs em camundongos se encerra aproximadamente ao final da primeira semana de vida pós-natal (P8), momento em que ocorre uma transição progressiva do crescimento hiperplásico para o crescimento predominantemente hipertrófico. Posteriormente, o coração entra em uma fase de alteração metabólica e eletrofisiológica, que finaliza por volta de P21, com o final do processo de maturação. Ao final desta fase, os CMs apresentam organização sarcomérica bem definida, acoplamento excitação-contração desenvolvido e perfil metabólico predominantemente oxidativo. (ELKHOURY *et al.*, 2024; GUO e PU, 2020; KARBASSI *et al.*, 2020 e MAROLI e BRAUN, 2021)

Diante dessa organização temporal do desenvolvimento cardíaco, adotamos neste capítulo uma estratégia experimental que aborda dois pontos críticos do período pós-natal: P8, representando a fase final da janela proliferativa, que possibilita a detecção de alterações maturacionais precoces; e P21, correspondendo a um estágio avançado de maturação cardíaca, possibilitando a identificação de alterações tardias. Além disso, utilizamos culturas de CMs neonatais como abordagem complementar, permitindo a investigação mecanística em ambiente controlado. Essa combinação experimental oferece uma análise integrada dos efeitos da intervenção tanto sobre a proliferação inicial, quanto sobre os processos subsequentes de maturação estrutural e funcional do miocárdio.

14.1 O aumento global dos níveis de ACh retarda a maturação cardíaca.

Para promover um aumento sistêmico da disponibilidade de ACh, utilizamos um modelo transgênico previamente caracterizado pelo nosso grupo, que apresenta a superexpressão do transportador vesicular de ACh (VACHT). Este modelo é denominado Chat-ChR2 ou, de forma simplificada, SuperVACHT. Nesse modelo, o aumento da expressão de VACHT potencializa o carregamento vesicular de ACh e sua subsequente liberação sináptica, resultando em um aumento aproximado de 40%

na disponibilidade do neurotransmissor (KOLISNYK *et al.*, 2013). O esquema representativo desse modelo experimental encontra-se ilustrado na Figura 33A.

Nosso primeiro objetivo foi investigar se o aumento global da ACh seria capaz de modular a dinâmica proliferativa dos CMs no período pós-natal precoce, especificamente em P8, momento crítico que marca o encerramento da janela proliferativa. Esse ponto temporal é amplamente utilizado como referência para avaliar se o processo de maturação cardíaca está seguindo o curso fisiológico previsto, caracterizado pela transição do crescimento hiperplásico para o crescimento predominantemente hipertrófico.

A análise foi realizada por imunofluorescência para Ki67, marcador clássico de proliferação celular, permitindo a quantificação de CMs em ciclo celular ativo. Observamos que o aumento sistêmico de ACh esteve associado à manutenção da atividade proliferativa além do período esperado. Os animais Chat-ChR2 apresentaram aproximadamente o dobro de células Ki67⁺ por campo quando comparados aos animais WT da mesma ninhada no oitavo dia pós-natal (Figuras 1B–C). Esses achados sugerem que o aumento da sinalização colinérgica pode prolongar a janela proliferativa dos CMs, indicando um possível atraso no programa de maturação cardíaca. Esse prolongamento da fase proliferativa implica, conceitualmente, uma postergação da transição do perfil hiperplásico para o perfil hipertrófico, evento central no desenvolvimento estrutural e funcional do miocárdio pós-natal.

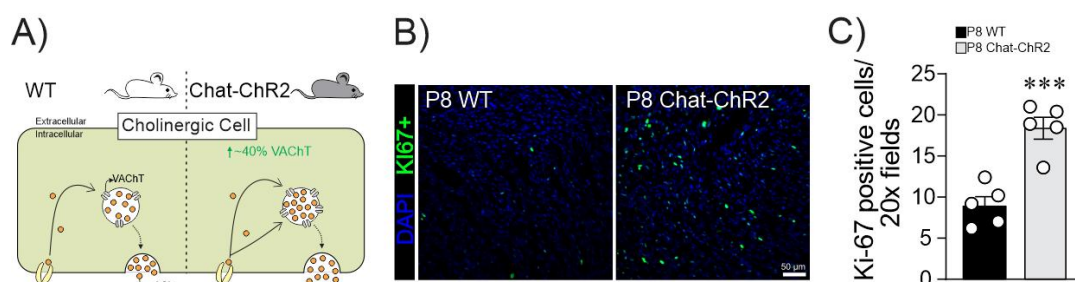


Figura 33. O aumento sistêmico da atividade colinérgica estende a janela proliferativa dos cardiomiócitos. A) Representação esquemática da geração do modelo de camundongo Chat-ChR2. **B)** Imagens representativas de crioseções cardíacas coradas com DAPI (azul) e Ki67 (verde). Barra de escala: 50 μm. **C)** Gráfico de barras mostrando o aumento do número de células Ki67⁺ em camundongos Chat-ChR2 (n=5 corações/grupo). Os dados nos gráficos de barras são apresentados como média ± erro padrão. As comparações estatísticas foram realizadas usando o teste t de Student. ***p < 0,001.

Como previamente discutido, a expansão da janela proliferativa dos CMs está intimamente associada a uma redução proporcional do crescimento hipertrófico subsequente. Em outras palavras, a manutenção prolongada do estado proliferativo tende a retardar a transição para o crescimento celular baseado em aumento de volume e síntese proteica, processo fundamental para a maturação estrutural do miocárdio (KARBASSI et al., 2020; MAROLI e BRAUN, 2021). Assim, o aumento da proliferação está inversamente relacionado ao crescimento hipertrófico dos CMs no período pós-natal. Com base nessa premissa, investigamos se o atraso maturacional observado em P8 persistiria até um estágio mais avançado do desenvolvimento, especificamente em P21, ponto temporal associado à consolidação da maturação cardíaca.

Em consonância com os achados descritos na Figura 33, os animais Chat-ChR2 apresentaram redução do peso cardíaco normalizado pelo comprimento da tíbia (Figura 34A), sugerindo um menor crescimento global do miocárdio. Para determinar se essa alteração refletia mudanças intrínsecas à morfologia dos CMs, realizamos o isolamento de CMs ventriculares seguido de análise morfométrica. Observamos redução significativa em parâmetros estruturais clássicos associados à hipertrofia fisiológica pós-natal, incluindo menor comprimento, largura e área celular nos animais Chat-ChR2, quando comparados aos seus littermates (Figura 34B–E). Esses dados reforçam a hipótese de que o aumento sistêmico da ACh impacta diretamente o crescimento estrutural dos CMs.

Dando continuidade à caracterização do estado maturacional, avaliamos o padrão de polinucleação dos CMs, um marcador reconhecido de maturação. Embora a frequência de células binucleadas não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, observamos aumento na proporção de CMs mononucleados nos animais Chat-ChR2 (Figura 34F-G). Considerando que a polinucleação está associada ao aumento da capacidade biossintética e à consolidação do crescimento hipertrófico, a maior proporção de células mononucleadas sugere a manutenção de um fenótipo estruturalmente mais imaturo (ELKHOURY et al., 2024).

Em conjunto, esses achados demonstram que a elevação sistêmica da disponibilidade de ACh não apenas prolonga a fase proliferativa dos CMs, como também retarda sua

maturação estrutural até estágios mais tardios do desenvolvimento pós-natal. Esses resultados reforçam o papel modulador do sistema colinérgico na regulação temporal do desenvolvimento cardíaco, sugerindo que a sinalização colinérgica atua como um determinante crítico no equilíbrio entre proliferação e hipertrofia durante o desenvolvimento miocárdico.

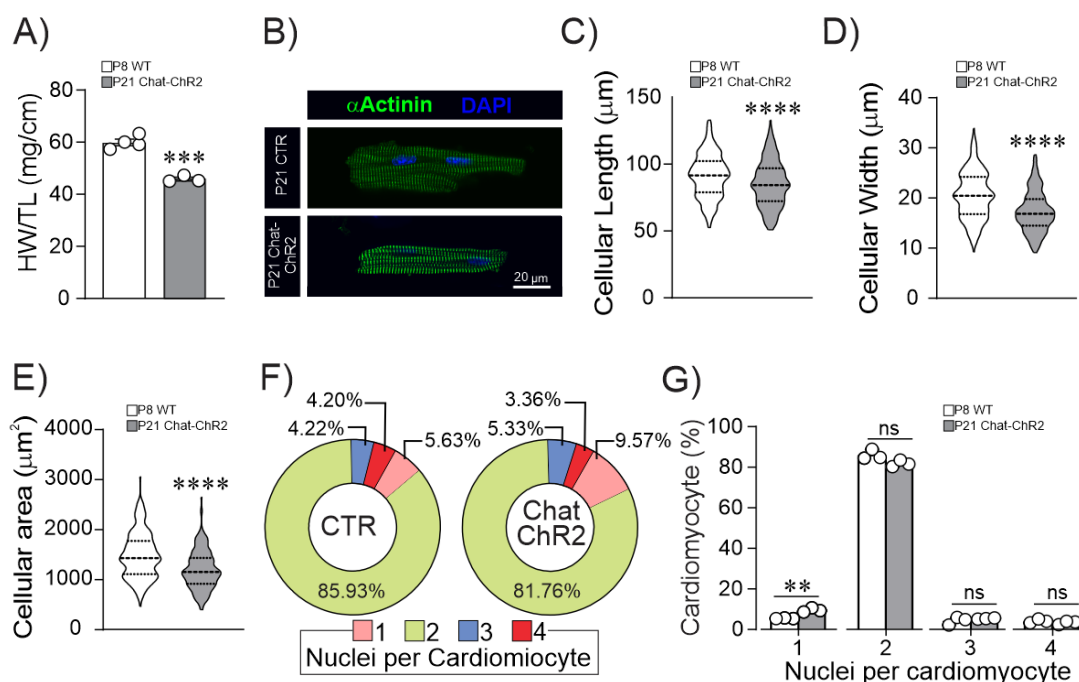


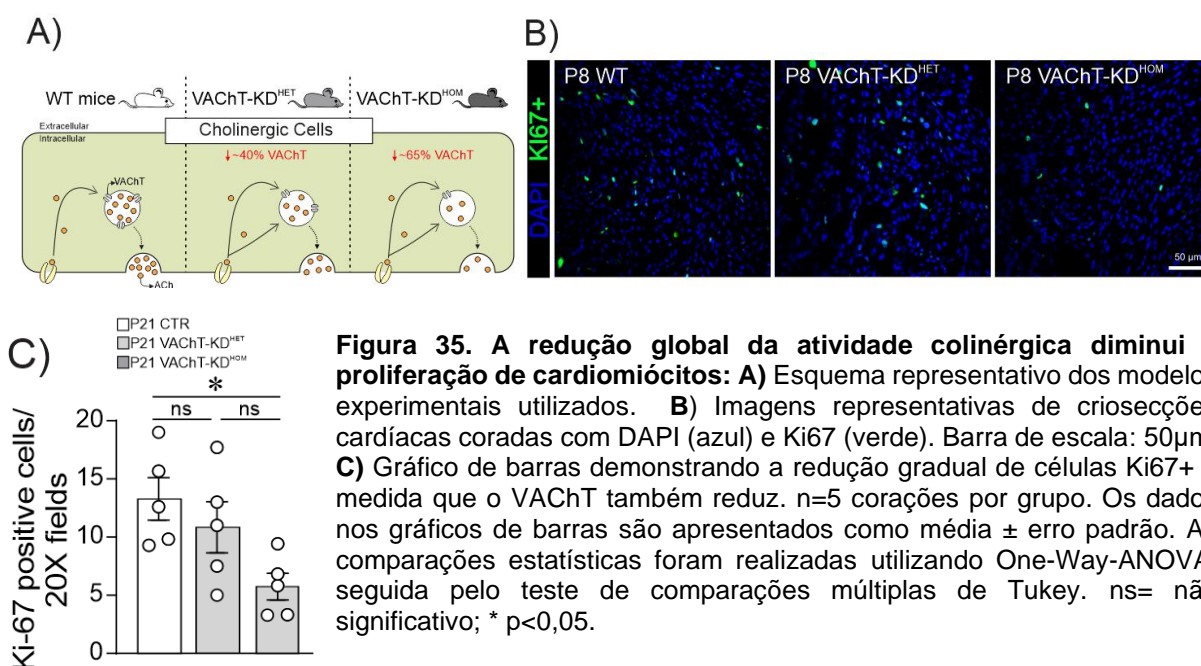
Figura 34. O aumento na disponibilidade de ACh compromete o crescimento hipertrófico e aumenta o pool de cardiomiócitos mononucleados. **A)** Gráfico de barras mostrando a redução da razão HW/TL (n=3–4 corações/grupo). **B)** Imagens representativas de CMs isolados corados com α actinina (verde) e DAPI (azul). Barra de escala: 20 μ m. **C–E)** Gráficos de violino representando o comprimento (C), a largura (D) e a área celular (E) dos CMs. Número de células/coração: CTR=281/3; Chat-ChR2=238/3. As linhas tracejadas grossas e finas indicam as medianas e os percentis de 25–75%, respectivamente. **F)** Perfil de nucleação de CMs nos grupos CTR e Chat-ChR2. **G)** Gráfico de barras mostrando que a nucleação de CMs está alterada em camundongos Chat-ChR2, com uma proporção aumentada de células mononucleadas. CTR=442/3; Chat-ChR2=404/3. Os dados nos gráficos de barras são apresentados como média \pm erro padrão. As comparações estatísticas foram realizadas usando o teste t de Student. ns = não significativo; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

14.2 A redução global da ACh acelera a maturação cardíaca

Com o objetivo de fortalecer e validar os achados obtidos no modelo de aumento sistêmico de ACh, adotamos uma estratégia complementar baseada na manipulação oposta da sinalização colinérgica, reduzindo sistemicamente a disponibilidade de ACh. Para isso, utilizamos um modelo transgênico com diminuição global do VAcHT desenvolvido por Prado *et al.*, (2006), caracterizado pela redução da expressão desse

transportador, essencial para o armazenamento e liberação eficiente do neurotransmissor.

Nesse modelo, os animais VACHT-KD^{het} (heterozigotos) apresentam redução aproximada de 40% na expressão de VACHT, enquanto os animais VACHT-KD^{hom} (homozigotos) exibem redução mais acentuada, em torno de 65%. Essa estratégia experimental nos permitiu estabelecer um gradiente de diminuição da disponibilidade de ACh, possibilitando a análise de possíveis efeitos concentração-dependentes da sinalização colinérgica sobre o desenvolvimento cardíaco. Portanto, além dos animais littermates sem a mutação, que representam o grupo controle (WT), incluímos dois grupos experimentais distintos: heterozigotos e homozigotos. Esta abordagem tem como objetivo investigar se as alterações estruturais e maturacionais previamente observadas no modelo de superexpressão seriam reproduzidas em sentido inverso e, principalmente, se ocorreriam de maneira progressiva à medida que a redução da ACh se tornasse mais pronunciada. O modelo esquemático dos grupos experimentais é demonstrado na figura 35 A. Constatamos que no P8, animais VACHT homozigotos, mas não os heterozigotos, apresentaram menor número de CMs em proliferação (células Ki67⁺ por campo, Figura 35 B-C), indicando uma transição mais precoce de um perfil de crescimento proliferativo para hipertrófico.



Seguindo o mesmo racional descrito anteriormente, avaliamos em seguida se a redução sistêmica da disponibilidade de ACh impactaria o crescimento cardíaco global e o desenvolvimento estrutural dos CMs em P21. Embora não tenhamos observado diferença estatisticamente significativa entre os animais heterozigotos (VAcHT-KD^{het}) e os controles (WT), foi possível identificar uma tendência de aumento progressivo no peso cardíaco à medida que a disponibilidade de ACh reduzia. Essa tendência tornou-se significativa nos animais homozigotos (VAcHT-KD^{hom}), que apresentaram aumento do peso cardíaco em comparação aos WT, sugerindo que a redução mais acentuada da sinalização colinérgica favorece maior crescimento miocárdico.

A fim de determinar se essa alteração refletia modificações intrínsecas aos CMs, realizamos análise morfométrica de células ventriculares isoladas. Observamos hipertrofia significativa nos CMs de animais VAcHT-KD^{hom}, evidenciada pelo aumento da área celular, comprimento e largura, quando comparados aos controles WT (Figura 36B–F). Notavelmente, a magnitude da hipertrofia apresentou caráter gradual e proporcional ao grau de redução da expressão de VAcHT, sendo possível observar diferenças inclusive entre os grupos heterozigoto e homozigoto. Esses achados sugerem uma associação proporcional entre a quantidade de ACh e o grau de crescimento hipertrófico dos CMs, reforçando o papel modulador do tônus colinérgico no controle do desenvolvimento estrutural do miocárdio.

O aumento do tamanho celular refletiu-se também no padrão de nucleação dos CMs. Observamos redução na proporção de células binucleadas nos animais com menor disponibilidade de ACh, particularmente no grupo VAcHT-KD^{hom}, acompanhada por aumento na frequência de CMs tetranucleados. Esse padrão sugere que a redução da sinalização colinérgica não apenas acelera o crescimento hipertrófico, mas também favorece maior atividade de replicação nuclear sem citocinese completa, fenômeno classicamente associado ao processo de maturação e consolidação da hipertrofia pós-natal.

Em conjunto, esses resultados indicam que a diminuição sistêmica da ACh promove um avanço no programa de crescimento hipertrófico dos CMs, em contraste com o atraso maturacional observado no modelo de superexpressão. Assim, os dados provenientes dos modelos bidirecionais convergem para sustentar a hipótese de que a sinalização colinérgica ativada atua como reguladora negativa do crescimento

hipertrofico no desenvolvimento cardíaco pós-natal, modulando de forma dependente da intensidade o equilíbrio entre proliferação, hipertrofia e polinucleação.

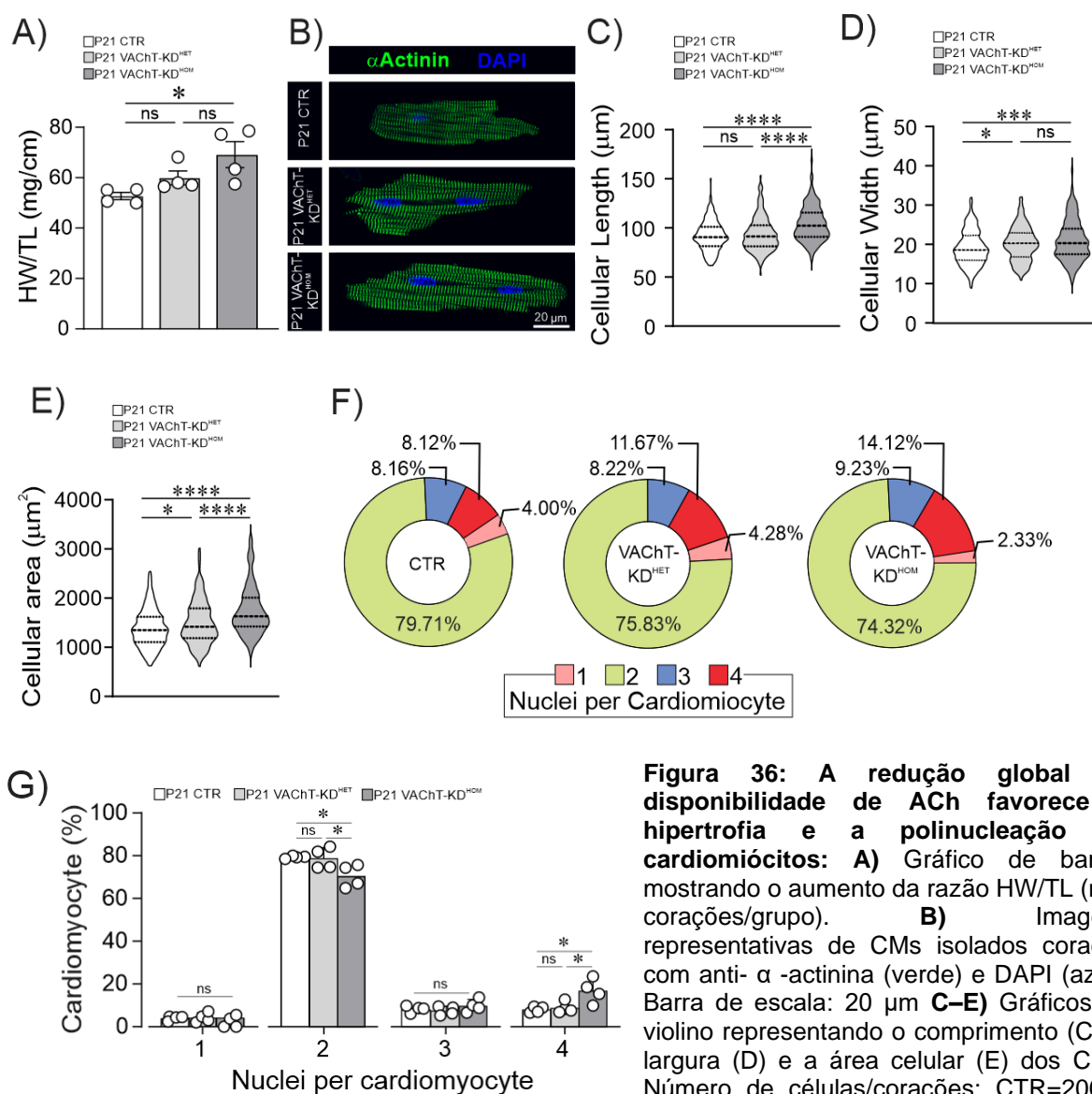


Figura 36: A redução global da disponibilidade de ACh favorece a hipertrofia e a polinucleação de cardiomiócitos: A) Gráfico de barras mostrando o aumento da razão HW/TL (n=4 corações/grupo). **B)** Imagens representativas de CMs isolados corados com anti- α -actinina (verde) e DAPI (azul). Barra de escala: 20 μ m **C–E)** Gráficos de violino representando o comprimento (C), a largura (D) e a área celular (E) dos CMs. Número de células/corações: CTR=200/4;

VACHT-KD^{HET} =170/4; VACHT-KD^{HOM} =151/4. As linhas tracejadas grossas e finas indicam as medianas e os percentis de 25–75%, respectivamente. **G)** Perfil de nucleação de CMs em CTR e VACHT-KD. **H)** Gráfico de barras mostrando que a nucleação de CMs está alterada em camundongos VACHT-KD^{HOM}, com uma proporção reduzida de células binucleadas e uma proporção aumentada de células tetranucleadas. CTR 345/4; VACHT-KD^{HET}:289/4 e VACHT-KD^{HOM}: 272/4. Os dados nos gráficos de barras são apresentados como média \pm erro padrão. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando One-Way-ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. ns= não significativo, * p < 0,05, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

14.3 Os efeitos da ACh sobre a maturação ocorrem predominantemente através do eixo ACh-M2-Gi.

Diante dos efeitos da ACh sobre a maturação cardíaca observados nos modelos sistêmicos, tornou-se fundamental determinar qual via celular predominava na mediação desses fenômenos. Embora os modelos descritos nos capítulos 11.1 e 11.2 tenham sido essenciais para caracterizar o efeito biológico, sua natureza sistêmica impunha limitações mecânicas, pois não permitia distinguir ações diretas sobre os CMs de efeitos decorrentes da estimulação colinérgica global, como a ativação em outros tipos celulares ou a redução da frequência cardíaca.

Com o objetivo de investigar se os efeitos observados eram diretamente mediados pela ativação de Gi nos CMs, empregamos um modelo mais seletivo baseado no receptor DREADD hM4Di, previamente desenvolvido e validado por nosso grupo no Capítulo I. Contudo, diferentemente da estratégia genética utilizada anteriormente, que foi baseada no cruzamento entre animais Myh6-Cre e hM4Di, neste conjunto de experimentos optamos por uma abordagem diferente. Utilizamos um vetor viral carreando a enzima Cre sob o controle do promotor da troponina T (TnT), garantindo especificidade para CMs. Essa estratégia resultou em um coração em mosaico, no qual apenas parte dos CMs expressa o receptor mutante hM4Di. A eficiência de infecção e a proporção aproximada de CMs positivos foram determinadas conforme descrito na metodologia (item 2.1.5). Esse desenho experimental oferece uma vantagem importante: permite a comparação direta entre CMs positivos e negativos dentro do mesmo coração, reduzindo significativamente variáveis sistêmicas e fortalecendo a inferência causal.

É importante destacar que a injeção do vetor viral em camundongos hM4Di no P0 assegura a expressão do receptor mutante, mas não sua ativação. A ativação seletiva de Gi via receptor mutante foi induzida por meio da administração de CNO, conforme descrito no Capítulo I. O CNO ativa especificamente o receptor hM4Di, desencadeando sinalização via Gi (mesma via intracelular classicamente ativada pela ACh no coração). Evidências experimentais (não apresentadas nesta seção) demonstram que já é possível detectar a expressão do receptor mutante 24 horas após a injeção viral. P11 a P20 com eutanásia em P21 para a investigação da segunda janela maturacional. O esquema experimental utilizado encontra-se representado na Figura 37A.

Por fim, é importante ressaltar que as análises morfológicas foram conduzidas comparando CMs hM4Di positivos (chamados de CMs Gi+) e negativos (chamados de CMs Gi-) provenientes do mesmo coração. Essa abordagem intraindividual aumenta o controle experimental e permite isolar com maior precisão os efeitos diretos da ativação seletiva de Gi sobre o programa maturacional dos CMs. Por essa razão, não temos resultados macro, como, por exemplo, o peso do coração.

A eficiência da infecção viral foi confirmada por imunofluorescência para mCitrina, repórter fluorescente associado ao receptor hM4Di. Observamos que a dose viral administrada em P0 resultou em aproximadamente 30% de CMs Gi+ no miocárdio ventricular (Figura 37B), caracterizando um padrão de expressão em mosaico consistente e reprodutível

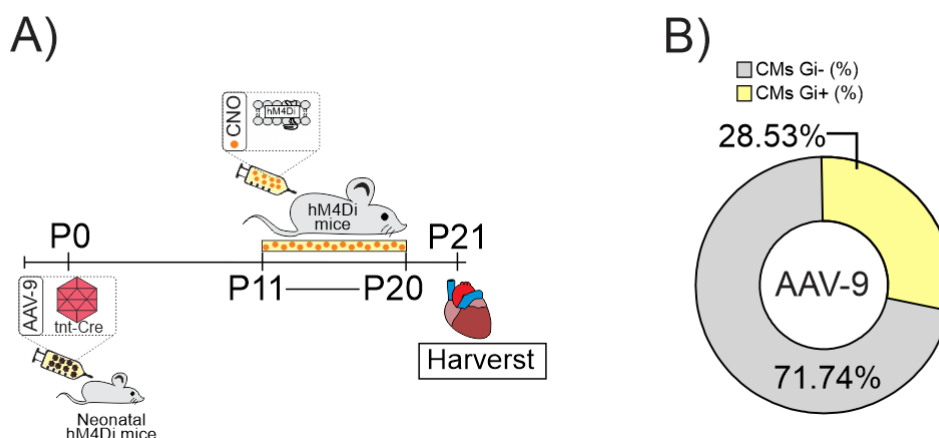


Figura 37: Modelo mosaico de ativação da via Gi em CMs A) Modelo esquemático demonstrando o protocolo de mutação induzido por AAV9 para a geração de um coração em mosaico. Após a geração deste modelo, a via Gi foi estimulada via CNO no P11-P20 com coleta no P21. B) Gráfico de setores demonstrando a taxa de infecção de CMs com a dose de adenovírus aplicada, que tem média de aproximadamente 30% dos CMs infectados com vírus (CMs Gi+).

No modelo em mosaico, os corações foram avaliados em P21. Nesse ponto temporal, os CMs Gi+ apresentaram crescimento reduzido em todos os parâmetros morfológicos analisados, incluindo comprimento, largura e área celular, quando comparados às células Gi- do mesmo coração (Figura 38A–D). Esses dados indicam que a ativação seletiva de Gi durante o período neonatal impacta o crescimento hipertrófico dos CMs. Paralelamente às alterações morfológicas, observamos mudanças no perfil de nucleação. Houve redução na proporção de CMs binucleados e aumento correspondente na frequência de células mononucleadas (Figura 38E–F), padrão compatível com um fenótipo estruturalmente menos maduro.

Em conjunto, esses resultados sustentam a hipótese de que a via Gi, quando ativada nos CMs, é suficiente para retardar sua maturação estrutural. Além disso, ao recapitular os efeitos observados nos modelos sistêmicos de aumento da ACh, os dados fortalecem a interpretação de que o atraso maturacional previamente descrito está fortemente associado à sinalização intracelular mediada por Gi, e não apenas a efeitos colinérgicos indiretos.

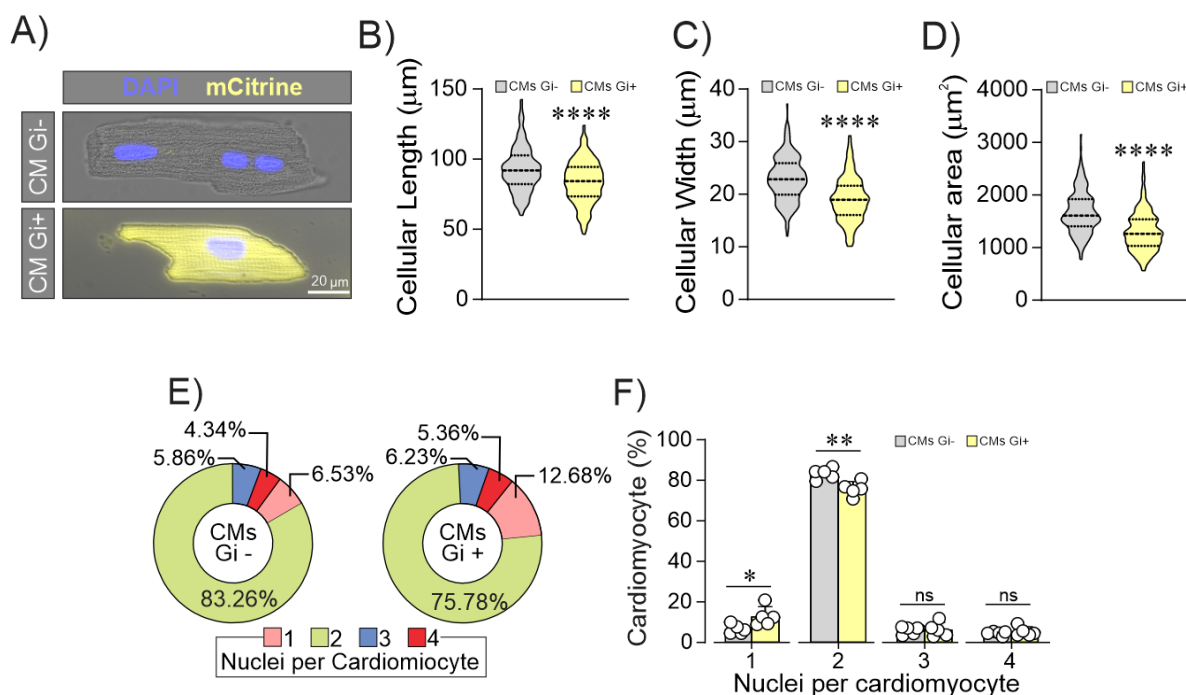


Figura 38 A ativação da via Gi seletivamente nos cardiomiócitos compromete o crescimento e aumenta o pool de células mononucleadas: A) Miócitos ventriculares representativos de animais que receberam o vetor viral. Imagem mostra a expressão do repórter mCitrine (amarelo), tornando possível a identificação das células que expressam o receptor DREADD (CMs Gi+s). Barra de escala = 20μm. **B-D)** Gráficos de violino representando o comprimento (B), a largura (C) e a área celular (D) dos CMs. Número de células/corações: 230/5 por grupo. As linhas tracejadas grossas e finas indicam as medianas e os percentis de 25-75%, respectivamente. **E)** Perfil de nucleação de CMs Gi- e Gi+. **F)** Gráfico de barras mostrando que a nucleação de CMs é alterada em CMs Gi+ com aumento de células mononucleadas e redução da população de CMs binucleadas Gi-:800/5 Gi+ 326/5. Os dados nos gráficos de barras são apresentados como média ± erro padrão. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student bicaudal. ns = não significativo; *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001.

14.4 A ACh sintetizada pelos cardiomiócitos regula a hipertrofia celular *in vitro*.

Como etapa complementar para validar e aprofundar nossos achados *in vivo*, reproduzimos experimentalmente e o ambientes hiper e hipocolinérgicos *in vitro* utilizando culturas primárias de CMs neonatais (Figura 39 A). Essa abordagem permitiu investigar o efeito da ACh em um sistema isolado, livre de influências hemodinâmicas e neuro-humorais sistêmicas.

Inicialmente, a cultura de CMs foi exposta à ACh por 48 horas. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na área celular. Considerando a rápida degradação da ACh no meio extracelular (KAKINUMA, AKIYAMA e SATO, 2009b) e o fato de que CMs neonatais expressam acetilcolinesterase (AChE) (ROCHA-RESENDE *et al.*, 2012), é plausível que a ausência de efeito tenha decorrido da curta meia-vida do neurotransmissor no sistema experimental. Para contornar essa limitação, repetimos os experimentos na presença de piridostigmina (Pyr), um inibidor da colinesterase capaz de prolongar a disponibilidade da ACh no meio. Nessas condições, observamos redução significativa da área dos CMs no grupo ACh+Pyr em comparação aos controles, indicando que a sinalização colinérgica exerce efeito inibitório sobre o crescimento celular quando a biodisponibilidade do neurotransmissor é ampliada.

Considerando evidências de que CMs neonatais são capazes de sintetizar e secretar ACh (KAKINUMA, AKIYAMA e SATO, 2009b; ROCHA-RESENDE *et al.*, 2012), avaliamos o efeito da inibição isolada da colinesterase, sem suplementação exógena de ACh. O tratamento apenas com piridostigmina também promoveu redução significativa da área celular, reforçando o papel da ACh endógena no controle do crescimento dos CMs. Para explorar ainda mais este dado, utilizamos vesamicol (Ves), um inibidor do transportador vesicular de ACh que bloqueia o empacotamento e a secreção do neurotransmissor. Nesse contexto, observamos aumento significativo da área celular em comparação aos controles não tratados, sugerindo que a inibição da sinalização colinérgica endógena favorece o crescimento hipertrófico dos CMs. Este resultado está em consonância com dados prévios do nosso grupo apresentado por Rocha-Resende *et al.*, (2012), que demonstraram que o silenciamento do VAcHT em cultura de CMs, induz aumento da área celular. Por fim, investigamos se esses efeitos eram mediados por receptores muscarínicos. A adição de atropina, antagonista muscarínico, na presença de piridostigmina aboliu o efeito inibitório sobre o crescimento celular, resultando em hipertrofia dos CMs. Esse resultado indica que a modulação observada é dependente da ativação de receptores muscarínicos, consistentes com a sinalização via Gi descrita anteriormente.

Em conjunto, os dados *in vitro* corroboram os achados obtidos *in vivo* e sustentam a hipótese de que a sinalização colinérgica autócrina/parácrina em CMs atua como reguladora negativa do crescimento celular, modulando o programa de maturação

15. DISCUSSÃO (Capítulo II)

A interpretação dos achados apresentados neste capítulo é particularmente desafiadora devido à escassez de estudos que investiguem, de forma direta e mecanística, o papel da sinalização colinérgica na maturação estrutural dos CMs. Embora a ACh seja amplamente reconhecida por sua relevância no controle autonômico do débito cardíaco, sua atuação como moduladora do processo maturacional de CMs permanece pouco explorada na literatura. A literatura disponível concentra-se majoritariamente em efeitos constitutivos de vias colinérgicas no adulto e em contextos patológicos, deixando lacunas substanciais, quanto ao impacto da ativação muscarínica e conseqüentemente, da via Gi, sobre processos maturacionais fundamentais, como proliferação, hipertrofia e nucleação.

Essa limitação reduz a disponibilidade de referências comparativas diretas, exigindo que a discussão seja construída a partir de evidências indiretas ou de estudos realizados em contextos distintos, cujos resultados podem convergir ou divergir dos observados aqui. Paradoxalmente, essa dificuldade também reforça o caráter inovador do trabalho, ao mesmo tempo em que evidencia a necessidade de investigações adicionais que aprofundem o entendimento da contribuição da sinalização colinérgica para a maturação cardíaca pós-natal.

15.1 Via colinérgica e proliferação de cardiomiócitos:

Embora diferentes modelos animais compartilhem características fisiológicas relevantes, certas espécies oferecem vantagens específicas para o estudo de determinados processos biológicos. O zebrafish, por exemplo, mantém capacidade robusta de regeneração cardíaca ao longo de toda a vida, o que o torna particularmente adequado para investigar mecanismos que regulam proliferação e regeneração de CMs. Nesse contexto, Mahmoud *et al.*, (2015) buscaram elucidar o papel da inervação autonômica na proliferação cardíaca após lesão. Os autores demonstraram que, após injúria cardíaca, o bloqueio muscarínico reduzia significativamente a proliferação de CMs em comparação aos controles. Em contraste, o bloqueio adrenérgico aumentava a taxa proliferativa. A utilização de um antagonista seletivo do receptor M2 que é o subtipo muscarínico predominante em CMs, manteve o prejuízo proliferativo, indicando que a sinalização colinérgica via M2 é determinante

nesse processo. Esses achados corroboram a via proposta em nosso trabalho, reforçando o papel do eixo ACh–M2–Gi na modulação da proliferação cardíaca.

O mesmo grupo expandiu essas observações para camundongos neonatais (BRYANT *et al.*, 2015). Em modelos de lesão correspondendo a aproximadamente 15% do ventrículo, animais no período neonatal precoce (P1) apresentavam elevada capacidade regenerativa. Entretanto, a administração de atropina comprometeu significativamente essa resposta proliferativa. Embora esses experimentos tenham sido conduzidos em contexto de lesão, é plausível supor que mecanismos semelhantes atuem durante o desenvolvimento fisiológico. Como evidência adicional, a vagotomia em neonatos resultou em redução da expressão de reguladores do ciclo celular, como ciclina D2 e Cdk4, além de queda acentuada na proliferação de CMs após lesão. A ausência de atividade colinérgica também esteve associada a aumento expressivo da mortalidade após infarto, destacando a relevância funcional dessa via para a manutenção da homeostase cardíaca.

Interessantemente, os efeitos antiproliferativos decorrentes da interrupção da sinalização colinérgica puderam ser revertidos com tratamento com neuregulina-1 (NRG1) e NGF, sugerindo que esses fatores participam da regulação da entrada e saída do ciclo celular. Além disso, análises transcriptômicas indicaram redução de vias pró-inflamatórias na presença de sinalização colinérgica ativa, levantando a hipótese de que o componente anti-inflamatório da via Gi possa contribuir indiretamente para a manutenção de um ambiente permissivo à proliferação (MAHMOUD *et al.*, 2015). Han *et al.*, (2024) ao estimular o nervo vago através de optogenética, regulou positivamente a proliferação de CMs e a regeneração miocárdica após o infarto. Em conjunto, esses dados fortalecem a noção de que a sinalização colinérgica muscarínica desempenha papel central na regulação do equilíbrio entre proliferação, inflamação e regeneração cardíaca.

Outra estratégia indireta de potencializar a atividade colinérgica consiste na redução do tônus simpático. Considerando a organização funcional do SNA, há um balanço dinâmico entre os componentes simpático e parassimpático; assim, a atenuação da sinalização adrenérgica favorece o predomínio relativo da atividade parassimpática. Nesse contexto, evidências recentes como as de Liu *et al.*, (2019) demonstraram que a deleção genética dos receptores β -adrenérgicos, bem como o bloqueio

farmacológico desses receptores com propranolol, promove aumento significativo da proliferação de CMs em camundongos neonatais. Como consequência, observou-se expansão no número total de CMs no coração desses animais. Corroborando esses achados Kreipke e Birren, (2015) demonstraram que o tratamento com 6OHDA reduz a quantidade de CMs proliferantes, provavelmente devido a modulação do gene *Meis1*, relacionado com a interrupção do ciclo celular de CMs. Tampakakis et al., (2021) demonstraram que o aumento da atividade simpática suprimia a proliferação, demonstrando que esse mecanismo pode estar associado à interação entre SNS e Clock genes (*Per1* e *Per2*).

Esses achados sugerem que a sinalização adrenérgica exerce papel limitador sobre a capacidade proliferativa no período neonatal, enquanto sua inibição cria um ambiente mais permissivo à manutenção do ciclo celular. Embora o estudo tenha focado primariamente na via simpática, os resultados dialogam diretamente com a hipótese de que o balanço autonômico influencia criticamente a janela proliferativa cardíaca. A redução da atividade simpática pode não apenas remover um freio proliferativo mediado por β -receptores, mas também favorecer, ainda que indiretamente, a predominância funcional da sinalização colinérgica. Assim, o controle autonômico emerge como um modulador central da transição entre proliferação e maturação estrutural dos CMs no período pós-natal.

Acreditamos ainda que o papel proeminente do sistema colinérgico na regulação da proliferação (etapa que precede o crescimento hipertrófico) pode explicar por que a inervação parassimpática se estabelece antes da inervação simpática durante o desenvolvimento cardíaco (PATSY *et al.*, 2025). Evidências experimentais e embriológicas demonstram que a inervação parassimpática cardíaca surge primeiro, enquanto a inervação simpática se desenvolve posteriormente, consolidando-se apenas em estágios mais tardios do desenvolvimento ou mesmo após o nascimento em algumas espécies. Esse padrão temporal sugere que o predomínio inicial da sinalização colinérgica pode contribuir para manter CMs em um estado menos diferenciado e mais suscetíveis à proliferação, enquanto a posterior predominância simpática estaria mais associada à maturação funcional e ao crescimento hipertrófico

15.2 Via colinérgica e controle do crescimento de cardiomiócitos

O controle exercido pelo SNA sobre a proliferação está diretamente relacionado ao crescimento celular, uma vez que a modulação da proliferação implica alteração no switch proliferativo/hipertrófico, e vice-versa. Diversos experimentos do nosso grupo e de outros demonstram que a simpatectomia química com 6-OHDA reduz o tamanho cardíaco, indicando que o tônus simpático exerce papel fundamental no crescimento do coração (ELIEZECK *et al.*, 2024; KREIPKE e BIRREN, 2015)

Por outro lado, a inervação simpática induz hipertrofia maturacional de CMs tanto *in vitro* (KOWALSKI *et al.*, 2022) quanto *in vivo* (ZAGLIA e MONGILLO, 2017). Ao longo dos anos, diferentes vias foram propostas para explicar o controle do SNS sobre a hipertrofia maturacional, incluindo a via β 2-AR–MuRF1 (ZAGLIA *et al.*, 2013) a relação com os clock genes Per1 e Per2 possivelmente associada ao prejuízo na polinucleação dos miócitos (TAMPAKAKIS *et al.*, 2021b), além de vias clássicas dependentes de PKA, como ERK/MAPK e CaMKII/NFAT. Em contrapartida, em contextos distintos da maturação, foi observado que a estimulação colinérgica pode prevenir a hipertrofia dos CMs (GAVIOLI *et al.*, 2014).

Além do efeito direto do SNS sobre a hipertrofia, a descarga adrenérgica também regula outros fatores que influenciam o crescimento celular durante a maturação, como Ang II e peptídeo natriurético atrial (ANP). Como discutido anteriormente, o ANP exerce papel importante no controle da hipertrofia, atuando como regulador contra o crescimento excessivo. O estudo Hansson, Kjörell e Forsgren, (2001) demonstrou que os níveis cardíacos de ANP diminuem à medida que a inervação simpática se desenvolve, enquanto durante a simpatectomia ocorre aumento dos níveis de ANP, sugerindo que neurônios simpáticos suprimem a atividade do ANP durante o desenvolvimento, reduzindo seus efeitos anti-hipertróficos. Por outro lado, o trabalho Hunt (1995) demonstrou que a inervação simpática aumenta a expressão de receptores AT1 no coração, potencializando a atividade da Ang II, que possui efeito pró-hipertrófico.

Embora ainda exista escassez de evidências correlacionando diretamente o SNS com o crescimento cardíaco maturacional, é plausível supor que o aumento do tônus parassimpático possa suprimir os efeitos adrenérgicos sobre o crescimento cardíaco, prejudicando, dessa forma, seu papel hipertrófico. Acreditamos que as alterações associadas ao sistema colinérgico ocorram, ao menos em parte, de forma secundária

à supressão funcional do sistema simpático, que ocorre concomitantemente ao aumento da atividade colinérgica. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos precisos envolvidos nos efeitos do sistema colinérgico sobre a maturação dos CMs. De forma geral, os principais efeitos dos neurônios simpáticos e parassimpáticos na maturação dos CMs estão resumidos na Figura 40.

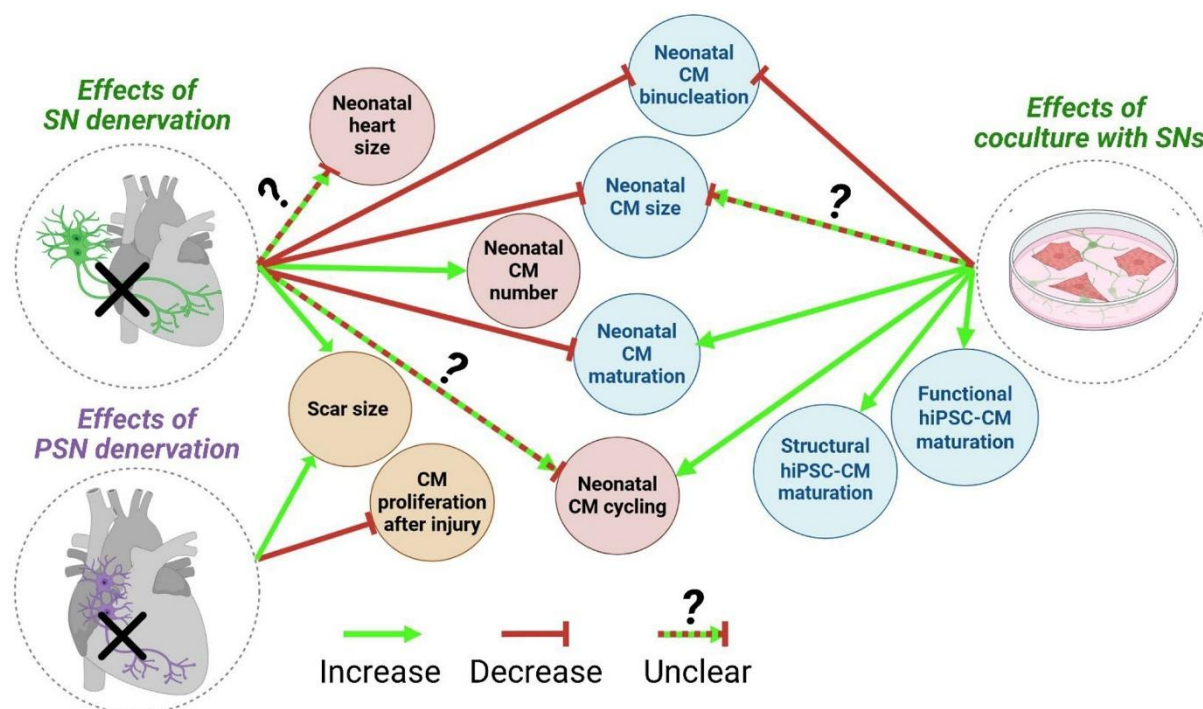


Figura 40: Sistema nervoso autonômico e seus efeitos na maturação cardíaca: Efeitos da modulação autonômica sobre crescimento, proliferação e maturação de CMs neonatais. A desnervação simpática (SN) e parassimpática (PSN), bem como a cocultura com neurônios simpáticos, exercem efeitos distintos sobre parâmetros estruturais e funcionais, incluindo tamanho cardíaco neonatal, binucleação, tamanho e número de CMs, maturação estrutural e funcional, e capacidade proliferativa após lesão. Setas verdes indicam aumento, barras vermelhas indicam redução e setas tracejadas indicam efeitos ainda não totalmente esclarecidos. Figura adaptada de (Patsy et al., 2025)

16. CONCLUSÃO (Capítulo II)

Em conjunto, os resultados apresentados neste capítulo demonstram que a ACh desempenha um papel central na regulação do amadurecimento estrutural dos CMs, modulando etapas críticas do desenvolvimento pós-natal, como a proliferação celular, o crescimento hipertrófico e o padrão de nucleação. Evidenciamos que a disponibilidade de ACh influencia diretamente a dinâmica da transição entre o estado proliferativo e o estado maturado. Nossos dados identificam o eixo miocitário ACh–M2–Gi como importante mediador da maturação, indicando que a sinalização colinérgica intrínseca ao CM, atua como um mecanismo regulador fino do timing maturacional. A ativação de Gi mostrou-se associada ao prolongamento da janela proliferativa e ao atraso da hipertrofia maturacional, enquanto a redução da disponibilidade de ACh promoveu crescimento celular acelerado e alterações na nucleação, reforçando a existência de um controle colinérgico endógeno sobre o programa de maturação. A participação da ACh derivada do cardiomiócito nesse processo fornece uma explicação mecânica para o controle da maturação ventricular, especialmente considerando que a inervação parassimpática nos ventrículos é escassa. Assim, a própria ACh produzida pelos CMs emerge como a principal fonte de sinalização colinérgica capaz de modular diretamente seu crescimento e maturação. Assim, os resultados aqui descritos ampliam a compreensão do papel da sinalização Gi no desenvolvimento cardíaco e posicionam a via colinérgica miocitária como um modulador fisiológico do crescimento e da maturação estrutural do coração. Os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação da ACh sobre esse processo encontram-se esquematizados na Figura 41.

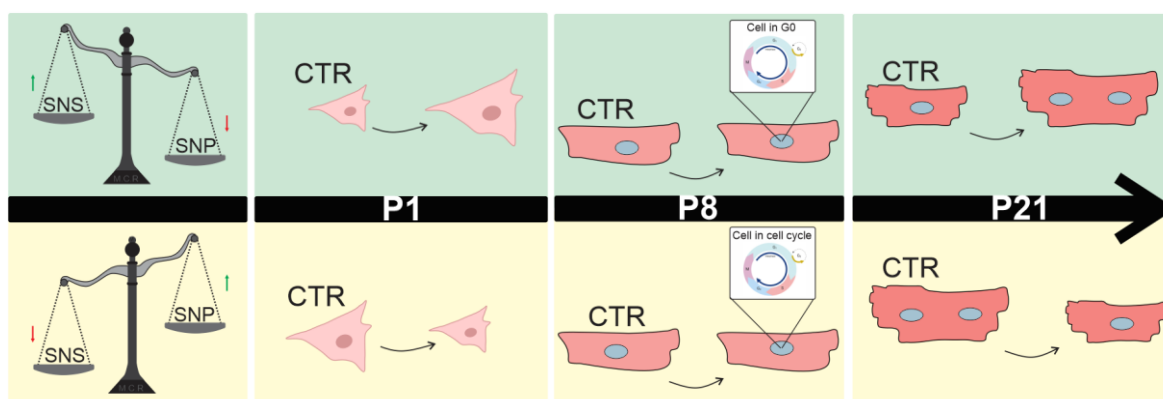


Figura 41: Resumo gráfico dos principais achados do capítulo II: Os principais resultados deste capítulo demonstram o papel dos ambientes hipercolinérgicos e hipocolinérgicos em diferentes estágios da maturação cardíaca. Observou-se que a acetilcolina (ACh) promove aumento da proliferação celular, eleva a proporção de CMs em ciclo celular ativo e reduz o crescimento dos CMs.

17. LIMITAÇÃO DO ESTUDO (capítulo II)

Apesar da consistência dos achados apresentados, algumas limitações devem ser consideradas. Primeiramente, parte dos resultados baseia-se em modelos sistêmicos de modulação da ACh, embora relevantes do ponto de vista fisiológico, não permitem excluir completamente efeitos indiretos decorrentes de alterações autonômicas ou hemodinâmicas. Embora os resultados obtidos *in vitro* superem parte dessas limitações ao isolar a ação direta da ACh derivada dos CMs nas células, o uso do camundongo cVAcHT em estudos futuros será fundamental para aprofundar esses conhecimentos e validar de forma mais específica o papel da sinalização colinérgica intrínseca ao CM na maturação cardíaca. Além disso, as análises estruturais realizadas concentraram-se principalmente em parâmetros morfométricos clássicos, sendo necessário a inclusão de avaliações morfoestruturais mais aprofundadas, como organização do sistema túbulo-T e acoplamento excitação–contração e perfil genômico, que conferirá uma caracterização mais abrangente da maturação celular. Por fim, a ausência de experimentos funcionais detalhados, tanto *in vitro* (envolvendo implicações funcionais inerentes aos CMs) quanto *in vivo* (envolvendo implicações translacionais), limita a compreensão do impacto fisiológico direto dessas alterações estruturais sobre a performance cardíaca.

18. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMO, L. *et al.* Reappraising the role of inflammation in heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 5, p. 269–285, 15 maio 2020.

ALEXANDER, M. R. *et al.* Increased Atherosclerosis and Smooth Muscle Cell Hypertrophy in Natriuretic Peptide Receptor A ^{-/-} Apolipoprotein E ^{-/-} Mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 6, p. 1077–1082, jun. 2003.

ALI, M. *et al.* Natriuretic peptides and Forkhead O transcription factors act in a cooperative manner to promote cardiomyocyte cell cycle re-entry in the postnatal mouse heart. **BMC Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 6, 3 dez. 2021.

ALTMAN, N. L. *et al.* Heart Rate Reduction Is Associated With Reverse Left Ventricular Remodeling and Mechanism-Specific Molecular Phenotypes in Dilated Cardiomyopathy. **Circulation: Heart Failure**, v. 18, n. 4, abr. 2025.

ARMBRUSTER, B. N. *et al.* **Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0700293104>.

AURORA, A. B. *et al.* Macrophages are required for neonatal heart regeneration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 3, p. 1382–1392, 3 mar. 2014.

AZEVEDO, P. S. *et al.* Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2016.

BARBOZA, C. A. *et al.* Cholinergic Stimulation by Pyridostigmine Bromide Before Myocardial Infarction Prevent Cardiac and Autonomic Dysfunction. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2481, 21 fev. 2019.

BEAUCHAMP, P. *et al.* 3D Co-culture of hiPSC-Derived Cardiomyocytes With Cardiac Fibroblasts Improves Tissue-Like Features of Cardiac Spheroids. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 14 fev. 2020.

BERGMANN, O. *et al.* Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. **Science**, v. 324, n. 5923, p. 98–102, 3 abr. 2009.

BEZERRA, O. C. *et al.* Cholinergic Stimulation Improves Oxidative Stress and Inflammation in Experimental Myocardial Infarction. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13687, 20 out. 2017.

BOLLINI, S. *et al.* Triggering Endogenous Cardiac Repair and Regeneration via Extracellular Vesicle-Mediated Communication. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 23 out. 2018.

BON-MATHIER, A.-C. *et al.* Brain Natriuretic Peptide Protects Cardiomyocytes from Apoptosis and Stimulates Their Cell Cycle Re-Entry in Mouse Infarcted Hearts. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 7, 20 dez. 2022.

BRETHERTON, R. *et al.* Regulators of cardiac fibroblast cell state. **Matrix Biology**, v. 91–92, p. 117–135, set. 2020.

BRODDE, O. E. *et al.* Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 471–478, 15 jan. 1998.

BRODDE, O.-E. *et al.* Receptor systems in the non-failing human heart. *Em: Cellular and Molecular Alterations in the Failing Human Heart*. Heidelberg: Steinkopff, 1992. p. 1–14.

BRODDE, O.-E.; MICHEL, M. C. Adrenergic and Muscarinic Receptors in the Human Heart. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 651–689, dez. 1999.

BRYANT, D. M. *et al.* A systematic analysis of neonatal mouse heart regeneration after apical resection. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 79, p. 315–318, fev. 2015.

BURCHFIELD, J. S.; XIE, M.; HILL, J. A. Pathological Ventricular Remodeling. **Circulation**, v. 128, n. 4, p. 388–400, 23 jul. 2013.

CAPOTE, L. A.; MENDEZ PEREZ, R.; LYMPEROPOULOS, A. GPCR signaling and cardiac function. **European Journal of Pharmacology**, v. 763, p. 143–148, set. 2015.

CHATTERGOON, N. N. *et al.* Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 1, p. 397–408, 5 jan. 2012.

CHEN, A.-Q. *et al.* Muscarinic acetylcholine receptors regulate inflammatory responses through arginases 1/2 in zebrafish. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113321, set. 2022.

CLEUTJENS, J. P. *et al.* Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 2, p. 325–38, ago. 1995.

COLLIVA, A. *et al.* Endothelial cell–cardiomyocyte crosstalk in heart development and disease. **The Journal of Physiology**, v. 598, n. 14, p. 2923–2939, 27 jul. 2020.

CORREIA, C. *et al.* Distinct carbon sources affect structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8590, 17 ago. 2017.

DAAKA, Y. *et al.* Essential Role for G Protein-coupled Receptor Endocytosis in the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 2, p. 685–688, jan. 1998.

DEGEORGE, B. R. *et al.* Targeted Inhibition of Cardiomyocyte Gi Signaling Enhances Susceptibility to Apoptotic Cell Death in Response to Ischemic Stress. **Circulation**, v. 117, n. 11, p. 1378–1387, 18 mar. 2008.

DEGEORGE JR, B. R.; KOCH, W. J. Gi/o signaling and its potential role in cardioprotection. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 6, n. 6, p. 785–787, 10 jul. 2008.

ELIEZECK, M. *et al.* β -Adrenergic signaling drives structural and functional maturation of mouse cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 326, n. 5, p. C1334–C1344, 1 maio 2024.

ELKHOURY, K. *et al.* Advancing Cardiomyocyte Maturation: Current Strategies and Promising Conductive Polymer-Based Approaches. **Advanced Healthcare Materials**, v. 13, n. 13, 20 maio 2024.

ELLISON, G. M. *et al.* Acute β -Adrenergic Overload Produces Myocyte Damage through Calcium Leakage from the Ryanodine Receptor 2 but Spares Cardiac Stem Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 15, p. 11397–11409, abr. 2007.

ENGLER, A. J. *et al.* Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677–689, ago. 2006.

ESCHENHAGEN, T. *et al.* Regulation and possible functional implications of G-protein mRNA expression in nonfailing and failing ventricular myocardium. *Em: Cellular and Molecular Alterations in the Failing Human Heart*. Heidelberg: Steinkopff, 1992. p. 51–64.

FELDMAN, A. M. *et al.* Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 1, p. 189–197, 1 jul. 1988.

FLORES-VERGARA, R. *et al.* Communication Between Cardiomyocytes and Fibroblasts During Cardiac Ischemia/Reperfusion and Remodeling: Roles of TGF- β , CTGF, the Renin Angiotensin Axis, and Non-coding RNA Molecules. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 3 set. 2021.

FRANGOIANNIS, N. G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Em: Comprehensive Physiology*. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1841–1875.

GALLOWITSCH-PUERTA, M.; PAVLOV, V. A. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Life Sciences**, v. 80, n. 24–25, p. 2325–2329, maio 2007.

GARCÍA-NAFRÍA, J.; TATE, C. G. Structure determination of GPCRs: cryo-EM compared with X-ray crystallography. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 5, p. 2345–2355, 1 nov. 2021.

GARG, M.; KHANNA, D. Exploration of pharmacological interventions to prevent isoproterenol-induced myocardial infarction in experimental models. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, v. 8, n. 4, p. 155–169, 9 ago. 2014.

GAVIOLI, M. *et al.* Cholinergic Signaling Exerts Protective Effects in Models of Sympathetic Hyperactivity-Induced Cardiac Dysfunction. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e100179, 3 jul. 2014.

GIOVOU, A. E.; GLADKA, M. M.; CHRISTOFFELS, V. M. The Impact of Natriuretic Peptides on Heart Development, Homeostasis, and Disease. **Cells**, v. 13, n. 11, p. 931, 28 maio 2024.

GIRAUD, G. D. *et al.* Cortisol Stimulates Cell Cycle Activity in the Cardiomyocyte of the Sheep Fetus. **Endocrinology**, v. 147, n. 8, p. 3643–3649, ago. 2006.

GRIMM, D. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin–angiotensin system. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 1, p. 91–100, 1998.

GUATIMOSIM, S. *et al.* Molecular identification of a TTX-sensitive Ca²⁺ current. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 280, n. 5, p. C1327–C1339, 1 maio 2001.

GULUDEC, D. LE *et al.* Increased Myocardial Muscarinic Receptor Density in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. **Circulation**, v. 96, n. 10, p. 3416–3422, 18 nov. 1997.

GUO, Y.; PU, W. T. Cardiomyocyte Maturation. **Circulation Research**, v. 126, n. 8, p. 1086–1106, 10 abr. 2020.

GUREVICH, V. V.; GUREVICH, E. V. GPCRs and Signal Transducers: Interaction Stoichiometry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 39, n. 7, p. 672–684, jul. 2018.

GUYTON, A. C. ; H. J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 13. ed. [s.l: s.n.].

HAIDER, N. *et al.* Transition of Macrophages to Fibroblast-Like Cells in Healing Myocardial Infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 25, p. 3124–3135, dez. 2019.

HAMIDZADA, H. *et al.* Primitive macrophages induce sarcomeric maturation and functional enhancement of developing human cardiac microtissues via efferocytic pathways. **Nature Cardiovascular Research**, v. 3, n. 5, p. 567–593, 7 maio 2024.

HAN, Y. *et al.* Optogenetic Stimulation of the Cardiac Vagus Nerve to Promote Heart Regenerative Repair after Myocardial Infarction. **International Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 6, p. 2072–2091, 2024.

HANSSON, M.; KJÖRELL, U.; FORSGREN, S. Ingrowth of sympathetic innervation occurs concomitantly with a decrease of ANP in the growing rat cardiac ventricles. **Anatomy and Embryology**, v. 203, n. 1, p. 35–44, 1 jan. 2001.

HU, M. *et al.* The harsh microenvironment in infarcted heart accelerates transplanted bone marrow mesenchymal stem cells injury: the role of injured cardiomyocytes-derived exosomes. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 3, p. 357, 2 mar. 2018.

HUANG, C. Y. *et al.* Enhancement of human iPSC-derived cardiomyocyte maturation by chemical conditioning in a 3D environment. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 138, p. 1–11, jan. 2020.

HUNT, R. Sympathetic Innervation Modulates the Expression of Angiotensin II Receptors in Embryonic Rat Heart Grafted in Oculo. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 27, n. 11, p. 2445–2452, nov. 1995.

IEDA, M. *et al.* Cardiac Fibroblasts Regulate Myocardial Proliferation through β 1 Integrin Signaling. **Developmental Cell**, v. 16, n. 2, p. 233–244, fev. 2009.

JANG, Y. *et al.* Cardiac fibroblast-mediated ECM remodeling regulates maturation in an in vitro 3D engineered cardiac tissue. **Journal of Tissue Engineering**, v. 16, 21 ago. 2025.

JIAN, Y. *et al.* Crosstalk between macrophages and cardiac cells after myocardial infarction. **Cell Communication and Signaling**, v. 21, n. 1, p. 109, 11 maio 2023.

JIMENEZ, S. Transcriptional regulation of FGF-2 gene expression in cardiac myocytes. **Cardiovascular Research**, v. 62, n. 3, p. 548–557, jun. 2004.

KAISER, E. *et al.* DREADD technology reveals major impact of Gq signalling on cardiac electrophysiology. **Cardiovascular Research**, v. 115, n. 6, p. 1052–1066, 1 maio 2019.

KAKINUMA, Y.; AKIYAMA, T.; SATO, T. Cholinoceptive and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 18, p. 5111–5125, 27 set. 2009a.

_____. Cholinoceptive and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 18, p. 5111–5125, 27 set. 2009b.

KARBASSI, E. *et al.* Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 6, p. 341–359, 3 jun. 2020.

KLEINBONGARD, P. *et al.* Pleiotropic, heart rate-independent cardioprotection by ivabradine. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 17, p. 4380–4390, 21 set. 2015.

KÖHLER, D. *et al.* Gai2- and Gai3-Deficient Mice Display Opposite Severity of Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e98325, 23 maio 2014.

KOIDE, M. *et al.* Atrial natriuretic peptide accelerates proliferation of chick embryonic cardiomyocytes in vitro. **Differentiation**, v. 61, n. 1, p. 1–11, out. 1996.

KOLISNYK, B. *et al.* ChAT-ChR2-EYFP Mice Have Enhanced Motor Endurance But Show Deficits in Attention and Several Additional Cognitive Domains. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 25, p. 10427–10438, 19 jun. 2013.

KONG, P.; CHRISTIA, P.; FRANGOIANNIS, N. G. The pathogenesis of cardiac fibrosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 4, p. 549–574, 7 fev. 2014.

KOREN, L. *et al.* ATF3-dependent cross-talk between cardiomyocytes and macrophages promotes cardiac maladaptive remodeling. **International Journal of Cardiology**, v. 198, p. 232–240, nov. 2015.

KOUCHI, I. *et al.* Increase in G_α Protein Accompanies Progression of Post-Infarction Remodeling in Hypertensive Cardiomyopathy. **Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 42–47, jul. 2000.

KOWALSKI, W. J. *et al.* Sympathetic Neurons Regulate Cardiomyocyte Maturation in Culture. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 11 mar. 2022.

KREIPKE, R. E.; BIRREN, S. J. Innervating sympathetic neurons regulate heart size and the timing of cardiomyocyte cell cycle withdrawal. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 23, p. 5057–5073, 1 dez. 2015.

KUROSE, H.; MANGMOOL, S. Myofibroblasts and inflammatory cells as players of cardiac fibrosis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 8, p. 1100–1113, 11 ago. 2016.

LAMERIS, T. W. *et al.* Time Course and Mechanism of Myocardial Catecholamine Release During Transient Ischemia In Vivo. **Circulation**, v. 101, n. 22, p. 2645–2650, 6 jun. 2000.

LATARO, R. M. *et al.* Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents ventricular dysfunction during the onset of heart failure. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 8, p. R908–R916, 15 out. 2013.

LAUSTSEN, P. G. *et al.* Essential Role of Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Signaling in Cardiac Development and Function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 5, p. 1649–1664, 1 mar. 2007.

LEE, D. S. *et al.* Defined MicroRNAs Induce Aspects of Maturation in Mouse and Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes. **Cell Reports**, v. 12, n. 12, p. 1960–1967, set. 2015.

LEONE, M.; ALBANESE, J.; MARTIN, C. Positive inotropic stimulation. **Current Opinion in Critical Care**, v. 8, n. 5, p. 395–403, out. 2002.

LI, M. *et al.* Vagal Nerve Stimulation Markedly Improves Long-Term Survival After Chronic Heart Failure in Rats. **Circulation**, v. 109, n. 1, p. 120–124, 6 jan. 2004.

_____. Donepezil Markedly Improves Long-Term Survival in Rats With Chronic Heart Failure After Extensive Myocardial Infarction. **Circulation Journal**, v. 77, n. 10, p. 2519–2525, 2013.

LI, Z. *et al.* Cardiac dysfunction in StrepTSS: Group A streptococcus disrupts the directional cardiomyocyte-to-macrophage crosstalk that maintains macrophage quiescence. **Cytokine**, v. 59, n. 1, p. 191–194, jul. 2012.

LINDSEY, S. E. Mechanical regulation of cardiac development. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 2014.

LIU CHUNG MING, C.; WANG, X.; GENTILE, C. Protective role of acetylcholine and the cholinergic system in the injured heart. **iScience**, v. 27, n. 9, p. 110726, set. 2024.

LIU, H. *et al.* Control of cytokinesis by β -adrenergic receptors indicates an approach for regulating cardiomyocyte endowment. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 513, 9 out. 2019.

LIU, Y.-W. *et al.* Human embryonic stem cell–derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 597–605, 2 jul. 2018.

LORENZEN, J. M. *et al.* Osteopontin is indispensable for AP1-mediated angiotensin II-related miR-21 transcription during cardiac fibrosis. **European Heart Journal**, v. 36, n. 32, p. 2184–2196, 21 ago. 2015.

LYMPEROPOULOS, A.; RENGO, G.; KOCH, W. J. Adrenergic Nervous System in Heart Failure. **Circulation Research**, v. 113, n. 6, p. 739–753, 30 ago. 2013.

MAGYAR, D. M. *et al.* Validation of a specific radioimmunoassay to measure plasma cortisol in the fetal sheep. **Steroids**, v. 33, n. 1, p. 45–54, jan. 1979.

MAHMOUD, A. I. *et al.* Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. **Developmental Cell**, v. 34, n. 4, p. 387–399, ago. 2015a.

____. Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. **Developmental Cell**, v. 34, n. 4, p. 387–399, ago. 2015b.

MAROLI, G.; BRAUN, T. The long and winding road of cardiomyocyte maturation. **Cardiovascular Research**, v. 117, n. 3, p. 712–726, 22 fev. 2021.

MARTIN, T. G.; JUARROS, M. A.; LEINWAND, L. A. Regression of cardiac hypertrophy in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. **Nature Reviews Cardiology**, v. 20, n. 5, p. 347–363, 4 maio 2023.

MARTINS, F. L.; BAILEY, M. A.; GIRARDI, A. C. C. Endogenous Activation of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Contributes to Blood Pressure Control. **Hypertension**, v. 76, n. 3, p. 839–848, set. 2020.

MATSUDA, N. *et al.* Differential gene transcriptional regulation of Gi isoforms and Gs protein expression in diabetic rat hearts. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 361, n. 1, p. 53–60, jan. 2000.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723–737, 14 nov. 2011.

MUTHU, K. *et al.* β -Adrenergic stimulation increases macrophage CD14 expression and *E. coli* phagocytosis through PKA signaling mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 4, p. 715–724, 19 jul. 2010.

NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 7, p. 387–407, 19 jul. 2018.

NICOLÁS-ÁVILA, J. A. *et al.* A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart. **Cell**, v. 183, n. 1, p. 94–109.e23, out. 2020.

NORDSTRÖM, P. *et al.* The use of cholinesterase inhibitors and the risk of myocardial infarction and death: a nationwide cohort study in subjects with Alzheimer's disease. **European Heart Journal**, v. 34, n. 33, p. 2585–2591, 1 set. 2013.

NUNES, S. S. *et al.* Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Nature Methods**, v. 10, n. 8, p. 781–787, 23 ago. 2013.

OMOTO, A. C. M. *et al.* Heart rate fragmentation, a novel approach in heart rate variability analysis, is altered in rats 4 and 12 weeks after myocardial infarction. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 59, n. 11–12, p. 2373–2382, 9 nov. 2021.

O'TIERNEY, P. F. *et al.* Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin II-stimulated proliferation in fetal cardiomyocytes. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 15, p. 2879–2889, 3 ago. 2010.

PARIKH, S. S. *et al.* Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Circulation Research**, v. 121, n. 12, p. 1323–1330, 8 dez. 2017.

PARREIRA, R. C. *et al.* Cardiomyocyte Proteome Remodeling due to Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy during the Compensated Phase. **PROTEOMICS – Clinical Applications**, v. 14, n. 4, 23 jul. 2020a.

_____. Cardiomyocyte Proteome Remodeling due to Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy during the Compensated Phase. **PROTEOMICS – Clinical Applications**, v. 14, n. 4, 23 jul. 2020b.

PATEL, B. *et al.* CCR2+ Monocyte-Derived Infiltrating Macrophages Are Required for Adverse Cardiac Remodeling During Pressure Overload. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 3, n. 2, p. 230–244, abr. 2018.

PATSY, M. *et al.* Development and modeling of cardiac autonomic innervation. **Nature Cardiovascular Research**, v. 4, n. 12, p. 1598–1615, 5 dez. 2025a.

_____. Development and modeling of cardiac autonomic innervation. **Nature Cardiovascular Research**, v. 4, n. 12, p. 1598–1615, 5 dez. 2025b.

PRADO, V. F. *et al.* Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. **Neuron**, v. 51, n. 5, p. 601–612, set. 2006.

PRIYA NAIR, V; JENNIFER M HUNTER. Anticholinesterases and anticholinergic drugs . **Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain**, v. 4, n. 5, p. 169–171, out. 2004.

QIAN, J. *et al.* Isoproterenol induces MD2 activation by β -AR-cAMP-PKA-ROS signalling axis in cardiomyocytes and macrophages drives inflammatory heart failure. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 45, n. 3, p. 531–544, 2 mar. 2024a.

_____. Isoproterenol induces MD2 activation by β -AR-cAMP-PKA-ROS signalling axis in cardiomyocytes and macrophages drives inflammatory heart failure. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 45, n. 3, p. 531–544, 2 mar. 2024b.

RANA, O. R. *et al.* Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. **Autonomic Neuroscience**, v. 156, n. 1–2, p. 82–89, ago. 2010.

REDFERN, C. H. *et al.* Conditional expression of a G_i-coupled receptor causes ventricular conduction delay and a lethal cardiomyopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 9, p. 4826–4831, 25 abr. 2000.

ROCHA-RESENDE, C. *et al.* Non-neuronal cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 53, n. 2, p. 206–216, ago. 2012.

_____. Immunomodulatory role of nonneuronal cholinergic signaling in myocardial injury. **JCI Insight**, v. 4, n. 14, 25 jul. 2019.

_____. Protective and anti-inflammatory effects of acetylcholine in the heart. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, n. 2, p. C155–C161, 1 fev. 2021.

ROG-ZIELINSKA, E. A. *et al.* Glucocorticoid receptor is required for foetal heart maturation. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 16, p. 3269–3282, 15 ago. 2013.

ROG-ZIELINSKA, E. A. *et al.* Glucocorticoids promote structural and functional maturation of foetal cardiomyocytes: a role for PGC-1 α . **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 7, p. 1106–1116, 31 jul. 2015.

RONALDSON-BOUCHARD, K. *et al.* Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. **Nature**, v. 556, n. 7700, p. 239–243, 4 abr. 2018.

ROY, A. *et al.* Cardiomyocyte-secreted acetylcholine is required for maintenance of homeostasis in the heart. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 12, p. 5072–5082, 9 nov. 2013.

_____. Cardiac acetylcholine inhibits ventricular remodeling and dysfunction under pathologic conditions. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 2, p. 688–701, 19 fev. 2016.

RUPERT, C. E.; COULOMBE, K. L. K. IGF1 and NRG1 Enhance Proliferation, Metabolic Maturity, and the Force-Frequency Response in hESC-Derived Engineered Cardiac Tissues. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

SALAZAR, N. C.; CHEN, J.; ROCKMAN, H. A. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n. 4, p. 1006–1018, abr. 2007.

SANDGREN, J.; SCHOLZ, T. D.; SEGAR, J. L. ANG II modulation of cardiac growth and remodeling in immature fetal sheep. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 11, p. R965–R972, 1 jun. 2015.

SAROFF, J.; WEXLER, B. C. Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats. **Circulation Research**, v. 27, n. 6, p. 1101–1109, dez. 1970.

SCALZO, S. *et al.* Dense optical flow software to quantify cellular contractility. **Cell Reports Methods**, v. 1, n. 4, p. 100044, ago. 2021.

_____. Microscopy-based cellular contractility assay for adult, neonatal, and hiPSC cardiomyocytes. **STAR Protocols**, v. 3, n. 1, p. 101144, mar. 2022.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jul. 2012.

SCHUSTER, R. *et al.* The Role of Myofibroblasts in Physiological and Pathological Tissue Repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 15, n. 1, p. a041231, jan. 2023.

SCHWARTZ, P. J. *et al.* Long term vagal stimulation in patients with advanced heart failure First experience in man. **European Journal of Heart Failure**, v. 10, n. 9, p. 884–891, 13 set. 2008.

SHEN, C. *et al.* Research progress in myocardial function and diseases related to muscarinic acetylcholine receptor (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 55, n. 6, p. 1–17, 4 abr. 2025.

SHENG, S. *et al.* Regulated cell death pathways in cardiomyopathy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 44, n. 8, p. 1521–1535, 13 ago. 2023.

SHINDE, A. V.; FRANGOIANNIS, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 70, p. 74–82, maio 2014.

SILVA, T. M. DA *et al.* The role of the autonomic nervous system in the patterns of heart rate fragmentation. **Biomedical Signal Processing and Control**, v. 67, p. 102526, maio 2021.

SIQUEIRA, A. DE S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G. DE; LAND, M. G. P. Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2017.

SNIR, M. *et al.* Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 6, p. H2355–H2363, dez. 2003.

STEPPAN, J. *et al.* Arginase modulates myocardial contractility by a nitric oxide synthase 1-dependent mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 12, p. 4759–4764, 21 mar. 2006.

TAMPAKAKIS, E. *et al.* Heart neurons use clock genes to control myocyte proliferation. **Science Advances**, v. 7, n. 49, 3 dez. 2021a.

_____. Heart neurons use clock genes to control myocyte proliferation. **Science Advances**, v. 7, n. 49, 3 dez. 2021b.

TAMPAKAKIS, E.; MAHMOUD, A. I. The role of hormones and neurons in cardiomyocyte maturation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 118, p. 136–143, out. 2021a.

_____. The role of hormones and neurons in cardiomyocyte maturation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 118, p. 136–143, out. 2021b.

_____. The role of hormones and neurons in cardiomyocyte maturation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 118, p. 136–143, out. 2021c.

TAN, J. *et al.* Moderate heart rate reduction promotes cardiac regeneration through stimulation of the metabolic pattern switch. **Cell Reports**, v. 38, n. 10, p. 110468, mar. 2022.

TARBIT, E. *et al.* Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. **Heart Failure Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 10 jan. 2019.

TATTERSALL, J. E. Anticholinesterase toxicity. **Current Opinion in Physiology**, v. 4, p. 49–56, ago. 2018.

TEIXEIRA, V. P. *et al.* Increased cholinergic activity under conditions of low estrogen leads to adverse cardiac remodeling. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, n. 4, p. C602–C612, 1 abr. 2021.

THOMAS, S. A.; MATSUMOTO, A. M.; PALMITER, R. D. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. **Nature**, v. 374, n. 6523, p. 643–646, abr. 1995.

TIAN, J. *et al.* Extracellular HSP60 induces inflammation through activating and up-regulating TLRs in cardiomyocytes. **Cardiovascular Research**, v. 98, n. 3, p. 391–401, 1 jun. 2013.

VANG, A. *et al.* $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor mediates right ventricular fibrosis and diastolic dysfunction in pulmonary hypertension. **JCI Insight**, v. 6, n. 12, 22 jun. 2021.

VASSILATIS, D. K. *et al.* The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4903–4908, 15 abr. 2003.

WALDENSTRÖM, A. *et al.* Cardiomyocyte Microvesicles Contain DNA/RNA and Convey Biological Messages to Target Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34653, 10 abr. 2012.

WAMEL, A. J. E. T. VAN *et al.* Stretch-induced paracrine hypertrophic stimuli increase TGF- $\beta 1$ expression in cardiomyocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 236, n. 1–2, p. 147–153, jul. 2002.

WANG, J.; GARERI, C.; ROCKMAN, H. A. G-Protein–Coupled Receptors in Heart Disease. **Circulation Research**, v. 123, n. 6, p. 716–735, 31 ago. 2018a.

_____. G-Protein–Coupled Receptors in Heart Disease. **Circulation Research**, v. 123, n. 6, p. 716–735, 31 ago. 2018b.

WANG, X. *et al.* Calycosin as a Novel PI3K Activator Reduces Inflammation and Fibrosis in Heart Failure Through AKT–IKK/STAT3 Axis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 21 fev. 2022.

WANG, Y. *et al.* CircUbe3a from M2 macrophage-derived small extracellular vesicles mediates myocardial fibrosis after acute myocardial infarction. **Theranostics**, v. 11, n. 13, p. 6315–6333, 2021.

WEBER, K. T. *et al.* Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. **Nature Reviews Cardiology**, v. 10, n. 1, p. 15–26, 4 jan. 2013.

WEEKS, K. L.; MCMULLEN, J. R. The Athlete's Heart vs. the Failing Heart: Can Signaling Explain the Two Distinct Outcomes? **Physiology**, v. 26, n. 2, p. 97–105, abr. 2011.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 8, p. 1558–1571, 29 ago. 2008.

WETTSCHURECK, N.; OFFERMANN, S. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1159–1204, out. 2005.

WHELAN, R. S.; KAPLINSKIY, V.; KITSIS, R. N. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. **Annual Review of Physiology**, v. 72, n. 1, p. 19–44, 17 mar. 2010.

WORTSMAN, J.; FRANK, S.; CRYER, P. E. Adrenomedullary response to maximal stress in humans. **The American Journal of Medicine**, v. 77, n. 5, p. 779–784, nov. 1984.

WU, L. *et al.* Angiotensin II promotes cardiac differentiation of embryonic stem cells via angiotensin type 1 receptor. **Differentiation**, v. 86, n. 1–2, p. 23–29, jul. 2013.

WU, M. **eLife Assessment: Cardiac fibroblasts regulate myocardium and coronary vasculature development in the murine heart via the collagen signaling pathway**, 1 jul. 2025.

XIAO, R.-P. *et al.* Recent Advances in Cardiac β_2 -Adrenergic Signal Transduction. **Circulation Research**, v. 85, n. 11, p. 1092–1100, 26 nov. 1999.

YANG, B. *et al.* Targeting Interactions between Fibroblasts and Macrophages to Treat Cardiac Fibrosis. **Cells**, v. 13, n. 9, p. 764, 30 abr. 2024.

YANG, P. *et al.* Communications between macrophages and cardiomyocytes. **Cell Communication and Signaling**, v. 21, n. 1, p. 206, 16 ago. 2023.

YANG, X. *et al.* Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 72, p. 296–304, jul. 2014.

YERRA, V. G.; ADVANI, A. Role of CCR2-Positive Macrophages in Pathological Ventricular Remodelling. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 661, 12 mar. 2022.

YOGANATHAN, T. *et al.* Acute stress induces long-term metabolic, functional, and structural remodeling of the heart. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 3835, 28 jun. 2023.

YU, H. *et al.* Exosomes Derived From Hypertrophic Cardiomyocytes Induce Inflammation in Macrophages via miR-155 Mediated MAPK Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 3 fev. 2021.

ZAGLIA, T. *et al.* Cardiac sympathetic neurons provide trophic signal to the heart via β 2-adrenoceptor-dependent regulation of proteolysis. **Cardiovascular Research**, v. 97, n. 2, p. 240–250, 1 fev. 2013.

ZAGLIA, T.; MONGILLO, M. Cardiac sympathetic innervation, from a different point of (re)view. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 12, p. 3919–3930, 15 jun. 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Chronic Vagus Nerve Stimulation Improves Autonomic Control and Attenuates Systemic Inflammation and Heart Failure Progression in a Canine High-Rate Pacing Model. **Circulation: Heart Failure**, v. 2, n. 6, p. 692–699, nov. 2009.

ZHU, H. *et al.* Cre-dependent DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) mice. **Genesis**, v. 54, n. 8, p. 439–446, 1 ago. 2016.