

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Marina Viveiros Trajano Cruz

**Análise Morfológica da Musculatura Cardíaca de Ventrículos de Camundongos  
com Disfunção Colinérgica.**

Belo Horizonte  
2013

Marina Viveiros Trajano Cruz

**Análise Morfológica da Musculatura Cardíaca de Ventrículos de Camundongos  
com Disfunção Colinérgica.**

Dissertação submetida ao Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre  
em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca  
Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Guatimosim

Belo Horizonte  
2013

Aos meus amados pais, Antônio e Darci, aos meus irmãos, Bruno e Felipe, e ao meu grande amor, André!

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por estar sempre presente nos apoiando em todas as decisões.

Aos meus pais, Antônio e Darci, pelo amor e apoio incondicionais. Obrigada de coração por todas as possibilidades que vocês me proporcionaram! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Bruno e Felipe pelo carinho.

Ao André, meu amigo, companheiro e amor. Obrigada pela paciência e incentivo! Te amo para sempre!

Ao Eduardo, que antes mesmo de chegar me motiva, incentiva e me torna mais forte. Mamãe te ama Dudu!

À duas criaturas especiais que fazem parte da minha vida, Carlota pela companhia nas noites de estudo, escrita de projeto e relatórios discentes; e Filó, pela companhia no término dessa jornada.

Ao meu grande amigo Hermann, por tudo que sempre fez e por não deixar morrer dentro de mim ensinamentos e sonhos.

Ao amigo Marcos, pelo incentivo para que eu realizasse essa caminhada.

A todos meus queridos amigos, em especial a Lê por sempre me entender e escutar.

A todos os meus familiares que sempre estiveram presentes e torcem pelo meu sucesso, em especial às minhas avós Marina e Rosa.

À Professora Cristina Guatimosim por me receber e por todos os ensinamentos.

À Professora Silvia Guatimosim pela colaboração e ensinamentos.

À Professora Patrícia Massara Martinelli, pela colaboração e ensinamentos.

À Professora Janice pelo carinho de sempre.

Aos meus queridos professores Celina e Ian do curso de Fisioterapia, que plantaram a primeira semente da pesquisa em minha vida.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia da Neurotransmissão: Bárbara, Grazielle, Jéssica, Luana, Matheusito, Matheus, Priscila, Rayara, Rubens pela amizade, ajuda e claro, pelas risadas!

Ao Diogo e à Aline, pelas conversas, trocas de informação e atenção.

Aos funcionários do Centro de microscopia da UFMG, em especial a Robertinha.

Aos colegas, professores e a Diana do curso de Pós-graduação em Biologia Celular.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

Os meus sinceros agradecimentos.

## **Apoio Institucional**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Neurotransmissão do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca e co-orientação da Dra. Silvia Guatimosim (Departamento de Fisiologia) e com o apoio financeiro das seguintes instituições:

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

## RESUMO

A acetilcolina (ACh) é o mediador químico do sistema nervoso parassimpático, e no coração ativa receptores pós-sinápticos específicos, chamados muscarínicos, gerando redução da frequência cardíaca, diminuição da força de contração e do metabolismo celular. Para que a ACh seja liberada na fenda sináptica e desempenhe seu papel na musculatura cardíaca é necessário que aconteça um importante evento da neurotransmissão colinérgica que é a internalização do neurotransmissor (NT) nas vesículas sinápticas via transportador vesicular de ACh (VACHT). Prado et al. (2006) geraram uma linhagem de camundongos que apresenta expressão reduzida (*knockdown*) do gene do VACHT para avaliar a importância funcional deste transportador na neurotransmissão colinérgica. Estudos a respeito das alterações cardíacas desses animais têm demonstrado uma diminuição da função cardíaca do ventrículo esquerdo com diminuição do índice de contratilidade e sinais sugestivos de hipertrofia cardíaca. Este trabalho pretende investigar possíveis alterações cardíacas no ventrículo esquerdo durante o desenvolvimento de animais selvagens e transgênicos para o VACHT nas idades de 21 dias, 3 e 12 meses. Utilizando a técnica de microscopia óptica realizamos medimos a frequência volumétrica de alguns parâmetros tais como: núcleos celulares, fibra muscular, vasos e tecido conjuntivo. Através dessa análise nós observamos que os animais VACHT KDHOME não apresentaram nenhuma alteração significativa nas idades de 21 dias e 3 meses e que os animais VACHT KDHOME com a idade de 12 meses apresentaram um aumento no perfil de vasos sanguíneos. Utilizando ainda a microscopia de rotina, realizamos a medida do diâmetro dos cardiomiócitos nas três idades estudadas. Os animais VACHT KDHOME animais somente nas idades de 3 e 12 meses apresentaram um aumento significativo no diâmetro dos cardiomiócitos quando comparados aos animais VACHT WT. Com o intuito de realizar uma investigação mais detalhada, utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão para analisar a musculatura ventricular esquerda destes animais no plano ultraestrutural. Medimos a frequência volumétrica de alguns parâmetros tais como: perfis de mitocôndrias, miofibrilas, núcleos, túbulos T, ente outros. Através dessa análise nós observamos que os animais VACHT KDHOME nas idades de 3 e 12 meses apresentaram um aumento na quantidade de miofibrilas e uma diminuição no perfil de mitocôndrias quando comparados aos animais VACHT WT. Esses dados poderão ser usadas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o controle de aspectos

relacionados à disfunção colinérgica no envelhecimento e em doenças que cursam com comprometimento da função cardíaca.

## ABSTRACT

Acetylcholine (ACh) is the chemical mediator of the parasympathetic nervous system and activates specific postsynaptic receptors in the heart, called muscarinic, reducing heart rate, contraction power and cellular metabolism. ACh is released into the synaptic cleft and plays its role in cardiac muscle when an important event of the cholinergic neurotransmission must happen: the NT internalization in the synaptic vesicles via vesicular ACh transporter (VACHT). Prado et al. (2006) generated a strain of mice that has reduced expression (knockdown) of VACHT gene to assess the functional importance of this transporter in cholinergic neurotransmission. Studies of cardiac abnormalities of such animals have demonstrated a decrease in cardiac function of the left ventricle with reduction of contractility index and suggestive signs of cardiac hypertrophy. This work aims to investigate possible cardiac changes in the left ventricle in VACHT WT and KD animals in the ages of 21 days, 3 and 12 months. Using optical microscopy we measured the volumetric rate of some parameters such as cellular nucleus, muscular fiber, vessels and connective tissue. Through this analysis we observed that at the histological level, there was no difference in left ventricles from animals VACHT KD HOM and WT at 21 days and 3 months. At 12 months of age, there was an increase in blood vessels profile in left ventricles from VACHT KD HOM compared to WT. We also measured the size of cardiomyocytes in the three studied ages. The animals VACHT KD HOM solely at the ages of 3 and 12 months showed a significant increase in the size of the cardiomyocytes compared to VACHT WT animals. We used transmission electron microscopy to analyze the left ventricular muscles of these animals in ultrastructural level. We measured the volumetric rate of some parameters such as mitochondria profile, myofibrils, nucleus, T tubules, among others. We observed that animals VACHT KD HOM at ages of 3 and 12 months (not 21 days) showed an increase in the number of myofibrils and a decrease in the profile of mitochondria when compared to animals VACHT WT. This data may be useful for the development of new therapeutic strategies to control aspects related to cholinergic dysfunction in aging and in diseases with impaired cardiac function.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>12</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>14</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>17</b>
1.1 O Coração e seu sistema especializado de condução.....	17
1.2 O sistema nervoso autônomo e o controle da função cardíaca .....	18
1.3 Neurotransmissão colinérgica .....	20
1.4 Animais VChT knockdown: um modelo para se estudar a disfunção colinérgica cardíaca. ....	23
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos .....	26
<b>3 Materiais e Métodos .....</b>	<b>28</b>
3.1 Animais .....	28
3.2 Análise óptica- Histologia de Retina .....	28
3.3 Obtenção de imagens através de microscopia óptica.....	29
3.4 Análise das imagens de microscopia óptica- Frequência Volumétrica .....	29
3.5 Análise das imagens de microscopia óptica- Diâmetro dos Cardiomiócitos... 30	
3.6 Análise ultra-estrutural da musculatura cardíaca .....	31
3.7 Obtenção de imagens através de microscopia eletrônica de transmissão .....	32
3.8 Análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão. ....	32
<b>4 Resultados .....</b>	<b>35</b>
4.1 Animais de 21 dias.....	35
4.2 Animais Adultos .....	40
4.3 Animais Idosos .....	45
<b>5 Discussão .....</b>	<b>51</b>

<b>6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Representação do sistema de condução cardíaco, onde observamos a presença do nodo sinoatrial, nodo átrio-ventricular e fibras de purkinge. ....	18
<b>Figura 2:</b> Representação da inervação simpática e parassimpática no coração. À esquerda temos a representação esquemática da inervação simpática e à direita temos a representação esquemática do inervação parassimpática realizada pelo nervo vago.. ....	20
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo da vesícula sináptica.....	21
<b>Figura 4:</b> Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica.....	22
<b>Figura 5:</b> Imagem representativa da forma de análise no Image J para análise na histologia de retina. ....	30
<b>Figura 6:</b> Imagem representativa da forma de análise no AxioVision 4.8 para análise do diâmetro dos cardiomiócitos na histologia de retina.....	31
<b>Figura 7:</b> Imagem representativa da forma de análise no Image J para microscopia eletrônica de transmissão. ....	33
<b>Figura 8:</b> Análise óptica de ventrículo esquerdo de camundongos VACHT WT e HOM na idade de 21 dias.....	36
<b>Figura 9:</b> Diâmetro dos cardiomiócitos de animais VACHT WT e HOM com idade de 21dias.....	37
<b>Figura 10:</b> Análise ultraestrutural da musculatura cardíaca ventricular de animais VACHT WT e HOM com idade de 21dias.....	39
<b>Figura 11:</b> Análise óptica de ventrículos esquerdos de animais VACHT WT e HOM de 3 meses.....	41
<b>Figura 12:</b> Diâmetro dos cardiomiócitos de animais VACHT WT e HOM de 3 meses .....	42
<b>Figura 13:</b> Análise ultraestrutural da musculatura cardíaca ventricular de animais VACHT WT e HOM adultos de 3 meses. ....	44
<b>Figura 14:</b> Análise óptica de ventrículo esquerdo de camundongos VACHT WT e HOM idosos de 12 meses.....	46
<b>Figura 15:</b> Diâmetro dos cardiomiócitos de animais VACHT WT e HOM idosos de 12 meses.....	47

<b>Figura 16: Análise ultraestrutural da musculatura cardíaca ventricular de animais VChT WT e HOM idosos de 12 meses.. .....</b>	<b>49</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil- CoA = Acetil coenzima A

ACh = acetilcolina

AChcito = acetilcolina citosólica

AChE = acetilcolinesterase

AChves = acetilcolina vesicular

AMPc = monofosfato cíclico de adenosina

ANP = peptídeo natriurético atrial

AV = nodo átrio ventricular

BNP = peptídeo natriurético cerebral

ChAT = colina acetiltransferase

ChT1 = transportador de colina de alta afinidade

EROS = espécies reativas de oxigênio

M = Molar

M1 = receptor muscarínico do tipo M1

M2 = receptor muscarínico do tipo M2

M2-KO = *knockout* para o receptor muscarínico M2

M3 = receptor muscarínico do tipo M3

M4 = receptor muscarínico do tipo M4

M5 = receptor muscarínico do tipo M5

$\mu\text{m}$  = micrômetro

$\mu\text{m}^2$  = micrômetro quadrado

nm = nanômetro

PFA = paraformaldeído

RNAm = RNA mensageiro

SA = nodo sinoatrial

SNA = sistema nervoso autonômico

VAcHt = transportador vesicular de acetilcolina

VAcHt KD HOM = *knockdown* homozigoto para o VAcHt

WT = Wild Type

$\beta$ 1 = receptor  $\beta$ 1 adrenérgico

$\beta$ -MHC = cadeia pesada de miosina

## 1. INTRODUÇÃO

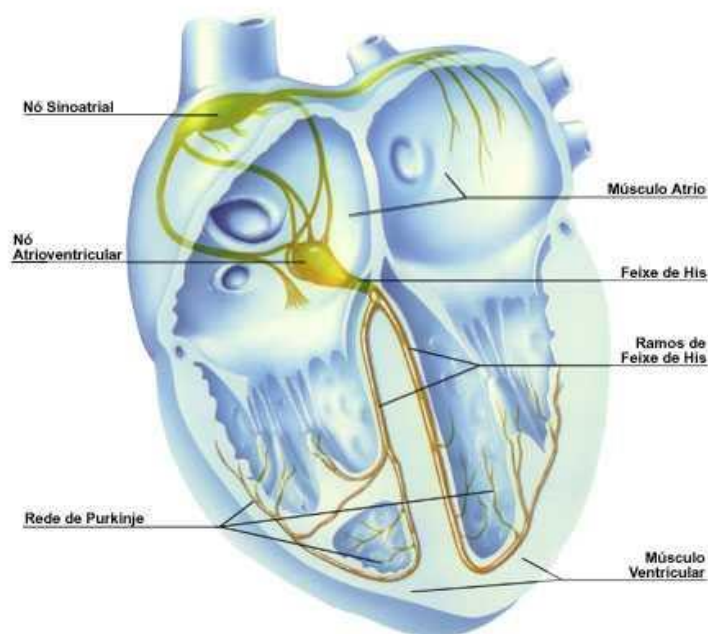
# 1 Introdução

## 1.1 O Coração e seu sistema especializado de condução.

O coração possui um sistema de células especializadas que são responsáveis pela produção e condução de impulsos que levam à contração rítmica da musculatura cardíaca. Este sistema é capaz de promover contração atrial e propagar o impulso gerando uma contração quase que simultânea das duas porções ventriculares. Durante o percurso, o impulso sofre um pequeno retardo na condução para que seja possível o total enchimento das câmaras dos ventrículos. Na fibra muscular cardíaca dos ventrículos, o potencial de ação é desencadeado por um estímulo elétrico que promove a abertura dos canais rápidos de sódio sensíveis à voltagem. Essa abertura permite um rápido influxo de sódio para o interior da fibra por alguns milésimos de segundos e posterior inativação destes canais. Em seguida os canais lentos de cálcio-sódio são abertos e por promoverem a internalização de cargas positivas para a fibra muscular observa-se a presença de um platô no potencial de ação ventricular. Por fim, a abertura dos canais de potássio com grande difusão de íons potássio para fora da célula, faz com que o potencial de membrana retorne ao seu valor de repouso (KAESE *et al*, 2012). Antes de chegar ao ventrículo, o potencial de ação é gerado e conduzido por um sistema especializado e condutor do qual fazem parte (**Figura 1**):

- A. Nodo sinoatrial (SA)**, região muscular especializada com capacidade de autoexcitação e conseqüente produção de impulsos e contrações automáticas e rítmicas. É a região responsável por desencadear o potencial de ação que vai ser transmitido ao músculo cardíaco de forma geral. Diferentemente dos ventrículos, quando as células especializadas estão em repouso, existe um vazamento dos íons sódio para o meio interno celular, tornando o potencial de membrana menos negativo. O potencial de ação gerado no nodo sinoatrial é mais lento que o ocorrido na musculatura ventricular e é o vazamento de íons sódio para o interior celular que provoca sua autoexcitação e conseqüente geração do potencial de ação (MONFREDI *et al*, 2010).
- B. Vias internodais**: são formadas por fibras atriais responsáveis pela condução dos impulsos SA para o nodo atrioventricular (AV).

- C. **Nodo átrio-ventricular**, constitui uma região especializada em retardar o impulso para que os átrios consigam esvaziar todo o seu conteúdo nos ventrículos antes que comece a contração ventricular.
- D. **Sistemas de Purkinje**: são constituídos por fibras musculares cardíacas mais espessas responsáveis pela condução do impulso aos ventrículos. Suas *gap junctions* (junções abertas) possuem alto grau de permeabilidade nos discos intercalares dispostos entre as sucessivas células cardíacas que formam a fibra de Purkinje, facilitando assim a passagem de íons e aumentando, por conseguinte a velocidade da condução (BOYDEN *et al*, 2010).



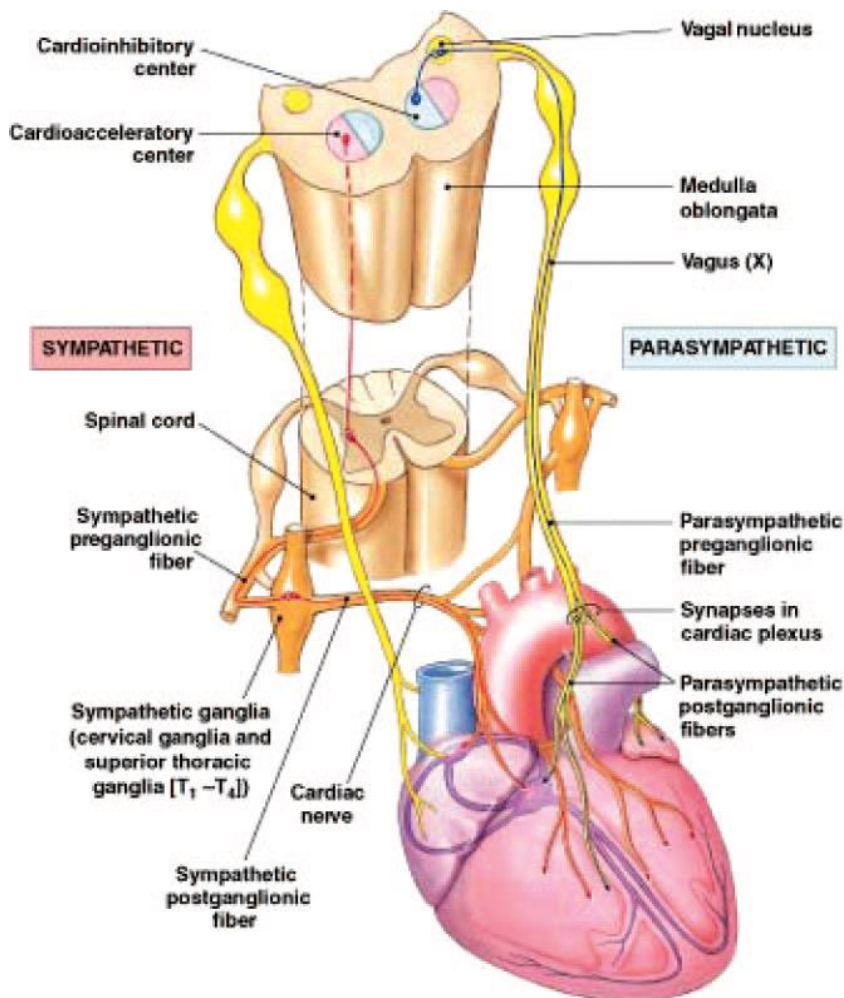
**Figura 1** Representação do sistema de condução cardíaco, onde observamos a presença do nodo sinusal, nodo átrio-ventricular e fibras de Purkinje. Fonte: <http://blogdoecg.blogspot.com.br/2010/04/imagens-de-sistema-de-conducao-cardiaca.html>

## 1.2 O sistema nervoso autônomo e o controle da função cardíaca

Além do controle cardíaco realizado pelo nodo SA, o coração recebe ainda a influência do sistema nervoso autônomo adrenérgico e colinérgico que são capazes de interferir na função da musculatura cardíaca por atuar nas células especializadas bem como também diretamente sobre as células musculares cardíacas padrão (FLAIM *et al*, 2007)(Figura 2).

No coração, a inervação colinérgica é realizada via nervo vago, sendo encontrada no nodo sinoatrial, miocárdio atrial, nodo átrio-ventricular e sistema de condução ventricular (KENT *et al.* 1974). Nesses componentes cardíacos, a liberação da ACh diminuirá a atividade de marcapasso do nodo SA e condução do nodo AV (RANA *et al.*, 2010), provocando uma supressão do potencial de ação gerado em algumas fibras do átrio. Além disso, em algumas regiões do miocárdio atrial, a ACh promove a perda de excitabilidade (CARVALHO *et al.*, 1969). Algumas fibras parassimpáticas são encontradas ainda em menor quantidade no miocárdio ventricular, onde a estimulação realizada pela ACh sobre os receptores muscarínicos leva à inibição dos canais para cálcio voltagem dependente do tipo L e consequente diminuição da contratilidade dos cardiomiócitos (NAGATA *et al.* 2000). Com a diminuição da contratilidade ocorre uma redução da frequência cardíaca, diminuição da força de contração ventricular e do metabolismo celular. A redução da função parassimpática é encontrada durante o processo de envelhecimento e tem sido observada em algumas doenças que afetam a função cardíaca, tais como falência cardíaca (FLORAS 1993), diabetes (MABE *et al.* 2006) e hipertensão (DUPREZ 2008; WU *et al.* 2008).

Além do sistema nervoso parassimpático, encontra-se presente no coração o sistema nervoso simpático. Esse sistema utiliza como neurotransmissor a noradrenalina e no coração ativa receptores pós-sinápticos do tipo  $\beta_1$  (THAKERAY *et al.*, 2012). Quando estimulado, o sistema nervoso simpático promove um aumento da frequência cardíaca e da força de contração. Portanto, a sua ação promove eventos antagônicos aos do sistema parassimpático na musculatura cardíaca (OLSHANSKY, 2008).

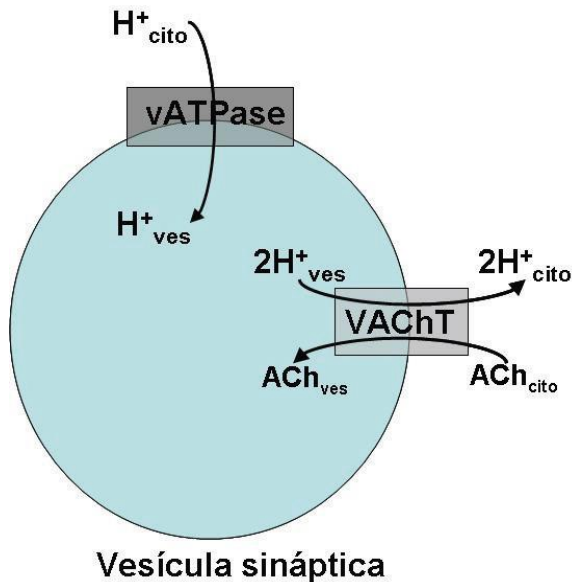


**Figura 2: Representação da inervação simpática e parassimpática no coração. À esquerda temos a representação esquemática da inervação simpática e à direita temos a representação esquemática do inervação parassimpática realizada pelo nervo vago. Fonte: Olshansky 2008.**

### 1.3 Neurotransmissão colinérgica

O sistema nervoso parassimpático é extremamente importante para o funcionamento do coração (ABRAMOCHKIN *et al*, 2009) e a acetilcolina (ACh) desempenha papel fundamental neste processo (Ventura *et al*, 2010). Ela é sintetizada nos terminais pré-sinápticos pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir da acetilação de uma molécula de colina previamente disponível no citoplasma do terminal neuronal (VENTURA *et al*, 2010). A colina utilizada na formação da ACh é originária principalmente da dieta, sendo levada às células nervosas pela corrente sanguínea (SCAGNELLI *et al*, 1991). Após sua síntese, a ACh é transportada para o interior de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (BOUCETTA E JONES, 2009), capaz de elevar em até 100 vezes a concentração desse neurotransmissor no interior dessas vesículas. O VACHT é uma glicoproteína que

possui de 500 a 600 aminoácidos e apresenta 12 domínios transmembranares, seu funcionamento é dependente de um gradiente eletroquímico. O VACHT promove a internalização de uma molécula de ACh realizando a troca por dois prótons. (PARSONS e cols., 2003) (Figura 3).



**Figura 3: Esquema representativo da vesícula sináptica.** O Transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) usa o gradiente químico produzido pela ATPase vacuolar do tipo V (vATPase) para transportar acetilcolina do citosol (ACh<sub>cito</sub>) para o interior da vesícula sináptica (ACh<sub>ves</sub>), trocando dois prótons (H<sup>+</sup><sub>ves</sub>) por uma molécula de ACh. Fonte: LIMA, 2008, p.5.

Com a chegada de um potencial de ação no terminal pré-sináptico colinérgico ocorre a abertura de canais para cálcio sensíveis à voltagem e o aumento da concentração de cálcio intracelular faz com que vesículas sinápticas contendo ACh sofram fusão (exocitose) com a membrana plasmática do terminal pré-sináptico, liberando assim o seu conteúdo na fenda sináptica. Após a exocitose e ativação dos receptores colinérgicos, a acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, gerando colina e acetato. A colina é recaptada para o interior do terminal por meio de seu transportador de membrana de alta afinidade (CHT1), sendo posteriormente reutilizada para a síntese de nova acetilcolina (RIBEIRO *et al.*, 2006)(Figura 4).



receptores colinérgicos do tipo muscarínico atuam como mediadores de várias funções fisiológicas como regulação da temperatura corporal, transpiração, motilidade do trato gastrointestinal, secreção de glândulas endócrinas e exócrinas, frequência cardíaca e pressão sanguínea (KREJČÍ *et al*, 2004).

Na musculatura cardíaca são encontrados os seguintes subtipos de receptores muscarínicos: M1, M2 e M3. O subtipo M2 está presente em maior quantidade e quando ativado, acopla-se preferencialmente à proteína G inibitória, inibindo assim a atividade da enzima adenilciclase e reduzindo os níveis intracelulares de AMP cíclico (VENTURA *et al*, 2010). Além disso, a ativação dos receptores M2 promove a abertura dos canais para potássio com consequente hiperpolarização da célula cardíaca (LACROIX *et al.*, 2008). A hiperpolarização diminuirá a excitabilidade da fibra cardíaca a novos potenciais de ação (LACROIX *et al.*, 2008). Já a redução dos níveis de AMPc por sua vez leva a uma inibição da ativação dos canais de cálcio do tipo L a uma redução da contração da musculatura cardíaca (WETTSCHURECK *et al*, 2005).

Lacroix *et al* (2008) mostraram que camundongos Knockout para o receptor M<sub>2</sub> possuem uma maior susceptibilidade ao estresse cardíaco, sugerindo um possível papel protetor do sistema nervoso parassimpático no coração. De encontro a esses resultados, a estimulação vagal tem sido caracterizada como benéfica no quadro de insuficiência cardíaca que cursa com uma estimulação aumentada do sistema nervoso simpático (SABBAH *et al*, 2011). Existem vários estudos que analisam os efeitos da estimulação vagal na cardioproteção, mas os mecanismos envolvidos nessa proteção ainda são pouco conhecidos, uma vez que alterações crônicas na liberação de ACh podem ser letais (LARA *et al*, 2010).

#### **1.4 Animais VAcT knockdown: um modelo para se estudar a disfunção colinérgica cardíaca.**

Um grupo de pesquisadores coordenado pelo Prof. Marco Antônio Prado, hoje no Robarts Institute da University of Western Ontário, gerou, por recombinação homóloga, uma linhagem de camundongos que apresenta expressão reduzida (*knockdown*) do gene do transportador vesicular da acetilcolina, para avaliar a

participação e a importância funcional do VAcHT na neurotransmissão colinérgica. Análises revelaram uma redução de 45% na expressão do VAcHT em camundongos heterozigotos enquanto nos homozigotos a redução foi de 65% (PRADO *et al.*, 2006). A menor expressão de VAcHT não levou à morte os animais geneticamente modificados, permitindo que os camundongos atingissem a idade adulta. Prado *et al.*, 2006 mostraram ainda que a redução na expressão do VAcHT levou a uma diminuição na liberação de ACh e que esses animais apresentavam ainda distúrbios neuromusculares acompanhados de alterações cognitivas. O VAcHT KD<sup>HOM</sup> não apresenta alterações em outras proteínas envolvidas na síntese e liberação de ACh e nem as responsáveis pela recepção da colina. (PRADO *et al.*, 2006).

Utilizando este modelo animal com disfunção colinérgica, Lara e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão reduzida do VAcHT causa alterações cardíacas importantes. Os animais apresentaram uma disautonomia que é causada pela diminuição do tônus colinérgico e essa diminuição cursa com um aumento do tônus simpático. As mudanças nos tônus são acompanhadas de aumento significativo na expressão dos níveis de RNA<sub>m</sub> dos receptores colinérgicos muscarínicos M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub> e diminuição nos receptores adrenérgicos  $\beta_1$  nos camundongos adultos VAcHT KD<sup>HOMO</sup>. Outras alterações foram encontradas por esses autores no que diz respeito a: diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo; presença de marcadores de estresse cardíaco como peptídeo natriurético atrial, peptídeo natriurético do tipo B, cabeça pesada  $\beta$  da miosina; hipertrofia cardíaca concêntrica e diminuição das correntes de cálcio. A hipertrofia cardíaca apresentada por LARA *et al.*(2010) foi pronunciada a partir dos animais com 6 meses, sendo que não foi possível observar alterações nos animais de 3 meses. Entretanto características ultraestruturais do tecido muscular cardíaco destes animais com disfunção colinérgica ainda não foram descritas.

## 2. OBJETIVOS

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar as possíveis alterações morfológicas da musculatura cardíaca do ventrículo esquerdo de camundongos com disfunção colinérgica resultante da deleção parcial do gene do transportador vesicular de acetilcolina nas idades de 21 dias, 3 e 12 meses..

### **2.2 Objetivos Específicos**

-Analisar qualitativamente no plano óptico amostras de tecido muscular cardíaco de ventrículo esquerdo.

-Realizar análise quantitativa no plano óptico de perfis de vasos, núcleos, fibra muscular e determinar o diâmetro de cardiomiócitos em amostras de tecido muscular cardíaco de ventrículo esquerdo.

-Analisar qualitativamente no plano ultraestrutural amostras de tecido muscular cardíaco de ventrículo esquerdo.

-Realizar análise quantitativa no plano ultraestrutural de perfis de vasos, núcleos, número de miofibrilas, matriz extracelular, mitocôndrias em amostras de tecido muscular cardíaco de ventrículo esquerdo.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Animais**

Para a realização deste estudo nós utilizamos camundongos C57BL/6J selvagens (*WT*) e com alteração na expressão do VAcHt (*knockdown*) gerados pela equipe do professor Marco Antônio Prado utilizando técnicas de recombinação homóloga baseadas no sistema Cre-LoxP (PRADO *et al.*, 2006; DE CASTRO *et al.*, 2009). Essas linhagens de camundongos transgênicos encontram-se no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG e estão sob a responsabilidade da Profa. Silvia Guatimosim Fonseca, colaboradora deste projeto. Os animais *WT* e *knockdown* foram estudados nas idades de 21 dias, adultos (8-12 semanas) e idosos (12 meses), constituindo grupos de 3 animais de cada genótipo para as idades em estudo.

#### **3.2 Análise óptica- Histologia de Rotina**

Grupos de animais C57BL/6J *WT* e *knockdown* nas idades de 21 dias e adultos (8-12 semanas) e idosos (12 meses) foram destinados a experimentos de microscopia óptica. Os camundongos foram sacrificados e os corações foram dissecados e separados em átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo. Para examinar diferenças morfológicas, as preparações cardíacas de ventrículo esquerdo foram fixadas em solução de paraformaldeído 4,0%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) por 48hs a 5°C. Em seguida, os músculos foram desidratados em uma série ascendente de etanol (70, 80, 90 e 95%) em temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada uma pré-infiltração em uma solução 1:1 de álcool 95% e resina glicol metacrilato (Leica Histo-resin) por 24 horas a 5°C e uma infiltração por mais 24 horas em resina glicol metacrilato pura (Leica Histo-resin). Por fim, os fragmentos foram incluídos em resina glicol metacrilato, contendo o polimerizador, por no mínimo 12 horas à temperatura ambiente. Após a polimerização dos blocos de resina contendo os fragmentos do tecido foi realizada a microtomia com navalha de vidro (cortes de 3µm), utilizando um micrótomo (Leica Reichert-Jung®) localizado no laboratório de Neurobiologia do departamento de morfologia do ICB. Os cortes foram então coletados em uma lâmina de vidro e corados com azul de toluidina durante 30 segundos. A solução de azul de toluidina é feita através da mistura do borato de sódio

1,9 gramas, azul de toluidina 1 grama e 98 mL de água destilada. O borato de sódio é dissolvido na água destilada e em seguida é adicionado o azul de toluidina a solução é então agitada e filtrada, sendo posteriormente armazenada em um vidro âmbar.

### **3.3 Obtenção de imagens através de microscopia óptica**

A aquisição das fotografias digitais dos cortes foi realizada em microscópio óptico Olympus BX 51 no Laboratório de Biologia das Interações Celulares, com autorização da professora Walderez Ornela Dutra.

### **3.4 Análise das imagens de microscopia óptica- Frequência Volumétrica**

As análises das imagens de microscopia óptica foram realizadas utilizando-se os programas Image J e Microsoft Excel. No programa Image J as imagens foram abertas e nelas foi inserido um gradeado com 108 pontos (Fig 5). A área de um quadrado dentro do gradeado correspondeu a  $225 \mu\text{m}^2$ , sendo que área total analisada foi  $19800 \mu\text{m}^2$  por imagem. Cada ponto de interseção das linhas dos quadrados foi considerado para a quantificação dos itens analisados tais como: núcleos de cardiomiócitos, fibras musculares, vasos e núcleos de outras células. Para cada animal foram utilizadas 45 imagens totalizando uma área de  $891000 \mu\text{m}^2$ . Após a marcação no Image J, os dados foram transferidos para uma tabela no Microsoft Excel e posteriormente para o GraphPad Prism 4 onde os dados foram convertidos em representações gráficas. A análise estatística foi realizada pela aplicação dos testes *t-student* pareado. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

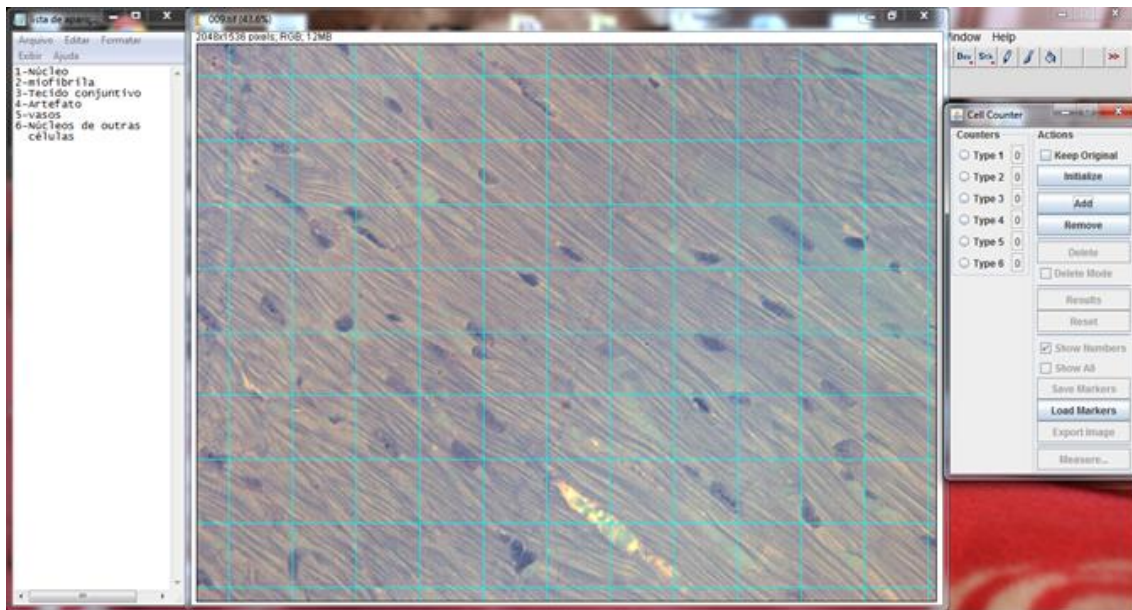
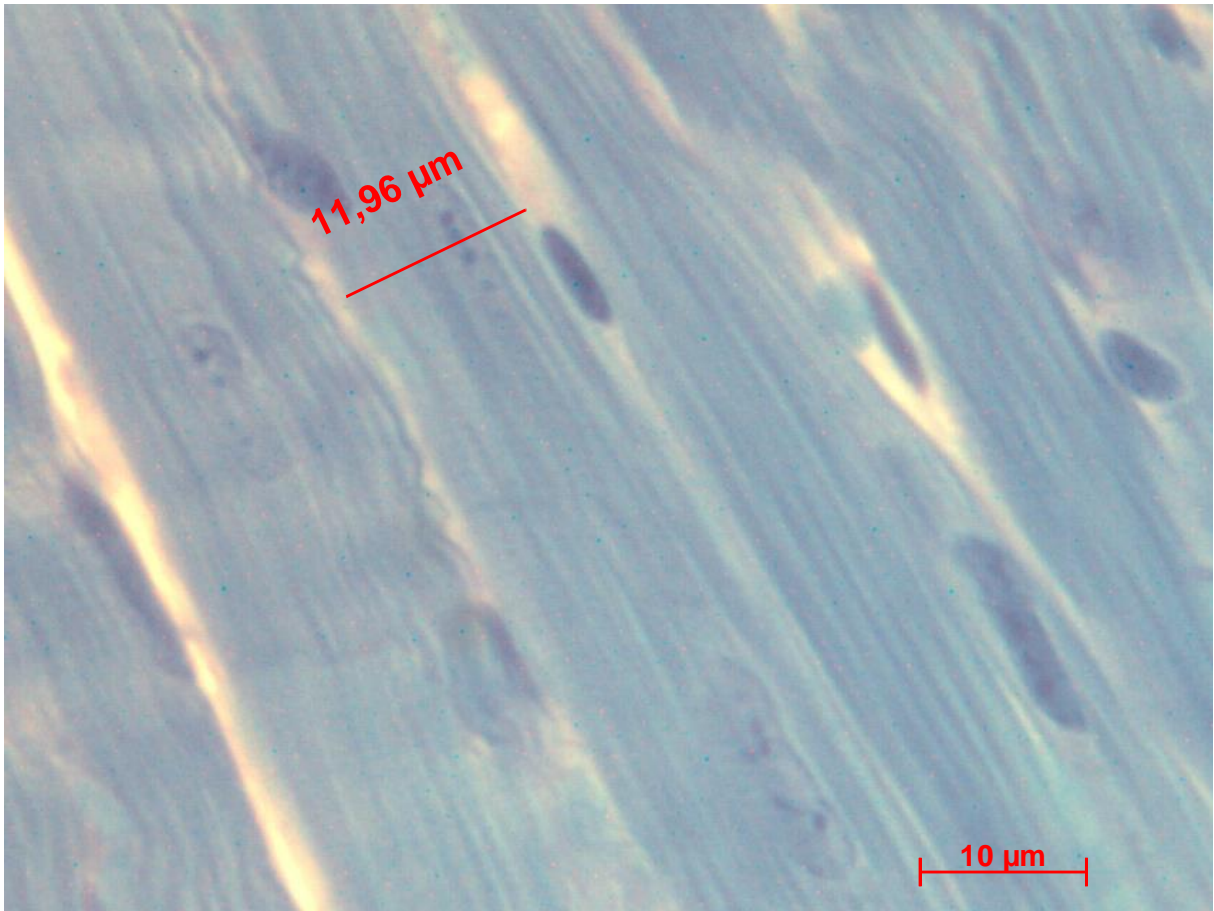


Figura 5: Imagem representativa da forma de análise no Image J para análise na histologia de retina.

### 3.5 Análise das imagens de microscopia óptica- Diâmetro dos Cardiomiócitos.

As análises das imagens de microscopia óptica para determinar o diâmetro dos cardiomiócitos foram realizadas utilizando-se os programas AxioVision Rel. 4.8 e Microsoft Excel. No programa AxioVision Rel. 4.8 as imagens foram abertas e foi realizada a medida do cardiomiócito em uma ferramenta própria do programa. As medidas eram realizadas utilizando como referência o centro do núcleo dos cardiomiócitos (fig 6). Para cada animal foram utilizados 15 cardiomiócitos. Após a marcação no AxioVision Rel. 4.8, os valores foram transferidos para uma tabela no Microsoft Excel e posteriormente para o GraphPad Prism 4 onde os valores foram convertidos em representações gráficas. A análise estatística foi realizada pela aplicação dos testes *t-student* pareado. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



**Figura 6:** Imagem representativa da forma de análise no AxioVision 4.8 para análise do diâmetro dos cardiomiócitos na histologia de rotina.

### **3.6 Análise ultra-estrutural da musculatura cardíaca**

Um grupo de animais C57BL/6J *WT* e *knockdown* nas idades de 21 dias, adultos (8-12 semanas) e idosos (12 meses) foram destinados a experimentos de microscopia eletrônica de transmissão. Os camundongos foram sacrificados e tiveram os corações dissecados e separados em átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo. Para examinar diferenças morfológicas no plano ultraestrutural, as preparações cardíacas de ventrículo esquerdo foram fixadas em solução de paraformaldeído 4,0%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7.4) (solução de Karnovsky modificada), *overnight* à 4° C. Após fixação, os tecidos foram pós-fixados em uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0.1M (pH 7.4) por 90 minutos a 4 °C. Ferrocianeto de potássio foi adicionado a esta solução na concentração 1,6% (solução de tetróxido de ósmio reduzido), para que fossem melhor evidenciadas as membranas celulares. Os tecidos foram lavados em solução de tampão cacodilato 0.1M (pH 7.4) em três banhos de 10 minutos à temperatura ambiente. Os músculos foram contrastados por imersão em uranila 2,0% *overnight* à 4° C, uma vez

que ela se liga a radicais fosfatos livres, melhora a visualização das estruturas. Em seguida, os músculos foram lavados com água deionizada por 10 minutos em temperatura ambiente e desidratados em uma série ascendente de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%) e acetona absoluta à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada uma pré-infiltração em resina epon diluída em acetona, nas respectivas proporções: 1:2, 1:1 e 2:1, na ausência do polimerizador. Por fim, os fragmentos foram infiltrados em resina epon, contendo o polimerizador, por no mínimo 2 horas à temperatura ambiente, 1 hora em estufa de 40° C e 48 horas em estufa de 60° C. Após a polimerização dos blocos de resina contendo os fragmentos do tecido foi realizada a ultramicrotomia com navalha de vidro (cortes semifinos de 300 nm) para seleção das áreas de interesse e, em seguida, a ultramicrotomia com navalha de diamante (cortes ultrafinos de 50 nm) apenas da região selecionada. Os cortes foram montados em grades de cobre de 200 *mesh* e contrastados com citrato de chumbo (solução de Reynolds), nosso último processo de contrastação, que potencializa ainda mais o contraste e permite a melhor visualização das membranas celulares. O processo de preparo das amostras foi realizado no Centro de Microscopia da UFMG.

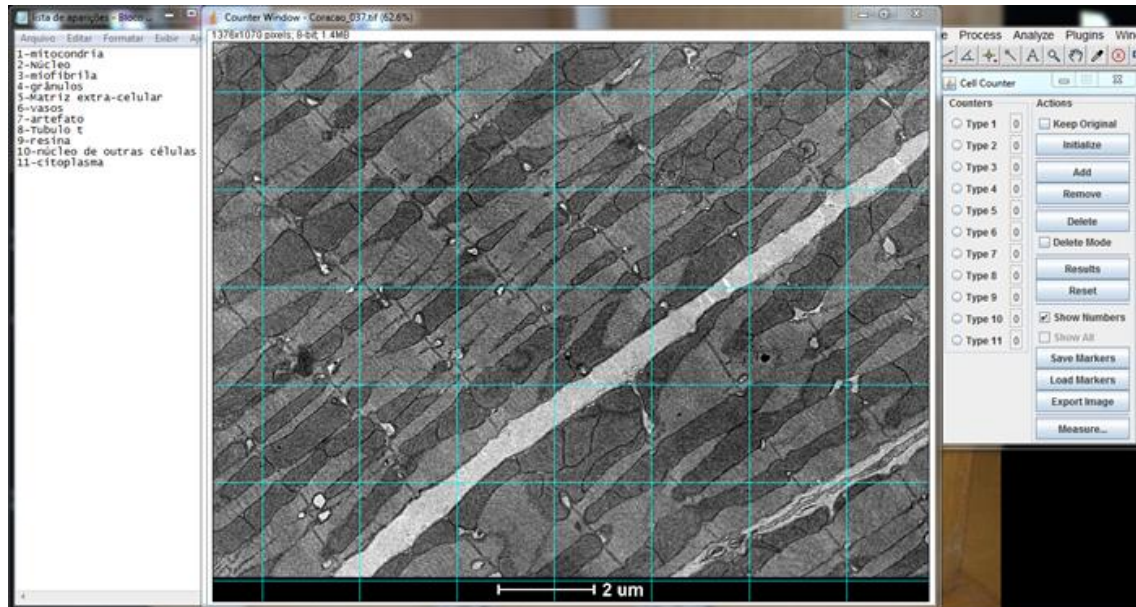
### **3.7 Obtenção de imagens através de microscopia eletrônica de transmissão**

A aquisição das fotografias digitais dos cortes ultrafinos foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit-FEI/Quanta, com voltagem de aceleração de 120 kV localizado no Centro de Microscopia da UFMG.

### **3.8 Análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.**

As análises das imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas utilizando-se os programas Image J e Microsoft Excel. No programa Image J as imagens foram abertas e nelas foi inserido um gradeado com 35 pontos cuja área de cada quadrado foi de 4  $\mu\text{m}^2$ , obtendo uma área total de 96  $\mu\text{m}^2$  por imagem. Cada ponto de interseção das linhas dos quadrados foi considerado para a quantificação dos itens analisados tais como: número de miofibrilas, perfis de mitocôndrias, perfis de matriz extracelular e perfis de núcleos, vasos e túbulos T. Para cada animal foram utilizadas 15 imagens totalizando uma área de 1440  $\mu\text{m}^2$ . Após a marcação no Image J, os dados foram transferidos para uma tabela no Microsoft Excel e posteriormente para o GraphPad Prism 4 onde os dados foram convertidos em representações gráficas. A

análise estatística foi realizada pela aplicação dos testes *t-student* não pareado. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



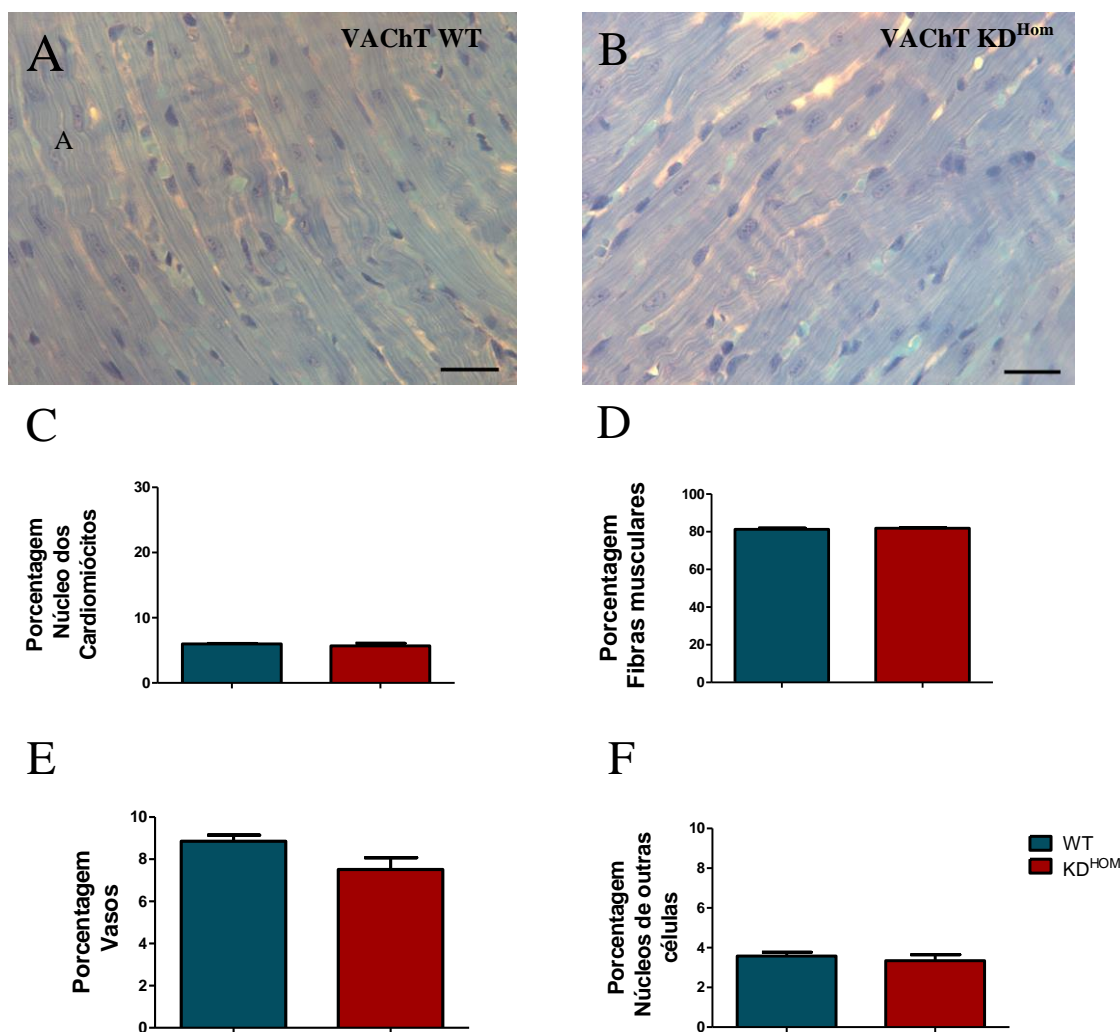
**Figura 7:** Imagem representativa da forma de análise no Image J para microscopia eletrônica de transmissão.

## 4. RESULTADOS

## 4 Resultados

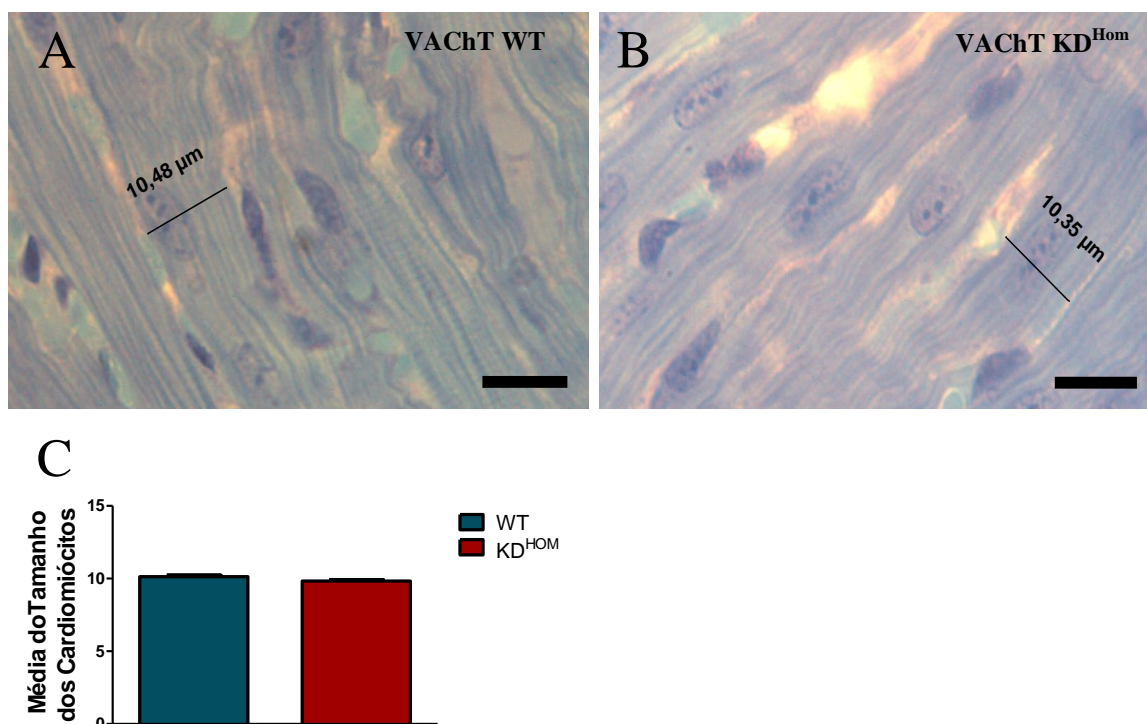
### 4.1 Animais de 21 dias

Iniciamos as nossas investigações em animais com a idade de 21 dias uma vez que é demonstrado na literatura que é nessa idade que o sistema nervoso autônomo colinérgico torna-se desenvolvido (FREGOSO and HOOVER, 2012). Para verificar possíveis alterações na morfologia dos ventrículos esquerdos de corações dos animais VACHT KDHOME em relação aos WT, utilizamos inicialmente a técnica de microscopia óptica de rotina. Nas figuras 8 A e 8 B podemos observar as imagens representativas de amostras de ventrículo esquerdo de animais VACHT KDHOME e VACHT WT respectivamente. Em uma análise qualitativa não percebemos nenhuma diferença entre os dois genótipos. Realizamos então, uma análise quantitativa comparando a porcentagem de aparições de parâmetros como: núcleos de cardiomiócitos (**figura 8 C**), fibras musculares (**figura 8 D**), vasos (**figura 8 E**) e núcleos de outras células (**figura 8 F**). Através da análise por proporção volumétrica observou-se que os camundongos VACHT KDHOME não apresentam diferenças significativa nos parâmetros avaliados quando comparados aos camundongos WT na idade de 21 dias (**Figura 8**).



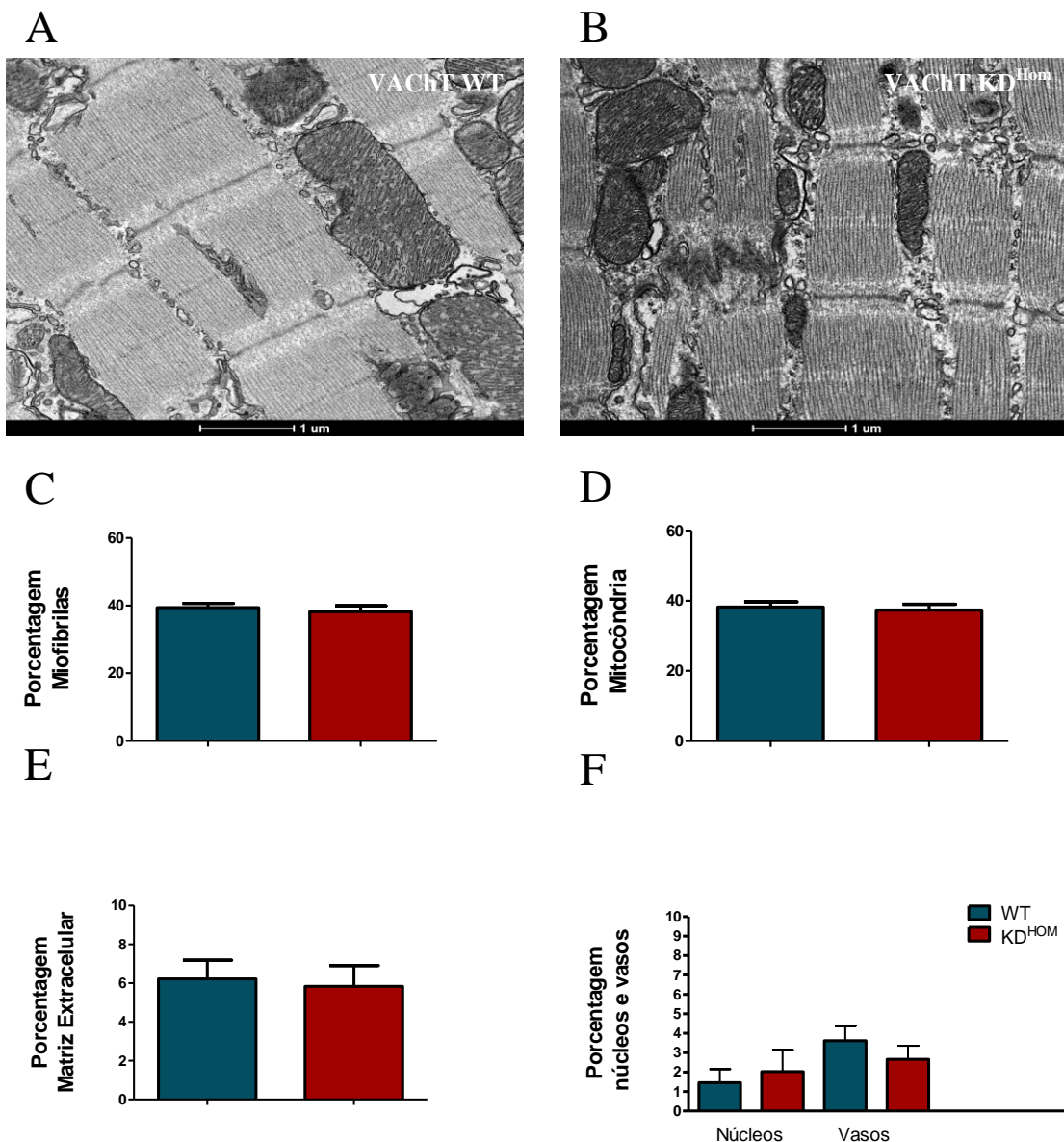
**Figura 8: Análise óptica de ventrículo esquerdo de camundongos VACHT WT e HOM na idade de 21 dias.** A- imagem representativa de microscopia óptica de um animal WT. Barra de escala 20  $\mu$ m. B- imagem representativa de microscopia óptica de um animal KD<sup>HOM</sup>. Barra de escala 20  $\mu$ m. C- Gráfico representando a porcentagem de aparições de perfis de núcleos de cardiomiócitos. D- Gráfico representando a porcentagem de aparições de perfis de fibras musculares. E- Gráfico representando a porcentagem de aparições de perfis vasos. F- Gráfico representando a porcentagem de aparições de perfis de núcleos de outras células. (n=6, 45 imagens analisadas por animal, magnificação 63X).

Outra forma de analisarmos alterações morfológicas que poderiam estar ocorrendo no tecido cardíaco é a medida do diâmetro dos cardiomiócitos. Utilizou-se então novamente a microscopia óptica para determinar esse parâmetro. Nas figuras 9 A e 9 B podemos observar imagens representativas de animais VACHT KD<sup>HOM</sup> e VACHT WT, respectivamente. A análise dos dados mostrou que os cardiomiócitos de amostras de ventrículo esquerdo de camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> não apresentam diferenças significativa no diâmetro dos cardiomiócitos quando comparados aos camundongos WT na idade de 21 dias (**Figura 9**).



**Figura 9: Diâmetro dos cardiomiócitos de animais VACHT WT e HOM com idade de 21 dias.** A- imagem representativa de microscopia óptica de um animal WT. Barra de escala 10 μm. B- imagem representativa de microscopia óptica de um animal KD<sup>HOM</sup>. Barra de escala 10 μm. C- Gráfico representando a média do diâmetro dos cardiomiócitos. . (n=6, 15 imagens analisadas por animal).

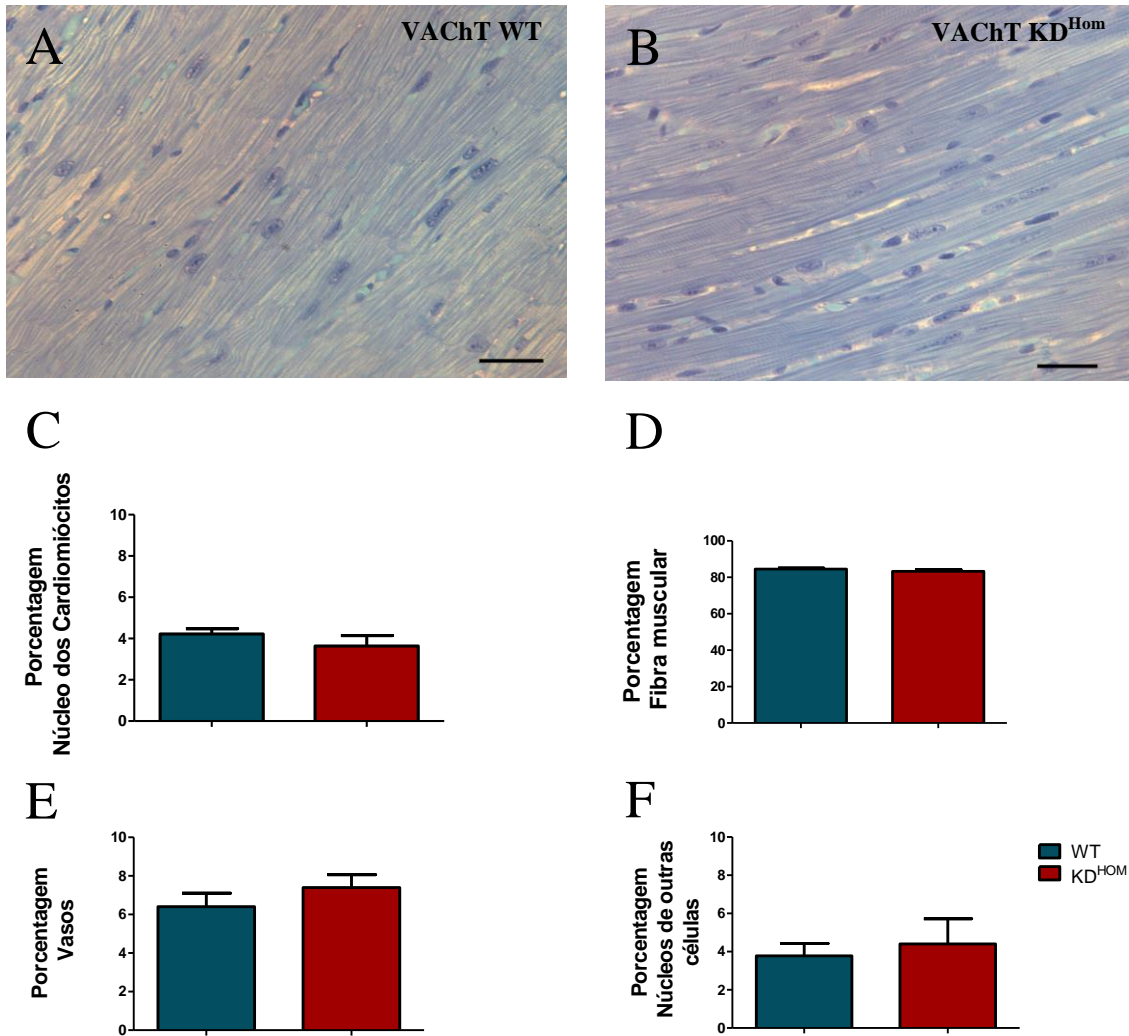
A fim de determinar os efeitos da expressão reduzida de VACHT na morfologia da musculatura cardíaca ventricular esquerda, utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão para examinar e caracterizar a ultraestrutura dos cardiomiócitos ventriculares de camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> nas idades de 21 dias. As imagens 10 A e 10 B são micrografias eletrônicas representativas de animais VACHT KD<sup>HOM</sup> e VACHT WT respectivamente. Podemos perceber que não existem diferenças evidentes quando comparamos os dois genótipos. Realizamos uma análise quantitativa por frequência volumétrica de alguns parâmetros como: número de miofibrilas (**figura 10 C**), perfis de mitocôndrias (**figura 10 D**), perfis de matriz extracelular (**figura 10 E**) e perfis de núcleos, vasos e túbulos T (**figura 10 F**). Através dessa análise observou-se que os camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> não apresentam diferenças significativa nos parâmetros avaliados quando comparados aos camundongos WT na idade de 21 dias (**Figura 10**).



**Figura 10: Análise ultraestrutural da musculatura cardíaca ventricular de animais VACHT WT e HOM com idade de 21 dias.** A- imagem representativa de microscopia eletrônica de transmissão de um animal WT. Barra de escala 1  $\mu$ m B- imagem representativa de microscopia eletrônica de transmissão de um animal KD<sup>Homo</sup>. Barra de escala 1  $\mu$ m C- Gráfico representando a média do número de aparições de miofibrila em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. D- Gráfico representando a média do número de aparições de mitocôndrias em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. E- Gráfico representando a média do número de aparições de matriz extracelular em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. F- Gráfico representando a média do número de aparições de núcleos, vasos e túbulos T em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. (n=6, 15 imagens analisadas por animal, magnificação 16500X).

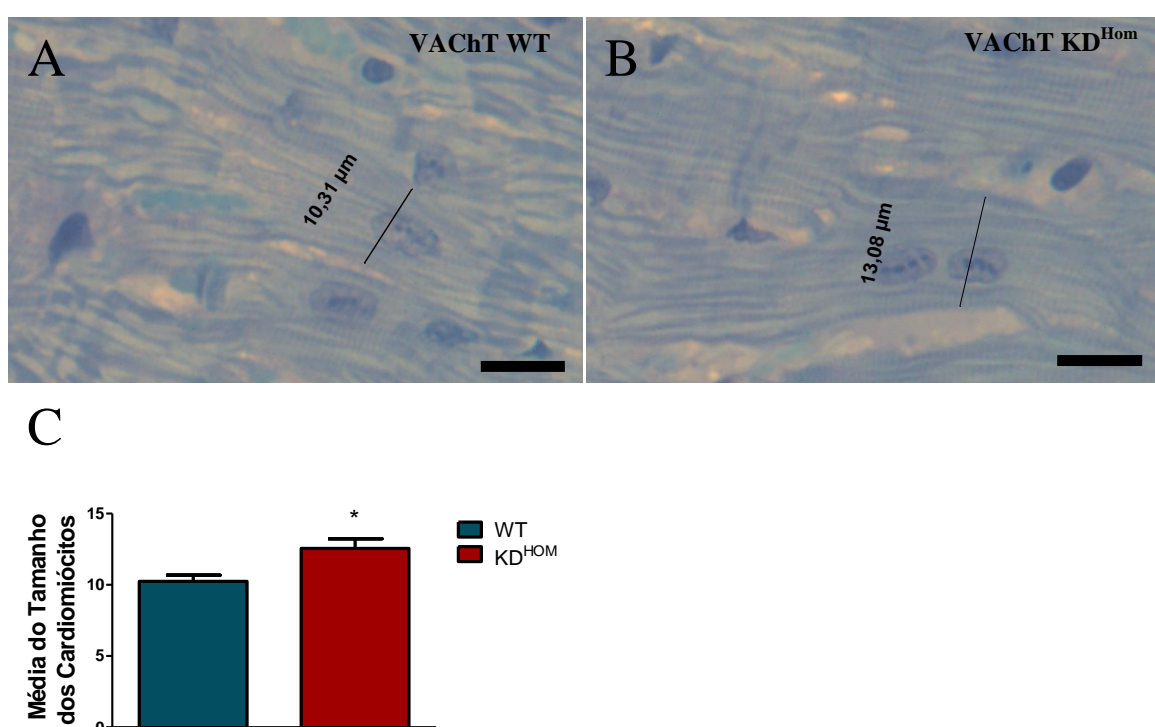
## 4.2 Animais Adultos

Nosso próximo passo foi então investigar se alterações poderiam surgir ao longo do desenvolvimento pós-natal. Para isso, realizou-se a mesma sequência de experimentos descrita anteriormente porém agora em animais de 3 meses. Nas figuras 11 A e 11 B podemos observar as imagens representativas de amostras de ventrículo esquerdo de animais VChT KDHOME e VChT WT respectivamente. Em uma análise qualitativa não conseguimos perceber diferenças aparentes nas imagens dos dois genótipos. Comparou-se a porcentagem de aparições de parâmetros como: núcleos de cardiomiócitos (**figura 11 C**), fibra muscular (**figura 11 D**), vasos (**figura 11 E**) e núcleos de outras células (**figura 11 F**). Através dessa análise quantitativa, observou-se que os camundongos VChT KDHOME não apresentam diferenças significativa nos parâmetros avaliados quando comparados aos camundongos WT na idade adulta (**Figura 11**).



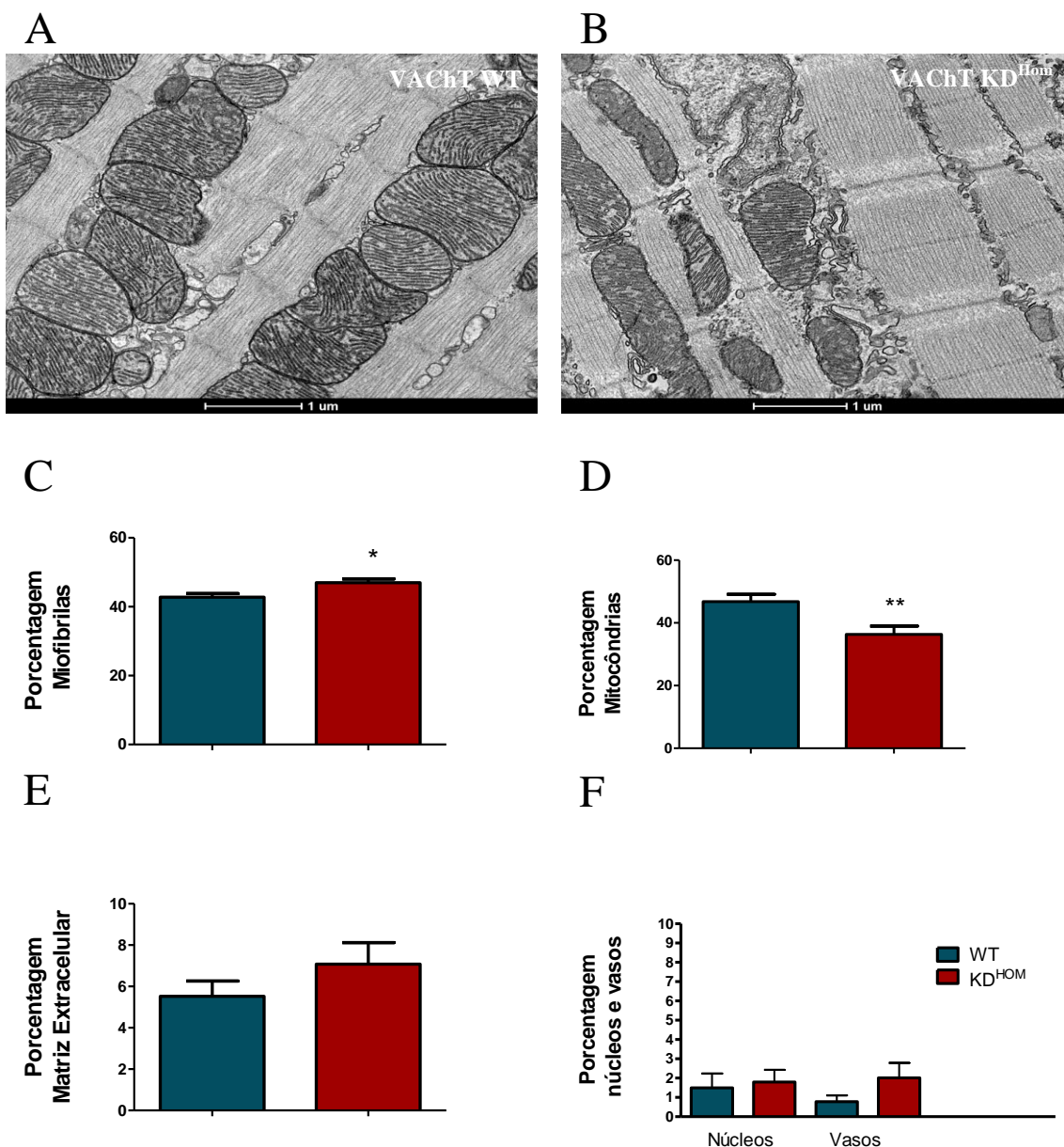
**Figura 11: Análise óptica de ventrículos esquerdos de animais VACHT WT e HOM de 3 meses.** **A-** imagem representativa de microscopia óptica de um animal WT. Barra de escala 20  $\mu$ m **B-** imagem representativa de microscopia óptica de um animal KD<sup>Hom</sup>. Barra de escala 20  $\mu$ m. **C-** Gráfico representando a percentagem de aparições de perfis de núcleos de cardiomiócitos. **D-** Gráfico representando a percentagem de aparições de perfis de fibras musculares. **E-** Gráfico representando a percentagem de aparições de perfis vasos. **F-** Gráfico representando a percentagem de aparições de perfis de núcleos de outras células. (n=6, 45 imagens analisadas por animal, magnificação 63X).

Apesar de não ter encontrado diferenças estatísticas em relação à frequência volumétrica, realizamos ainda uma análise em microscopia óptica para a determinação do diâmetro dos cardiomiócitos. As figuras 5A e B são imagens representativas e nelas é possível observar que o camundongo VACHT KD<sup>HOM</sup> apresentam diferenças significativa no diâmetro dos cardiomiócitos quando comparado ao WT. A análise quantitativas realizada em diferentes amostras de ventrículo esquerdo para cada genótipo estudado confirmam um aumento no diâmetro dos cardiomiócitos nos animais VACHT KD<sup>HOM</sup> (figura 12 C).



**Figura 12: Diâmetro dos cardiomiócitos de animais VACHT WT e HOM de 3 meses** A- imagem representativa de microscopia óptica de um animal WT. Barra de escala 10 μm B- imagem representativa de microscopia óptica de um animal KD<sup>HOM</sup>. Barra de escala 10 μm C- Gráfico representando a média do diâmetro dos cardiomiócitos. (n=6, 15 imagens analisadas por animal).

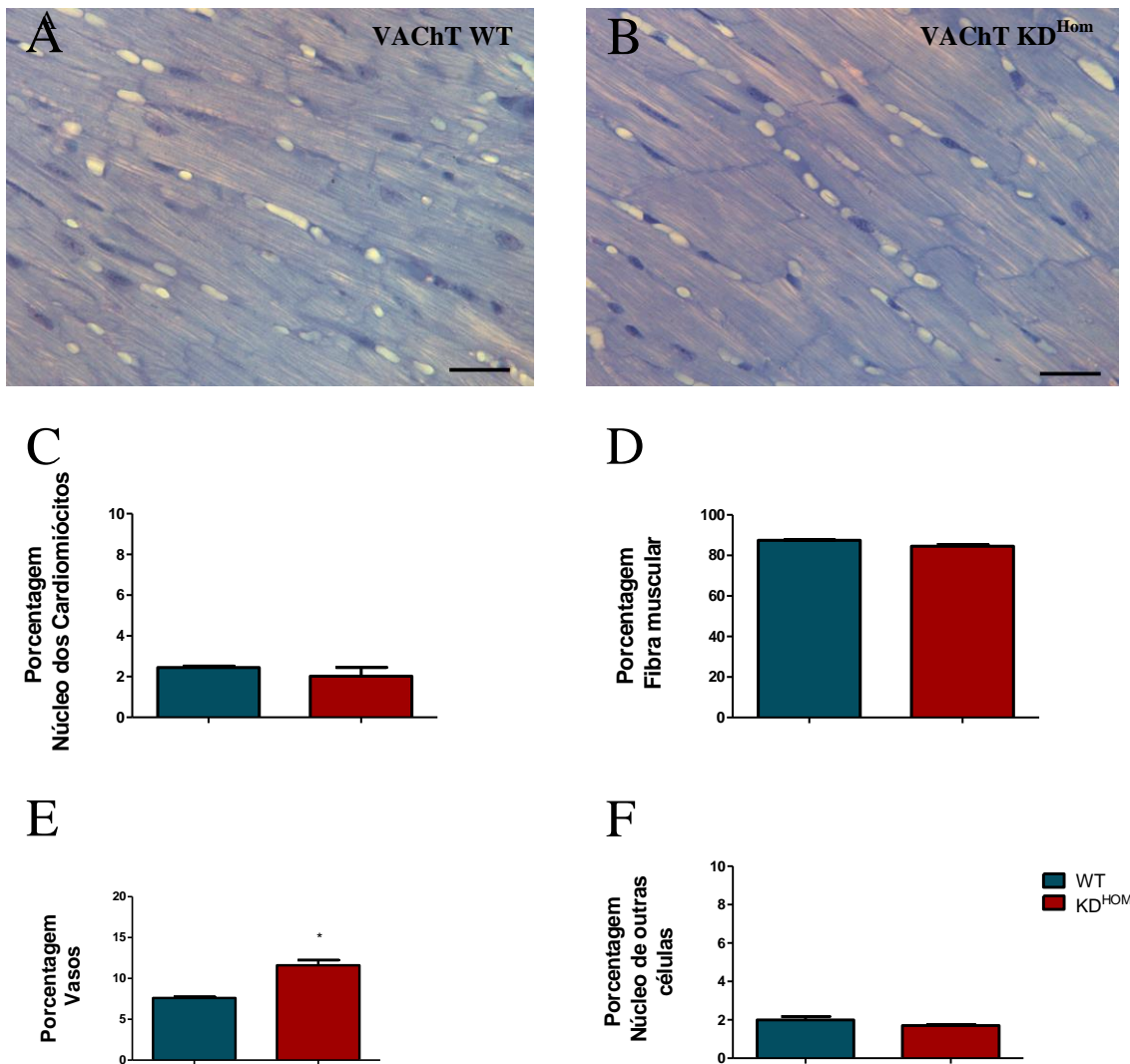
Diante dos achados em relação ao diâmetro dos cardiomiócitos através da microscopia óptica nos animais adultos, utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão para analisar possíveis alterações morfológicas ultraestruturais no ventrículo esquerdo de animais VACHT KDHOME na idade adulta. No plano ultraestrutural, observou-se que os animais VACHT KDHOME apresentam um maior número de miofibrilas e um menor número de mitocôndrias quando comparados aos animais VACHT WT (**figuras 13 A e 13 B**). Foi realizada ainda a quantificação por frequência volumétrica de alguns parâmetros tais como: número de miofibrilas (**figura 13 C**), perfis de mitocôndrias (**figura 13 D**), perfis de matriz extracelular (**figura 13 E**) e perfis de núcleos, vasos e túbulos T (**figura 13 F**). Através dessa análise quantitativa observou-se que os camundongos VACHT KDHOME não apresentam diferenças significativa nos parâmetros perfis de matriz extracelular, perfis de vasos, perfis de túbulos T e perfis de núcleos quando comparados aos camundongos WT. Já em relação ao número de miofibrilas, os animais VACHT KDHOME, apresentaram um aumento significativo quando comparados aos camundongos WT (**figura 13 C**). Os animais VACHT KDHOME também apresentaram ainda uma diminuição no perfil de mitocôndrias quando comparados aos camundongos WT (**figura 13 D**).



**Figura 13: Análise ultraestrutural da musculatura cardíaca ventricular de animais VACHT WT e HOM adultos de 3 meses.** A- imagem representativa de microscopia eletrônica de transmissão de um animal WT. Barra de escala 1  $\mu$ m. B- imagem representativa de microscopia eletrônica de transmissão de um animal KD<sup>HOM</sup>. Barra de escala 1  $\mu$ m. C- Gráfico representando a média do número de aparições de miofibrila em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. D- Gráfico representando a média do número de aparições de mitocôndrias em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. E- Gráfico representando a média do número de aparições de matriz extracelular em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. F- Gráfico representando a média do número de aparições de núcleos, vasos e túbulos T em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. (n=6, 15 imagens analisadas por animal, magnificação 16500X).

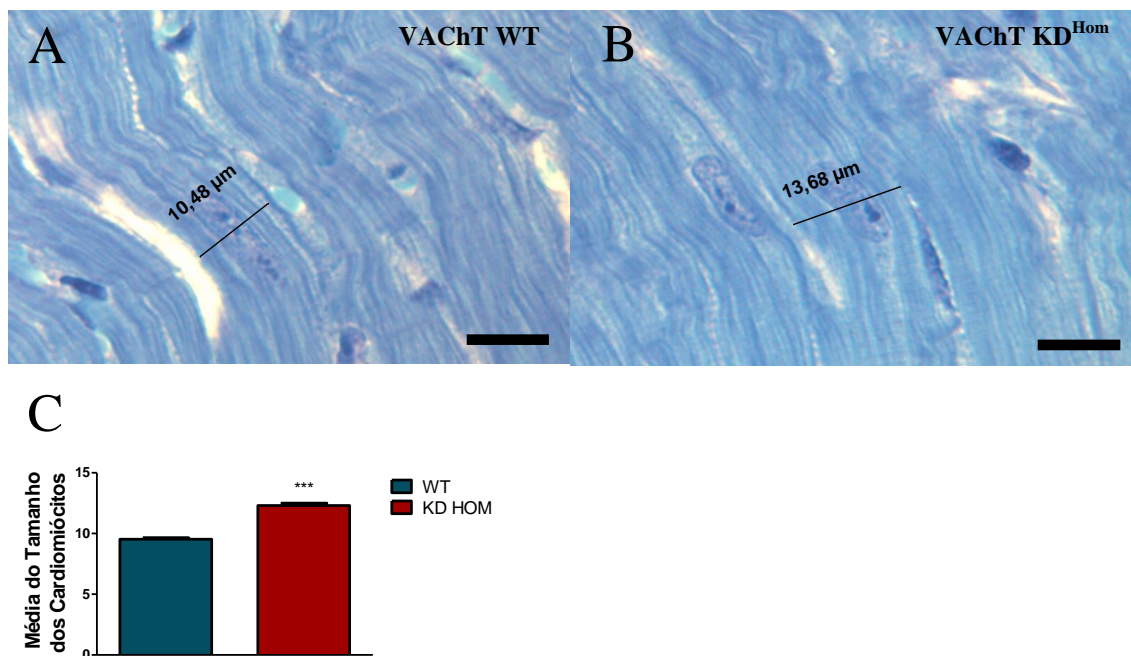
### 4.3 Animais Idosos

Visando acompanhar possíveis progressões nas alterações morfológicas na musculatura ventricular esquerda de camundongos VACHT KDHOME partimos para uma investigação em camundongos idosos de 12 meses. Utilizamos novamente a microscopia óptica para realizar um estudo baseado na frequência volumétrica. Nas figuras 14 A e 14 B podemos observar as imagens representativas de amostras de ventrículo esquerdo de animais VACHT KDHOME e VACHT WT respectivamente. Em uma análise qualitativa não podemos perceber nenhuma diferença marcante entre os dois genótipos. Nesse estudo nós comparamos assim como nas demais idades, a porcentagem de aparições de parâmetros como: núcleos de cardiomiócitos (**figura 14 C**), fibra muscular (**figura 14 D**), vasos (**figura 14 E**) e núcleos de outras células (**figura 14 F**) o que nos forneceu um dado quantitativo. Através dessa análise observamos que os camundongos VACHT KDHOME não apresentam diferenças significativas nos parâmetros núcleos de cardiomiócitos, fibra muscular e núcleos de outras células quando comparados aos camundongos WT. Já em relação ao perfil de vasos, encontramos um aumento significativo nos camundongos VACHT KDHOME quando comparados aos camundongos WT (**figura 14 E**).



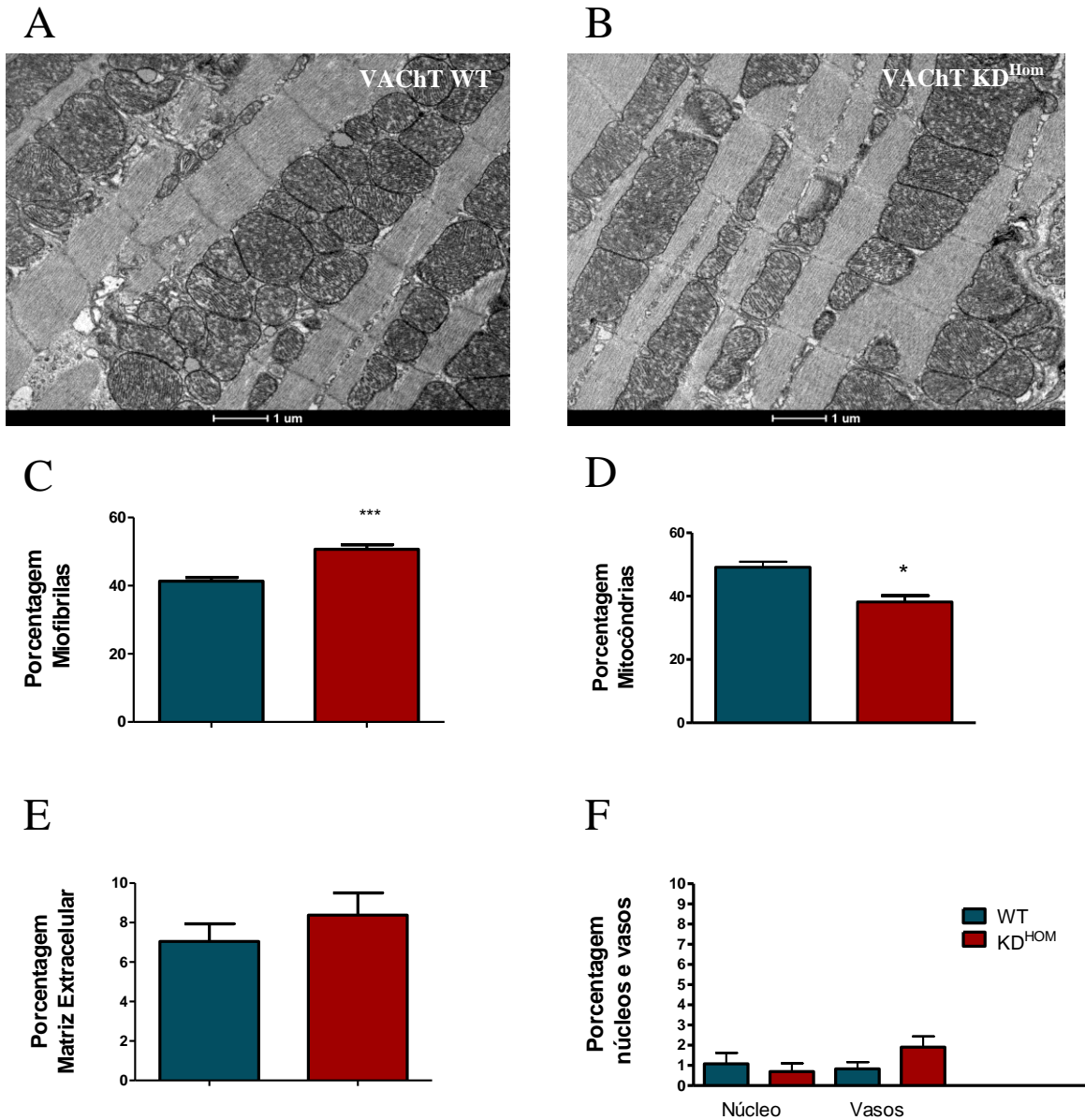
**Figura 14: Análise óptica de ventrículo esquerdo de camundongos VACHT WT e HOM idosos de 12 meses.** A- imagem representativa de microscopia óptica de um animal WT. Barra de escala 20  $\mu$ m. B- imagem representativa de microscopia óptica de um animal KD<sup>Homo</sup>. Barra de escala 20  $\mu$ m. C- Gráfico representando a porcentagem de aparições de perfis de núcleos de cardiomiócitos. D- Gráfico representando a porcentagem de aparições de perfis de fibras musculares. E- Gráfico representando a porcentagem de aparições de perfis vasos. F- Gráfico representando a porcentagem de aparições de perfis de núcleos de outras células. (n=6, 45 imagens analisadas por animal, magnificação 63X).

Mais uma vez não encontramos diferenças significativas em relação à frequência volumétrica de núcleos de cardiomiócitos e fibras musculares. Uma vez que em experimento anterior realizado com animais adultos nós encontramos diferenças entre os dois genótipos no que diz respeito ao diâmetro dos cardiomiócitos, nós então realizamos essa medida em amostras de ventrículos de animais idosos. As figuras 15 A e B são imagens representativas e nelas é possível observar que o camundongo VACHT KD<sup>HOM</sup> apresentam diferenças significativa no diâmetro dos cardiomiócitos quando comparado ao WT. A análise quantitativas realizada em diferentes amostras de ventrículo esquerdo para cada genótipo estudado confirmam um aumento no diâmetro dos cardiomiócitos nos animais VACHT KD<sup>HOM</sup> (**figura 15 C**).



**Figura 15: Diâmetro dos cardiomiócitos de animais VACHT WT e HOM idosos de 12 meses.** A- imagem representativa de microscopia óptica de um animal WT. Barra de escala 10 μm B- imagem representativa de microscopia óptica de um animal KD<sup>HOM</sup>. Barra de escala 10 μm C- Gráfico representando a média do diâmetro dos cardiomiócitos. (n=3, 15 imagens analisadas por animal).

Utilizamos mais uma vez a microscopia eletrônica de transmissão para investigar possíveis alterações ultraestruturais nos cardiomiócitos ventriculares esquerdos de camundongos com déficit colinérgico. Nas imagens representativas, observou-se que os animais VACHT KDHOME apresentam um maior número de miofibrilas e um menor número de mitocôndrias quando comparados aos animais VACHT WT (**figuras 16 A e 16 B**). Analisamos várias imagens para cada genótipo e medimos a frequência volumétrica de alguns parâmetros como: número de miofibrilas (**figura 16 C**), perfis de mitocôndrias (**figura 16 D**), matriz extracelular (**figura 16 E**), núcleos, vasos e túbulos T (**figura 16 F**). Através dessa análise quantitativa, observamos que os camundongos VACHT KDHOME não apresentam diferenças significativa nos parâmetros perfis de matriz extracelular, vasos, túbulos T e núcleos avaliados quando comparados aos camundongos WT. Já em relação ao número de miofibrilas, os animais VACHT KDHOME, apresentaram um aumento significativo quando comparados aos camundongos WT (**figura 16 C**). Os animais VACHT KDHOME apresentaram ainda uma diminuição no perfil de mitocôndrias quando comparados aos camundongos WT (**figura 16 D**).



**Figura 16: Análise ultraestrutural da musculatura cardíaca ventricular de animais VACHT WT e HOM idosos de 12 meses.** A- imagem representativa de microscopia eletrônica de transmissão de um animal WT. Barra de escala 1  $\mu$ m B- imagem representativa de microscopia eletrônica de transmissão de um animal KD<sup>HOM</sup>. Barra de escala 1  $\mu$ m C- Gráfico representando a média do número de aparições de miofibrila em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. D- Gráfico representando a média do número de aparições de mitocôndrias em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. E- Gráfico representando a média do número de aparições de matriz extracelular em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT. F- Gráfico representando a média do número de aparições de núcleos, vasos e túbulos T em camundongos VACHT-KD homozigotos comparados com VACHT WT.(n=6, 15 imagens analisadas por animal, magnificação 9000X).

## 5. DISCUSSÃO

## 5 Discussão

Neste trabalho nós caracterizamos as alterações morfológicas da musculatura cardíaca de camundongos com disfunção colinérgica resultante da expressão reduzida do VACHT. Em um estudo prévio realizado com esse mesmo modelo experimental, Lara et al (2010) descreveram que os animais VACHT KDHOME apresentaram um quadro de disautonomia cardíaca. A disautonomia consiste numa perda do balanço funcional do sistema nervoso autônomo, podendo manifestar-se através de um aumento da atividade simpática ou de uma hipoatividade parassimpática (OKOSHI *et al.*, 2004). O comprometimento da função do sistema nervoso autônomo pode gerar alterações estruturais compensatórias sobre a musculatura cardíaca na tentativa de manter o bom funcionamento do sistema cardiocirculatório (SELVETELLA *et al* 2005). Dessa forma, tornou-se importante investigar quais seriam as possíveis alterações morfológicas da musculatura cardíaca dos animais VACHT KDHOME em diferentes idades.

Dados da literatura sugerem que a neurotransmissão colinérgica no coração inicia-se por volta do décimo oitavo dia de vida embrionária onde são percebidos os primeiros ramos da inervação colinérgica. No entanto, é somente no vigésimo primeiro dia de vida pós-natal que a inervação colinérgica do coração encontra-se totalmente desenvolvida. Baseado nessa evidência, neste trabalho nós inicialmente realizamos a caracterização morfológica, nos planos óptico e ultraestrutural, do tecido muscular cardíaco de camundongos VACHT WT e KDHOME com a idade de 21 dias. Utilizando microscopia óptica de rotina, nós analisamos imagens de musculatura cardíaca para determinar a frequência volumétrica de algumas estruturas componentes desse tecido tais como: núcleos celulares, fibra muscular, vasos e tecido conjuntivo. Os nossos resultados não revelaram nenhuma diferença em relação à frequência volumétrica de perfis de núcleos de cardiomiócito ventriculares, de fibra muscular, de vasos e de núcleos de outras células nos camundongos VACHT KDHOME quando comparados aos VACHT WT como foi demonstrado na figura 8. Além disso, nós quantificamos o diâmetro dos cardiomiócitos através de uma medida transversal utilizando como referência o centro do núcleo. Nós não encontramos diferenças significativas no diâmetro destas células entre os dois genótipos, sugerindo que os cardiomiócitos

ventriculares dos camundongos VACHT KDHOME não sofreram alteração de diâmetro nos animais com a idade de 21 dias (figura 9). Com o intuito de avaliar se existiriam alterações no plano ultraestrutural, nós então partimos para uma análise desse tecido conforme demonstrado na figura 10. A análise ultraestrutural revelou que o tecido cardíaco dos camundongos VACHT KDHOME não apresenta nenhuma diferença significativa quando comparados aos VACHT WT.

Diogo Guimarães e colaboradores (dados não publicados), realizando estudo de função cardíaca neste mesmo modelo experimental nas idades de 3, 6 e 12 meses, relatam uma tendência para hipertrofia cardíaca nesses animais a partir de 3 meses de idade. Sendo assim, nós resolvemos analisar se existe alguma alteração morfológica na musculatura ventricular esquerda de animais VACHT KDHOME quando comparados aos animais VACHT WT na idade de 3 meses. Realizando análises de frequência volumétrica da musculatura cardíaca de animais VACHT KDHOME com 3 meses de idade, nós não encontramos nenhuma diferença em relação à frequência volumétrica de perfis de núcleos de cardiomiócito ventriculares, de fibra muscular, de vasos e de núcleos de outras células nos camundongos VACHT KDHOME quando comparados aos VACHT WT como foi demonstrado na figura 11. Entretanto, quando nós mensuramos o diâmetro dos cardiomiócito ventriculares também através da microscopia óptica, nós observamos que essas células apresentavam um aumento significativo do seu diâmetro nos animais VACHT KDHOME quando comparados aos animais VACHT WT (figura 12). Com base nesses resultados nós nos perguntamos se também poderiam existir alterações ultraestruturais na musculatura cardíaca dos animais VACHT KDHOME. A análise ultraestrutural revelou que o tecido cardíaco dos camundongos VACHT KDHOME apresentou uma diminuição no perfil de mitocôndrias e um aumento de miofibrilas quando comparados aos VACHT WT (Figura 13).

Lara et al (2010) utilizando técnica de imunofluorescência, através da marcação da  $\alpha$ -actinina, realizaram medidas da área celular dos cardiomiócitos. Essa marcação, demonstrou que cardiomiócitos ventriculares em cultura isolados a partir do coração de camundongos VACHT KDHOME na idade de 3 meses apresentavam uma diminuição na sua área quando comparados aqueles dos animais VACHT WT, sugerindo uma possível atrofia cardíaca. Esses autores também mediram diâmetro dos cardiomiócitos em amostras de ventrículo utilizando como coloração a conjugação de hematoxilina e eosina e observaram que os cardiomiócitos dos animais VACHT

KDHOM eram menores quando comparados aos dos animais VACHT WT (LARA *et al*, 2010). Tal resultado diverge daquele encontrado em nosso trabalho, considerando que a análise morfométrica revelou um aumento no diâmetro dessas células, sugerindo hipertrofia da musculatura cardíaca. O motivo dessa discrepância de resultados talvez possa ser explicado pela diferença nas técnicas utilizadas para avaliação da morfologia do cardiomiócito ventricular. Lara *et al* (2010) determinaram o diâmetro dos cardiomiócitos através da microscopia de rotina utilizando fixador e método de inclusão diferentes dos que nós empregamos em nossos estudos. Em nossos experimentos de microscopia óptica, as preparações cardíacas de ventrículo esquerdo foram fixadas em solução de paraformaldeído 4,0%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7.4) e incluídos em resina glicol metacrilato, diferentemente, Lara *et al* (2010) utilizaram como fixador uma solução de Bouin 4% e a parafina para a realização da inclusão. O Bouin é considerado um tipo de fixador coagulante e causa uma despolimerização das proteínas tissulares, fazendo com que as células e tecidos se apresentem com aspecto não homogêneo, o que dificulta a observação de aspectos citológicos. Por outro lado, a solução de paraformaldeído e glutaraldeído é considerada um fixador não-coagulante que estabelece ligações cruzadas entre as proteínas tissulares e fornece uma maior estabilização estrutural e conseqüentemente, uma melhor preservação histológica (AMARAL *et al*, 2004).

Conforme mencionado acima, nossos resultados referentes aos animais de 3 meses mostram um aumento no diâmetro dos cardiomiócitos ventriculares dos animais VACHT KDHOM, o que pode ser sugestivo de uma hipertrofia cardíaca. Lara *et al* (2010) avaliando a presença de marcadores para estresse cardíaco, identificaram um aumento nos níveis de RNAm para peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético tipo B (BNP) e a cadeia pesada de miosina ( $\beta$ -MHC) nos camundongos VACHT KDHOM de 3 meses. Além disso, os camundongos VACHT KDHOM nessa idade apresentaram uma diminuição na contratilidade de seus cardiomiócito ventriculares quando comparados aos animais VACHT WT (LARA *et al*. 2010). Esses dados de Lara e colaboradores (2010) demonstrando aumento de marcadores para estresse cardíaco e redução da contratilidade de cardiomiócito ventriculares. podem indicar de forma indireta uma hipertrofia cardíaca (FREY e OLSON, 2003) o que corrobora nossos dados

Os dados referentes à ecocardiografia dos animais VACHT KDHOM revelam como já mencionado anteriormente, que os animais possuem uma tendência

para hipertrofia cardíaca a partir dos 3 meses de vida. No entanto, na idade de 12 meses eles apresentam um aumento significativo da massa do ventrículo esquerdo sugerindo um processo de hipertrofia cardíaca (GUIMARÃES *et al* comunicação pessoal). Sendo assim, tornou-se importante analisar se existe alguma alteração morfológica na musculatura ventricular esquerda de animais VACHT KDHOME quando comparados aos animais VACHT em animais idosos. Avaliando essa possibilidade nós investigamos as alterações morfológicas na musculatura cardíaca de animais na idade de 12 meses, através da microscopia óptica convencional e também microscopia eletrônica de transmissão. Através da análise de frequência volumétrica a partir das imagens de histologia de rotina, nós encontramos que os animais VACHT KDHOME com 12 meses de idade apresentaram um aumento no perfil de vasos sanguíneos ao longo do tecido cardíaco ventricular em relação aos animais VACHT WT (figura 14). A análise do diâmetro dos cardiomiócitos ventriculares revelou que essas células eram maiores nos animais VACHT KDHOME quando comparados aos animais VACHT WT (figura 15). Além disso, a análise ultraestrutural, realizada através da frequência volumétrica, demonstrou que o tecido cardíaco ventricular dos camundongos VACHT KDHOME na idade de 12 meses apresentou uma diminuição no perfil de mitocôndrias e um aumento de miofibrilas quando comparados aos VACHT WT (figura 16), semelhante ao observado nos animais adultos.

Sabe-se que os animais VACHT KDHOME com idade de 6 meses apresentaram um aumento na parede do ventrículo esquerdo, sugerindo um processo de hipertrofia cardíaca concêntrica (LARA *et al.* 2010), que pode ocorrer devido a sobreposição da atividade simpática sobre a atividade parassimpática, resultando em um aumento na sobrecarga cardíaca e consequente hipertrofia compensatória (SELVETELLA *et al.*, 2005). As características que definem a hipertrofia são: um aumento do tamanho dos cardiomiócitos ventriculares, a síntese de proteína contráteis e estruturais aumentada, e uma maior organização do sarcômero (FREY *et al* 2003; FRANCHINI 2001). Os nossos dados de microscopia óptica e eletrônica mostrando que os cardiomiócitos ventriculares dos animais VACHT KDHOME na idade de 12 meses apresentam diâmetro aumentado e uma maior quantidade de miofibrilas também são sugestivos de hipertrofia cardíaca e corroboram os dados da literatura (LARA *et al.*, 2010 ; SELVETELLA *et al.*, 2005) Um outro estudo realizado por SELVETELLA *et al* (2005) indica que o processo de hipertrofia cardíaca se desenvolve por crescimento dos cardiomiócitos ventriculares, formação de capilares e proliferação de fibroblastos. Esses

achados estão de acordo com nossos resultados de microscopia óptica no qual nós encontramos um aumento no perfil de vasos sanguíneos na musculatura cardíaca ventricular nos animais VACHT KDHOME na idade de 12 meses.

Um dado curioso que nós encontramos e que não apresentamos em nossos resultados diz respeito ao fato de não termos observado nenhuma diferença na quantidade de tecido conjuntivo na musculatura cardíaca ventricular entre os animais VACHT KDHOME e VACHT WT na três idades estudadas. Nós esperávamos que os animais VACHT KDHOME nas idades 3 e 12 meses apresentassem uma maior quantidade de tecido conjuntivo em relação aos WT, levando em consideração que o estresse cardíaco e o envelhecimento contribuem para um aumento na quantidade desse tecido na musculatura (AGRAWAL *et al*, 2010). Uma possível explicação para o nosso achado seria que, durante o processo de coloração das lâminas histológicas, nós utilizamos o corante azul de Toluidina, que não é específico para evidenciar o tecido conjuntivo. Portanto, para afirmar com segurança que não existem diferenças significativas entre os genótipos considerando a quantidade desse tecido teríamos que realizar uma técnica de coloração específica para tal como, por exemplo, a coloração através do tricrômico de masson (JIHGYUAN *et al* 2011; LARA *et al*, 2010).

Além de alterações na quantidade de tecido conjuntivo, o coração em processo de envelhecimento é caracterizado por um declínio progressivo da função contrátil. Entre os fatores implicados em tais mudanças estão: substituição dos cardiomiócitos ventriculares por áreas de fibrose, dano oxidativo e déficit energético, que podem ser secundários à função mitocondrial reduzida ou diminuição do conteúdo mitocondrial (PICARD *et al*, 2012; BAYEVA *et al*, 2010). Os nossos resultados da análise ultraestrutural mostram que os animais VACHT KDHOME nas idades de 3 e 12 meses apresentam uma redução na quantidade de mitocôndrias no tecido cardíaco ventricular que pode estar relacionada com a diminuição de contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares como relatado por Lara e colaboradores (2010). Guimarães e colaboradores (dados ainda não publicados) utilizando sondas fluorescentes para quantificar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) nos corações dos animais VACHT KDHOME nas idades de 3, 6 e 12 meses perceberam um aumento na quantidade de EROs tanto citosólicas quanto mitocondriais nestes animais nas idades de 6 e 12 meses quando comparados aos animais VACHT WT. Esses dados corroboram o nosso achado da redução da quantidade de mitocôndrias na musculatura ventricular esquerda

de animais VACHT KDHOME na idade de 12 meses, já que o aumento da quantidade de EROS pode representar disfunção e morte mitocondrial (CHAUDHARY *et al*, 2011).

Baseado nas evidências relatadas nesse estudo que sugerem alterações morfológicas em um modelo experimental de disfunção colinérgica em diferentes idades, pouco se sabe a respeito de alterações morfológicas em outros modelos dessa disfunção. Há descrito na literatura outro modelo experimental para disfunção colinérgica como o estudado por Lacroix *et al* (2008). Esse modelo é representado por um camundongo knockout para o receptor M2-ACh (M2-KO). Lacroix *et al* (2008) demonstraram que estes animais M2-KO não apresentam nenhuma alteração na função cardíaca quando comparados com os animais M2-ACh WT em condições basais. Entretanto, quando são submetidos à situação de estresse cardíaco, como um aumento da frequência cardíaca através de hiperestimulação simpática, os animais M2-KO apresentaram uma diminuição da contratilidade, assim como a identificada por Lara *et al* (2010) em nosso modelo experimental. Uma vez que só foram estabelecidas alterações funcionais nos animais M2-KO, torna-se necessária a realização de análises morfológicas para comparações futuras de diferentes modelos de disfunção colinérgica.

## 6. CONCLUSÃO

## 6 Conclusão.

De forma inédita nós estudamos as alterações morfológicas da musculatura cardíaca ventricular esquerda de camundongos que apresentam expressão reduzida do transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT KDHOME). Este modelo animal apresenta uma disautonomia cardíaca que é caracterizada por hipoatividade do sistema nervoso parassimpático e consequente hiperatividade do sistema nervoso simpático. Em conjunto, nossos resultados sugerem a disautonomia cardíaca não induz alterações morfológicas na musculatura cardíaca ventricular esquerda em animais VAcHT KDHOME com a idade de 21 dias, sugerindo que alterações compensatórias podem se desenvolver em idades posteriores.

Interessantemente, nós encontramos que os animais VAcHT KDHOME nas idades de 3 e 12 meses apresentam alterações ultraestruturais importantes na musculatura ventricular esquerda, tais como um aumento na quantidade de miofibrilas, o que pode ser responsável pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos ventriculares encontrado através das análises de microscopia óptica. Além disso, nós também encontramos, ao nível ultraestrutural, uma redução na quantidade de mitocôndrias na musculatura cardíaca ventricular esquerda destes animais. Nossos resultados em conjunto com os dados relatados por Lara et al (2010) e Guimarães et al (dados ainda não publicados) sugerem que os animais VAcHT KDHOME desenvolvem um quadro de hipertrofia cardíaca a partir da idade adulta.

Nós sugerimos que outros trabalhos sejam desenvolvidos a partir dos dados relatados para que outras questões que ainda permanecem em aberto sejam respondidas, tais como: 1) investigar em que momento do desenvolvimento pós-natal dos animais VAcHT KDHOME entre as idades de 21 dias e 3 meses de idade as alterações morfológicas da musculatura cardíaca se iniciam; 2) avaliar se os animais VAcHT KDHOME apresentam hiperinervação colinérgica da musculatura cardíaca; 3) analisar de forma mais detalhada possíveis alterações mitocondriais; 4) realizar de forma mais adequada a quantificação do tecido conjuntivo presente na musculatura cardíaca ventricular esquerda de animais VAcHT KDHOME.

## 7. REFERÊNCIAS

## 7 Referências bibliográficas

AGRAWAL, R; AGRAWAL, N; KOYANI, N, C AND SINGH, R. 2010. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacological Research* 61. 269–280

ALTICK, A.L.; BARYSHNIKOVA, L.M.; VU, T.Q.; VON BARTHELD, C.S. 2009. Quantitative Analysis of Multivesicular Bodies (MVBs) in the Hypoglossal Nerve: Evidence That Neurotrophic Factors Do Not Use MVBs for Retrograde Axonal Transport. *The Journal of Comparative Neurology* 514:641–657

BOYDEN, P.A; HIROSE, M; DUN, W. Cardiac Purkinje cells. *Heart Rhythm*, Vol 7: 127-135,2010.

BOUCETTA, S.; JONES, B. E. Activity profiles of cholinergic and intermingled GABAergic and putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of urethane-anesthetized rats. *Journal Neuroscience*, v.29, p. 4664-4674, 2009.

BRANDON, E. P.; LIN, W.; D'AMOUR, K. A.; PIZZO, D. P.; DOMINGUEZ, B.; SUGIURA, Y.; THODE, S.; KO, C. P.; THAL, L. J.; GAGE, F. H.; LEE, K. F. Aberrant Patterning of Neuromuscular Synapses in Choline Acetyltransferase-Deficient Mice. *The Journal of Neuroscience*, v.23, n.2, p.539 –549, jan.2003.

CHAUDHARY, K, R; SIKHRY, H, EL AND SEUBERT, J, M. 2011. Mitochondria and the Aging Heart. *J Geriatr Cardiol*.v. 8(3): 159–167.

COLMANETTI, F.H; TEIXEIRA, V. P. A; RODRIGUES, M. L.P; CHICA, J. E. L; REIS, M. G. 2005. Myocardiocyte Ultrastructure and Morphometrical Analysis in Hamsters Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Ultrastructural Pathology*. 29:139-147.

DHEIN, S., C. J. VAN KOPPEN, AND O. E. BRODDE. 2001. Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol. Res.* 44:161-182.

DUPREZ, D. A. 2008. Cardiac autonomic imbalance in pre-hypertension and in a family history of hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51:1902-1903.

FONTANA, K.; WHITE, K.E.; CAMPOS, G.E.R.; HOFLING, M.A.C.; HARRIS, J.B. 2010. Morphological changes in murine skeletal muscle in response to exercise and mesterolone. *Journal of Electron Microscopy* 59(2): 153–164.

FLORAS, J. S. 1993. Clinical aspects of sympathetic activation and parasympathetic withdrawal in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 22:72A-84A.

FREGOSO, S, P AND HOOVER, D, B. Development Of Cardiac Parasympathetic Neurons, Glial Cells, and Regional Cholinergic Innervation of The Mouse Heart. *Neuroscience* 221, p 28–36. 2012.

FREY, N.; OLSON, E.N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev.Physiol.*, 65:45–79. 2003.

HERRING, N.; PATERSON, D.J. Neuromodulators of peripheral cardiac sympatho-vagal balance. *Experimental Physiology*, v. 94, n. 1, p. 46-53, 2008.

HOPPEL, C.L.; TANDLER, B.; FUJIOKA, H.; RIVA, A. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *The International Journal of Biochemistry e Cell Biology*, v. 41, p. 1949-1956, 2009.

JIHGYUAN, R; MIM, Y, GUANMING, QI; JIAO, Z; LIXIN JIA; JIZHONG, C; CUI, T; HUIHUA, L; XIN, L; AND JIE, D. Proinflammatory Protein CARD9 Is Essential for Infiltration of Monocytic Fibroblast Precursors and Cardiac Fibrosis Caused by Angiotensin II Infusion. *Am J Hypertens.*V.24(6): 701–707. 2011.

KENT, K. M., S. E. EPSTEIN, T. COOPER, AND D. M. JACOBOWITZ. 1974. Cholinergic innervation of the canine and human ventricular conducting system. Anatomic and electrophysiologic correlations. *Circulation* 50:948-955.

KREJČÍ, A.; MICHAL, P.; JAKUBÍK, J.; ŘÍČNÝ, J.; DOLEŽAL, V. Regulation of Signal Transduction at M<sub>2</sub> Muscarinic Receptor. *Physiol. Res.* 53 (Suppl. 1): S131-S140, 2004.

KORTH, M., V. K. SHARMA, AND S. S. SHEU. 1988. Stimulation of muscarinic receptors raises free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* 62:1080-1087.

LARA, A.; DAMASCENO, D.D.; PIRES, R.; GROS, R.; GOMES, E.R.; GAVIOLI, M.; LIMA, R.F.; GUIMARÃES, D.; LIMA, P.; BUENO, C.R. JR; VASCONCELOS, A.; ROMAN-CAMPOS, D.; MENEZES, C.A.; SIRVENTE, R.A.; SALEMI, V.M.; MADY, C.; CARON, M.G.; FERREIRA, A.J.; BRUM, P.C.; RESENDE, R.R.; CRUZ, J.S.; GOMEZ, M.V.; PRADO, V.F.; DE ALMEIDA, A.P.; PRADO, M.A.; GUATIMOSIM, S. Dysautonomia Due to Reduced Cholinergic Neurotransmission Causes Cardiac Remodeling and Heart Failure . *Molecular and Cellular Biology*, v.30, n.7, p. 1746-56, 2010.

LACROIX, C., J. FREELING, A. GILES, J. WESS, AND Y. F. LI. 2008. Deficiency of M2 muscarinic acetylcholine receptors increases susceptibility of ventricular function to chronic adrenergic stress. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 294:H810-H820.

MABE, A. M., J. L. HOARD, M. M. DUFFOURC, AND D. B. HOOVER. 2006. Localization of cholinergic innervation and neurturin receptors in adult mouse heart and expression of the neurturin gene. *Cell Tissue Res.* 326:57-67. 13.

MISGELD, T.; BURGESS, R. W.; LEWIS, R. M.; CUNNINGHAM, J. M.; LICHTMAN, J. W.; SANES, J. R. Roles of Neurotransmitter in Synapse Formation: Development of Neuromuscular Junctions Lacking Choline Acetyltransferase. *Neuron*, v.36, p.635–648, nov.2002.

NAGATA, K., C. YE, M. JAIN, D. S. MILSTONE, R. LIAO, AND R. M. MORTENSEN. 2000. Galpha(i2) but not Galpha(i3) is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ. Res.* 87:903-909.

OKOSHI, K.; NAKAYAMA, M.; YAN, X.; OKOSHI, M.P.; SCHULDT, A.J.; MARCHIONNI, M.A.; LORELL, B.H. Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation*, 110: 713-717, 2004.

PICARD, M; WRIGHT, K, J; RITCHIE, D; THOMAS, M, M AND HEPPLER, R,T. 2012. Mitochondrial function in permeabilized cardiomyocytes is largely preserved in the senescent rat myocardium. *PLoS One*, v.7(8):1-9.

PRADO, V. F.; MARTINS-SILVA, C.; CASTRO, B. M.; LIMA, R. F.; BARROS, D. M.; AMARAL, E. A.; RAMSEY, A. J.; SOTNIKOVA, T. D.; RAMIREZ, M. R.; KIM, H. G.; ROSSATO, J. I.; KOENEN, J.; QUAN, H.; COTA, V. R.; MORAES, M. F. D.; GOMEZ, M. V.; GUATIMOSIM, C.; WETSEL, W. C.; KUSHMERICK, C.; PEREIRA, G. S.; GAINETDINOV, R. R.; IZQUIERDO, I.; CARON, M. G.; PRADO, M. A. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*, v. 51, p. 601-612, 2006.

RANA, O.R.; SCHAUERTE, P.; KLUTTIG, R.; SCHRÖDER, J.W.; KOENEN, R.R.; WEBER, C.; NOLTE, K.W.; WEIS, J.; HOFFMANN, R.; MARX, N.; SAYGILI, E. Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Autonomic Neuroscience*, v. 156, p. 82-89, 2010.

RHEUBEN, M.B; AUTIO, D.M; XU, YOU-FEN; ATCHISON, W. D. 2004. Morphometric characterization of the neuromuscular junction of rodents intoxicated with 2,4-dithiobiuret: evidence that nerve terminal recycling processes contribute to muscle. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196:266– 286.

RIBEIRO, F. M.; BLACK, S. A. G.; PRADO, V. F.; RYLETT, R. J.; FERGUSON, S. S. G.; PRADO, M. A. M. P. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. *Journal of Neurochemistry*, v. 97, p. 1-12, abr. de 2006.

SELVETELLA, G AND LEMBO, G. 2005. Mechanisms of Cardiac Hypertrophy. *Heart Fail Clin*, v 1(2):263-73.

THAYER, J. F.; LANE, R.D. The role of vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality. *Biology Psychology*, v. 74, p. 224-242, 2005.

WU, J. S., F. H. LU, Y. C. YANG, T. S. LIN, J. J. CHEN, C. H. WU, Y. H. HUANG, AND C.J. CHANG. 2008. Epidemiological study on the effect of pre-hypertension and family history of hypertension on cardiac autonomic function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51:1896-1901.

VENTURA, A. L. M; ABREU, P. A; FREITAS, R. C. C.; SATHLER, P.C.; LOUREIRO, N.; CASTRO, H. C. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. *Rev Psiq Clín.* 2010;37(2):66-72 75

WEI-WEI ZHU, HUI-PING CHEN, YONG-CHUN GE, HONG-LANG XIE, CAI-HONG ZENG, LEI-SHI LI, ZHI-HONG LIU 2009. Ultrastructural changes in the glomerular filtration barrier and occurrence of proteinuria in Chinese patients with type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 6: 199-207

WETTSCHURECK N, OFFERMANN S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85: 1159–1204, 2005.