

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DO
ÓXIDO NÍTRICO NO REMODELAMENTO
ELETROMECÂNICO DO CORAÇÃO DURANTE A FASE
AGUDA DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA

Artur Santos Miranda

Belo Horizonte,
2015

Artur Santos Miranda

PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DO
ÓXIDO NÍTRICO NO REMODELAMENTO
ELETROMECÂNICO DO CORAÇÃO DURANTE A FASE
AGUDA DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.
Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

Coorientadora: Profa. Dra. Leda Quercia Vieira

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2015

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Membranas Excitáveis do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG;
- Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia do ICB-UFMG;

A execução deste trabalho contou com o auxílio financeiro das seguintes Agências de fomento:

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

Esse projeto também foi financiado parcialmente com recursos do processo número 404353/2012-6, edital Decit N° 40/2012 - Pesquisa em Doenças Negligenciadas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e minha Co-orientadora, Prof. Jader Cruz e Profa. Leda Quercia Vieira, pela oportunidade do desenvolvimento desse projeto de mestrado. Agradeço pela confiança depositada em mim e pela grande contribuição na minha formação acadêmica;

Aos amigos ex-colegas de laboratório que tiveram bastante importância na minha carreira científica e particularmente no delineamento desse projeto, Prof. Antônio Nei, Eduardo e Prof. Danilo Roman-Campos;

A todos os amigos de laboratório pelo apoio científico e também por todos os momentos de alegrias;

Ao Prof. Anderson José Ferreira, por disponibilizar muitos dos equipamentos utilizados na realização dos experimentos desse projeto;

A minha família: Minha mãe, Taninha, Meu pai Rafael, minha irmã Mariana pelo investimento moral e financeiro que permitiu a minha formação intelectual e de caráter como cidadão. Obrigado também pela compreensão e carinho, mesmo quando estou chato!

A minha segunda família: Junia, Jorge, Isabella, Matheus, e mais recentemente Pedro, por terem me acolhido em sua família e dado muito apoio e bons exemplos de confiança, carinho e determinação;

A todos os amigos da graduação pela constante amizade, em especial àqueles que sempre estiveram perto, Douglas, Ariane, Camila, companheiros de todos os trabalhos de última hora;

À minha namorada e companheira Julliane por todo o amor, carinho, paciência e dedicação depositada em nossa relação. Sua participação intelectual e pessoal foi fundamental, não só no desenvolvimento desse projeto, mas em todos os aspectos da minha vida!

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação Bioquímica e Imunologia;

Às Agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1- INTRODUÇÃO	13
1.1- Aspectos da estrutura e função do tecido cardíaco.....	13
1.1.1- Estrutura anatômica e aspectos mecânicos do ciclo cardíaco	13
1.1.2- Geração e propagação do impulso elétrico no coração	15
1.1.3- Contratilidade, excitabilidade e acoplamento excitação contração	17
1.1.4- Disfunções da atividade elétrica do coração	23
1.2- A Doença de Chagas	24
1.2.1- Aspectos etiológicos e epidemiológicos da Doença de Chagas	24
1.2.2- Aspectos clínicos da Doença de Chagas	25
1.3- Espécies Reativas de Oxigênio e Oxido nítrico	27
1.3.1- ROS: Vias de produção e modulação eletromecânica nos cardiomiócitos	27
1.3.2- NO: Vias de produção e modulação eletromecânica nos cardiomiócitos	29
1.3.3- ROS, NO e sua relação com a Doença de Chagas	31
2- JUSTIFICATIVA	33
3- OBJETIVOS	34
3.1- Objetivo Geral	34
3.2- Objetivos específicos	34
4- MÉTODOS	35
4.1- Grupos experimentais	35
4.2- Isolamento dos cardiomiócitos	35
4.3- Experimentos de contratilidade celular	36
4.4- Experimentos de patch-clamp	37
4.5- Microscopia confocal	39
4.6- Eletrocardiografia	40
4.7- Análise da função cardíaca ex vivo pela técnica de coração isolado	40
4.8- Análise de parâmetros hemodinâmicos in vivo	41
4.9- Análises estatísticas	41
5- RESULTADOS	42

5.1- Papel de ROS e NO na contratilidade dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas	42
5.2- Papel de ROS e NO nas propriedades do PA dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas	45
5.3- Papel de ROS e NO na modulação das correntes de potássio dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas	50
5.4- Envolvimento de ROS e NO na modulação das correntes de cálcio tipo-L dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas	53
5.5- Envolvimento de ROS e NO no manejo intracelular de cálcio dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas	54
5.6- Papel de ROS e NO na modulação das dos parâmetros da função cardíaca durante a fase aguda da Doença de Chagas	56
5.7- Envolvimento de ROS e NO na geração e propagação de arritmias cardíacas durante a fase aguda da Doença de Chagas	58
6- DISCUSSÃO	60
7- CONCLUSÕES	74
8- REFERÊNCIAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C- graus Celsius

μM- micromolar

μg- microgramas

μL- microlitros

MΩ- mega ohm

Akt- Proteína quinase B

ANOVA - Análise de variância

APR- *Action Potential Repolarization*- Repolarização do potencial de ação

bpm - batimentos por minuto

dpi- dias pós-infecção

E.P.M- erro padrão da média

eNOS- *endotelial nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase endotelial

CIB- *cell isolated buffered*

CICR- *calcium induced calcium release*

ECC- *excitation contraction coupling*- acoplamento excitação-contração

ECG- eletrocardiograma

F- fluorescência

F0- fluorescência basal

FC- frequência cardíaca

FFR - *force-frequency relationship*- relação força-frequência

g- gramas

Hz- Hertz

I_{Ca-L}- corrente de cálcio tipo L

i.p.- intraperitoneal

i.v.- intravenoso

IFN-γ- Interferon-γ

I_{k1}- corrente de potássio retificadora de entrada

I_{Na}- corrente de sódio

iNOS - *inducible nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase endotelial

I_{to}- correntes de potássio transientes rápidas

KHz- kilo hertz

LTTC - *L-type calcium channel* - canal de cálcio tipo L

mV- milivolts

min- minutos
mL- mililitro
mg- miligrama
mM- milimolar
ms- milisegundo
mmHg- milímetros de mercúrio
n- número de animais
NAV- nó átrio ventricular
NCX- *sodium calcium exchanger*- trocador sódio/cálcio
nM - nanomolar
nNOS- *neuronal nitric oxide synthase* - óxido nítrico sintase neuronal
NO- *nitric oxide*- óxido nítrico
NOS- *nitric oxide synthase*- óxido nítrico sintases
Nox- NADPHoxidases
NSA- nó sino-atrial
PAM- pressão arterial média
PA- potencial de ação
pA- pico ampere
PE10 - tubo de polietileno número 10
pg- picograma
Phox KO- gp91PHOX *knockout*
PKG - proteína quinase G
RyR- *Ryanodin receptor* - receptor de rianodina
SERCA - *Sarco-Endoplasmic reticulum calcium* - Ca⁺²-ATPase do retículo sarcoplasmático
SR- *sarcoplasmatic reticulum*- retículo sarcoplasmático
ROS- *reactive oxygen species*- espécies reativas de oxigênio
rpm- rotações por minuto
TnC- troponina C
TnI- troponina I
TNF- α - *tumoral necrose factor* - fator de necrose tumoral
TV- taquicardia ventricular
V- volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do ciclo cardíaco	15
Figura 2: Esquema de um coração mostrando a via de propagação do estímulo	16
Figura 3: Representação da geração do perfil eletrocardiográfico	17
Figura 4: Participação dos diferentes tipos de correntes iônicas na gênese do potencial de ação	20
Figura 5: Esquema demonstrando a participação dos principais componentes envolvidos no ECC	21
Figura 6: Representação das etapas envolvidas no ciclo de pontes cruzadas durante o processo de contração celular	23
Figura 7: Principais vias de produção de ROS nos cardiomiócitos	28
Figura 8: Fontes de produção autócrinas e parácrinas de NO	31
Figura 9: Papel de ROS e NO nas propriedades contráteis dos cardiomiócitos	44
Figura 10: Papel de ROS e NO nas propriedades do PA em cardiomiócitos	46
Figura 11: Papel de ROS, NO e manejo intracelular de cálcio nas propriedades do PA em cardiomiócitos	47
Figura 12: Papel de ROS e NO na alternância da duração do PA em cardiomiócitos ..	49
Figura 13: Papel de ROS e NO na modulação da corrente transiente rápida de saída de potássio (I _{to}) em cardiomiócitos	51
Figura 14: Papel de ROS e NO na modulação da corrente de potássio retificadora de entrada (I _{K1}) em cardiomiócitos	52
Figura 15: Papel de ROS e NO na modulação da corrente de cálcio tipo-L em cardiomiócitos	53
Figura 16: Papel de ROS e NO no manejo intracelular de cálcio em cardiomiócitos ..	55
Figura 17: Envolvimento ROS e NO com parâmetros hemodinâmicos	56
Figura 18: Relação da produção de ROS e NO na função cardíaca	58
Figura 19: Papel de ROS e NO na geração de arritmias cardíacas	59

RESUMO

A infecção por *Trypanosoma cruzi* leva ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória intensa. Dentre as consequências dessa inflamação, altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) são produzidos, os quais atuam como efetores importantes mediando o controle dos parasitas e consequentemente da infecção, mas também podem causar dano tecidual inespecífico quando em concentrações exacerbadas. Em relação ao tecido cardíaco, ROS e NO já foram associados à capacidade de regular a função de muitos componentes envolvidos na manutenção das propriedades mecânicas e elétricas dos cardiomiócitos, bem como no fenômeno do acoplamento excitação-contração nestas células. Portanto, é razoável supor que essa produção de moléculas reativas tem um papel importante durante o estabelecimento da cardiomiopatia chagásica. Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar o envolvimento da produção e equilíbrio entre ROS e NO no remodelamento eletromecânico do coração durante a fase aguda da Doença de Chagas. Camundongos Wild-Type (WT) e deficientes para NADPH oxidase 2 (PHOXKO) foram infectados ou não com *T. cruzi* da cepa Y (i.p.). Todos os experimentos foram realizados após 15 ± 1 dias de infecção (dpi). Para os ensaios celulares, os cardiomiócitos foram isolados por meio da perfusão de uma solução nutritiva contendo uma mistura de enzimas através de um sistema de Langendorff, seguido por dispersão mecânica, em um gradiente de concentração crescente de cálcio. Foi observado que camundongos PHOXKO 15dpi apresentaram prolongamento do tempo para repolarização do potencial de ação (PA) em comparação com os outros grupos, os quais foram semelhantes entre si. No entanto PHOXKO 15dpi não tiveram alterações nas correntes de cálcio e de potássio de saída em comparação com os controles, em oposição aos cardiomiócitos provenientes de animais WT 15dpi, que tiveram uma redução em ambos os componentes. O aumento da duração do PA (APD) em PHOXKO 15dpi foi acompanhado pelo aumento da alternância do PA neste grupo, a qual tem sido relacionada à geração de arritmias graves. Tais alternâncias da APD foram melhoradas por pré-incubação com o inibidor das sintases de NO, L-NAME, embora o aumento da APD manteve-se inalterado. Além disso, ambos os camundongos WT e PHOXKO infectados apresentaram redução da fração de encurtamento celular, e o L-NAME foi capaz de restaurar este parâmetro apenas no grupo WT 15dpi. Além disso, os cardiomiócitos de PHOXKO 15dpi apresentaram níveis mais elevados de contrações arrítmicas independentes da estimulação de campo, quando comparado com outros grupos, as quais foram abolidas pela exposição ao L-NAME. Essas alterações na excitabilidade e contratilidade celular foram associadas à redução do transiente de cálcio em PHOXKO 15dpi quando comparado aos outros grupos, apesar de nenhuma diferença ter sido observada em sua fase de decaimento. A redução observada no pico do transiente nos animais PHOXKO 15dpi não foi restaurada pelo L-NAME. O conjunto de observações a nível celular refletiu-se em mudanças substanciais na função cardíaca estudada pela técnica de coração isolado, apesar de não haver diferenças significativas na tensão sistólica do coração entre os grupos. Também camundongos PHOXKO 15dpi apresentaram altas taxas de arritmias graves observadas no eletrocardiograma e redução da pressão arterial média estudada a partir da técnica de plestimografia de cauda. Com esses dados podemos então, concluir que a produção de ROS e NO modula diretamente as alterações eletromecânicas do coração durante a fase aguda da cardiopatia chagásica.

Palavras chaves: Coração, excitabilidade, contratilidade, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, arritmias, Doença de Chagas.

ABSTRACT

The infection by *Trypanosoma cruzi* leads to the development of an intense inflammatory response. Among the consequences of this inflammation, high levels of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) are produced, which act as important effectors mediating parasites killing and thus the control of infection, but also may cause nonspecific tissue damage under high amounts. Regarding the heart tissue, ROS and NO have been found to regulate the function of many components involved in management of the mechanical and electrical properties of the cardiomyocytes and so as in the excitation-contraction coupling phenomena in these cells. Ergo, it seems reasonable to hypothesize that this reactive molecules production has an important role during the establishment of the cardiomyopathy related to Chagas' disease. Therefore, in this study we aimed to investigate the involvement of ROS and NO production and balance in the electromechanical remodeling of the heart during the acute phase of Chagas' disease. Wild-Type (WT) mice and NADPH phagocyte oxidase-2 (PHOXKO) deficient mice were infected or not with 1000 Y strain *T. cruzi* i.p. All experiments were performed after 15±1 days of infection (dpi). For cell assays, cardiomyocytes were isolated by perfusing a nutritive solution containing a mix of enzymes through a Langendorff system, followed by mechanical dispersion, in an increasing calcium concentration gradient. We found that PHOXKO 15dpi mice displayed prolonged action potential (AP) repolarization time compared to the other groups, which were similar between themselves. However PHOXKO 15dpi had no changes in calcium and outward potassium currents compared to the controls, in spite of WT 15dpi, which had a reduction in both components. The increase in AP duration (APD) in PHOXKO15dpi was accompanied by increased APD alternans in this group, which has been related to the generation of severe arrhythmias. Such APD alternans was ameliorated by pre-incubation with the NO-synthases inhibitor L-NAME, although the increased APD was remained unchanged. Also, both infected PHOXKO and WT mice exhibited a decreased cell shortening during contraction when compared to the non infected mice, and L-NAME could restore this parameter only in the WT 15dpi group. Also, cardiomyocytes from PHOXKO15dpi displayed higher levels of arrhythmic contractions apart from the field stimulation when compared to other groups, which was fully abolished by exposure to L-NAME. The altered excitability and contractility was associated with reduced calcium transient in PHOXKO 15dpi compared to the other groups, although no difference was observed in the decay phase of the transient. Also the peak transient was not restored by L-NAME. The set of observations at the cellular level reflected in to significant changes in cardiac function studied by the isolated heart technique, despite no significant differences in the systolic tension of the heart between groups. Also PHOXKO 15 dpi mice exhibited high rates of severe arrhythmias in the electrocardiogram and low mean arterial pressure studied by tail plethimography, compared to the other groups. Overall, we conclude that ROS and NO production directly modulates the electromechanical remodeling of the heart during acute phase of chagasic cardiomyopathy.

Key words: Heart, excitability, contractility, Reactive oxygen Species, nitric oxide, arrhythmias, Chagas' disease.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos da estrutura e função do tecido cardíaco

1.1.1- Estrutura anatômica e aspectos mecânicos do ciclo cardíaco

O coração é um órgão muscular responsável pelo bombeamento de sangue para os vasos do sistema circulatório. Nos mamíferos o tecido muscular cardíaco se organiza delimitando quatro cavidades distintas, que atuam como bombas de propulsão de sangue para a circulação pulmonar (átrio e ventrículo direito, preenchidos por sangue não oxigenado e usualmente definidos como coração direito) ou circulação sistêmica (átrio e ventrículo esquerdo, preenchidos por sangue oxigenado e usualmente definidos como coração esquerdo) (Romer & Parsons, 1985; Randall et al, 2000).

O processo de batimento do coração pode ser entendido como um ciclo cardíaco, representado pelo período de contração atrial até o relaxamento ventricular; e a frequência do ciclo cardíaco é denominada frequência cardíaca (Guyton & Hall, 2006). Esse ciclo é possibilitado pela presença de 4 válvulas cardíacas, denominadas semilunares (valva pulmonar e aórtica) e válvulas atrioventriculares (tricúspide e mitral). As valvas cardíacas são de extrema importância para a manutenção de sua função, pois permitem a passagem unidirecional do sangue, evitando refluxo para os átrios durante a contração ventricular ou dos vasos para os ventrículos durante o período diastólico (Guyton & Hall, 2006; Katz, 2006). Como observado na figura 1, o ciclo cardíaco começa com a diástole dos átrios e ventrículos, concomitante à abertura das valvas atrioventriculares e fechamento das valvas semilunares (A para B). O sangue venoso proveniente da circulação sistêmica preenche o átrio direito, assim como o sangue arterial proveniente da circulação pulmonar preenche o átrio esquerdo. A contração atrial a seguir (C) provoca aumento na pressão nessa câmara, forçando a ejeção de uma fração adicional do volume sanguíneo para as cavidades ventriculares (uma vez que a maior fração do sangue passa passivamente aos ventrículos em função da abertura das valvas atrioventriculares) (Guyton & Hall, 2006; Katz, 2006; Berne et al, 2009).

A contração atrial é sucedida por um período de contração isovolumétrica (D), caracterizada pelo início do processo de contração ventricular, quando as valvas atrioventriculares e semilunares encontram-se fechadas, impedindo o refluxo de sangue para os átrios. A contração ventricular prossegue concomitante à abertura das valvas semilunares, forçando a ejeção de sangue dos ventrículos direito e esquerdo para as

artérias pulmonar e aorta respectivamente, localizadas na base do coração. A ejeção do sangue para a circulação é caracterizada por uma fase rápida inicial (E) e uma fase lenta final (F). Após esse processo tem-se o relaxamento isovolumétrico, caracterizado pelo início da diástole ventricular, porém com fechamento das valvas atrioventriculares e semilunares (F para A). Finalmente, com a progressão da diástole, ocorre a abertura das valvas atrioventriculares e preenchimento das câmaras ventriculares (Guyton & Hall, 2006; Berne et al, 2009).

A divisão funcional de cada uma dessas câmaras cardíacas reflete especialização de suas estruturas. O sangue bombeado pelo ventrículo esquerdo é oxigenado e nutri todos os sistemas, incluindo, através do sistema das coronárias, o próprio coração. O ventrículo direito atua bombeando sangue não oxigenado para circulação pulmonar, porém desenvolve baixas pressões quando comparado ao ventrículo esquerdo. A parede do ventrículo esquerdo possui duas vezes a espessura da parede do ventrículo direito. Essa alteração estrutural pode ser entendida como uma adaptação do ventrículo esquerdo para ejetar sangue com alta pressão contra vasos de alta resistência. Na base do coração estão localizados os átrios. Essas duas cavidades também desenvolvem baixas pressões, funcionando como bombas de volume que medeiam o transporte do sangue que chega ao coração para os ventrículos, de onde serão novamente ejetados. Além disso, tanto o átrio direito quanto o esquerdo possuem um papel muito importante na regulação de vários processos relacionados ao sistema cardiovascular, incluindo a manutenção e modulação da frequência cardíaca intrínseca e da pressão arterial (Katz, 2006).

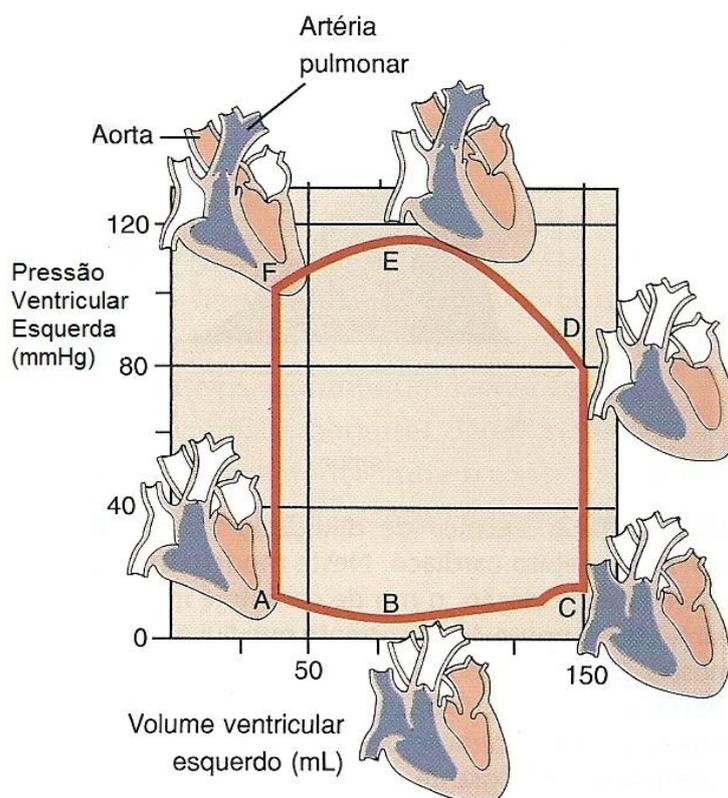


Figura 1: Representação esquemática do ciclo cardíaco, mostrando as alterações de pressão e volume do ventrículo esquerdo durante um único ciclo. Adaptado de Berne et al (2009).

1.1.2- Geração e propagação do impulso elétrico no coração

O nó sino-atrial (NSA) é a região de origem dos estímulos para a contração cardíaca. Essa região apresenta células marca-passo denominadas células nodais, capazes de desencadear potenciais de ação de forma auto-estimulatória e rítmica, e a frequência de excitação dessa região determina a frequência intrínseca do coração (Malmivuo & Plonsey, 1995). A cada estímulo elétrico gerado pelo NSA, ocorre uma onda de contração no coração. Entretanto, para que ocorra a contração sincronizada de toda a musculatura cardíaca, a condução deste estímulo precisa ocorrer de maneira ordenada e específica. Nesse processo, que dura em média 0,19 segundos, o estímulo gerado no NSA, por meio do feixe de Bachman, é propagado até o átrio esquerdo, gerando a contração atrial. Simultaneamente, o estímulo despolarizante é propagado até o nó átrio ventricular (NAV) por vias internodais. O NAV também possui células nodais com capacidade auto-estimulatória, porém com frequência reduzida quando comparada à frequência intrínseca proveniente do NSA. Por esse motivo, em condições normais, o NAV só é excitado por impulsos que se propagam através dele, advindos do

NSA (Malmivuo & Plonsey, 1995). Ao passar pelo NAV o impulso elétrico sofre um atraso de condução, para então ser conduzido através do feixe de His, que se divide em duas ramificações, esquerda e direita. Essas duas ramificações, por sua vez, também se ramificam formando as fibras de Purkinje, que se divergem penetrando as paredes do miocárdio, transversalmente do endocárdio ao epicárdio (figura 2). É importante ressaltar que o atraso da condução do estímulo na região do NAV possui importante implicação fisiológica, pois impede que as contrações atrial e ventricular ocorram simultaneamente, e sim de forma sincronizada (Katz, 2006; Fabiato & Fabiato, 1979; Malmivuo & Plonsey, 1995). Nos tecidos adjacentes ao sistema de condução, a propagação do estímulo elétrico é feita célula a célula, a uma velocidade relativamente acelerada (60-80 cm/s), uma vez que as fibras cardíacas se comunicam intimamente por meio dos discos intercalares, e dessa forma, ao menos eletricamente, o tecido cardíaco funciona com um sincício (Conde-Garcia, 1998).

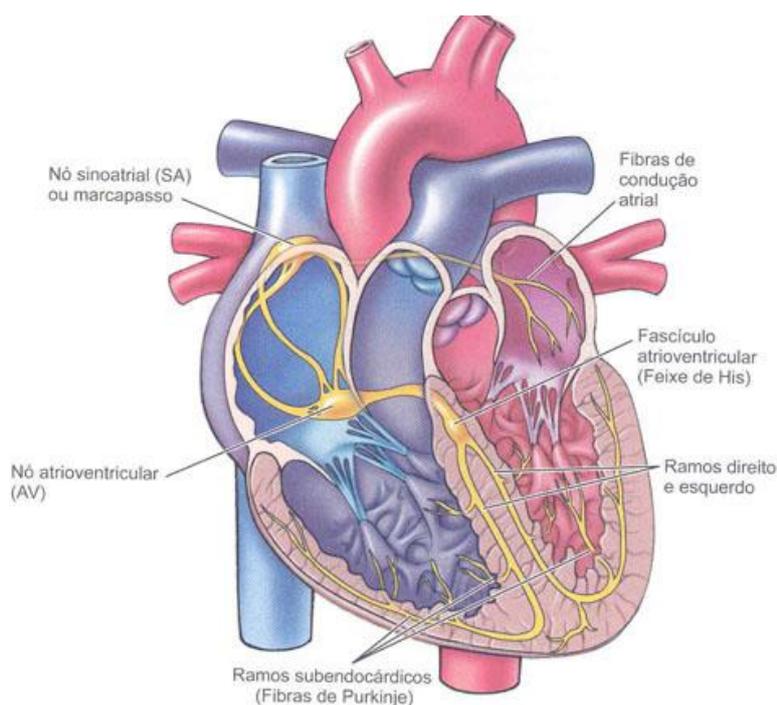


Figura 2: Esquema de um coração mostrando a via de propagação do estímulo elétrico gerado no NSA. Extraído de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Aur%C3%ADcula>.

Por meio de eletrodos colocados sobre a epiderme, é possível registrar as diferenças de potencial elétrico gerado no coração. Dessa forma, o ciclo cardíaco também pode ser analisado a partir de um aspecto elétrico, e esse componente precede e

determina a manutenção da função contrátil. A atividade elétrica do coração pode ser registrada utilizando o eletrocardiograma (ECG), sendo que o traçado eletrocardiográfico é tipicamente composto pelas ondas P, o complexo QRS e a onda T. A onda P representa a soma das despolarizações atriais. O complexo QRS é formado por três ondas distintas: Q, R e S, e a forma média dessas ondas deve-se aos potenciais gerados quando os ventrículos se despolarizam, enquanto que a onda T representa a repolarização ventricular (figura 3). Os intervalos que podem ser observados entre as ondas, também apresentam significado fisiológico e alterações para valores discrepantes, podem ocasionar distúrbios elétricos severos. Como exemplo, o intervalo PR quando prolongado está associado a problemas de condução através do NAV (Sanches & Moffa, 2001; Selkurt, 1985).

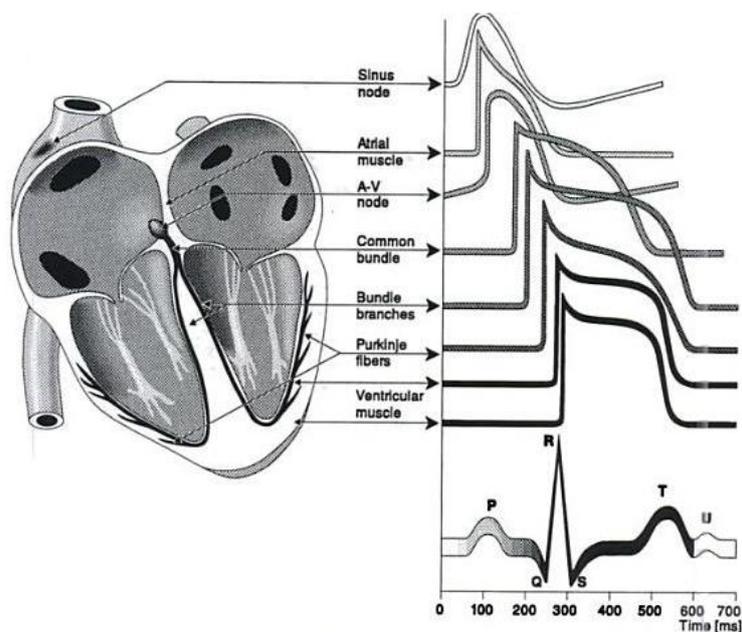


Figura 3: Representação da geração do perfil eletrocardiográfico a partir da contribuição dos sinais elétricos advindos da excitabilidade dos cardiomiócitos em diferentes regiões do coração. Adaptado de (Malmivuo & Plonsey, 1995)

1.1.3- Contratilidade, excitabilidade e acoplamento excitação contração

Como descrito anteriormente, o processo mecânico de contração cardíaca está intimamente associado à atividade elétrica do coração registrada pelo ECG, uma vez que o estímulo para a contração das células é baseado em uma variação do potencial transmembrana dos cardiomiócitos, o qual é propagado por todo o tecido por meio dos sistemas de condução e/ou célula a célula. Essa variação transitória do potencial de

membrana dos cardiomiócitos é denominada potencial de ação (PA). No caso das células nodais, a periodicidade dos batimentos cardíacos é atribuída a um mecanismo autônomo de excitabilidade. Dessa forma, elas são capazes de gerar um PA e, conseqüentemente um evento de despolarização celular de maneira cíclica e periódica, sem depender de nenhum estímulo externo.

O processo responsável pela variação do potencial de membrana é a migração de partículas carregadas entre as suas faces. Essa migração é impulsionada principalmente, pela soma vetorial de duas forças que atuam simultaneamente: uma força elétrica resultante da capacidade de uma partícula carregada perceber o campo elétrico gerado pela separação de cargas na membrana; e o gradiente de concentração químico, que pode ser interpretado de acordo com a Segunda Lei da Termodinâmica, como a força necessária para impedir a reorganização em um sistema termodinâmico para atingir o estado de maior entropia, quando as concentrações se tornariam iguais em ambos os compartimentos separados pela membrana. Dessa forma, os íons experimentam a acumulação de energia potencial química e elétrica através da membrana, determinada pela formação de um gradiente eletroquímico para cada íon. Entretanto, partículas carregadas possuem grande resistência à passagem pela bicamada lipídica que compõe a membrana plasmática, e por esse motivo, é necessária a incorporação de componentes de condução, por exemplo, os canais iônicos e as proteínas transportadoras. (DeFeliche, 1997; Hille, 2002).

Os canais iônicos normalmente são seletivos para um determinado cátion ou ânion, e podem ser classificados de acordo com essa seletividade. Eles podem ainda ser divididos de acordo com o tipo de estímulo que induz à sua ativação. Dessa forma, existem os canais sensíveis à voltagem, ativados por ligantes, ativados por estiramento ou canais que não possuem alça de ativação e estão sempre abertos, como as aquaporinas, responsáveis pelo transporte de água entre os compartimentos intra e extra celulares (Hille, 2002; Lehninger et al, 2002). Esses canais ainda podem ser nomeados considerando suas propriedades farmacológicas como sensibilidade ou resistência a fármacos (Hille, 2002).

Ao considerarmos o PA cardíaco, os canais iônicos sensíveis à voltagem assumem um papel primordial, e as diferentes fases do PA podem ser determinadas a partir da mudança dos estados (condutor e não condutor) desses canais. Nesse aspecto, é importante ressaltar que a expressão de diferentes tipos de canais, bem como a densidade de cada um desses tipos, altera drasticamente a forma do PA, como

observado na figura 3, que apresenta potenciais de ação típicos em diferentes regiões do coração.

A figura 4 mostra as diferentes fases do PA de um cardiomiócito ventricular, bem como os principais canais iônicos envolvidos nesse processo. De acordo com Nerbonne e Kass 2005, o PA pode ser dividido em 4 fases. A fase 0 representa a despolarização celular, que ocorre em função da abertura e ativação dos canais para sódio sensíveis a voltagem. Esse processo é acompanhado pelo rápido influxo desses íons para o meio intracelular, o que provoca a despolarização do potencial de membrana. Na fase 1, a despolarização da célula cardíaca estimula a ativação dos canais para cálcio e potássio. Nessa fase observa-se o início da repolarização da célula cardíaca, em função da ativação das correntes de potássio transientes rápidas (I_{t_o}). Já na fase 2, a ativação da corrente de cálcio tipo L (I_{Ca-L}), e consequente influxo de cálcio, provoca um atraso no processo de repolarização celular, caracterizando a fase de platô.

Ainda nessa fase ocorre ativação de outros tipos de canais para potássio, que auxiliam o processo de repolarização do PA. A ativação desses canais permite o prosseguimento adequado do processo de repolarização celular, concomitante à inativação dos canais de cálcio, o que caracteriza a fase final da repolarização da célula cardíaca (fase 3). Nesse ponto, a corrente de potássio retificadora de entrada (I_{k1}) possui papel importante, pois é ativada pela hiperpolarização da membrana, e mantém o potencial de repouso da célula numa faixa restrita, em geral entre -80 e -90 mV. A restituição do potencial de repouso do cardiomiócito caracteriza a fase 4, que também tem predominantemente a participação dessa corrente (Nerbonne & Kass, 2005; Berne, 2009). A perpetuação da capacidade excitatória dos cardiomiócitos é garantida pela ação da Na^+/K^+ ATPase, uma proteína transportadora que acopla energia gerada pela quebra de uma molécula de ATP ao transporte de íons Na^+ e K^+ para fora e dentro da célula, respectivamente, contra seu gradiente de concentração, e dessa forma, garantindo a manutenção do gradiente eletroquímico.

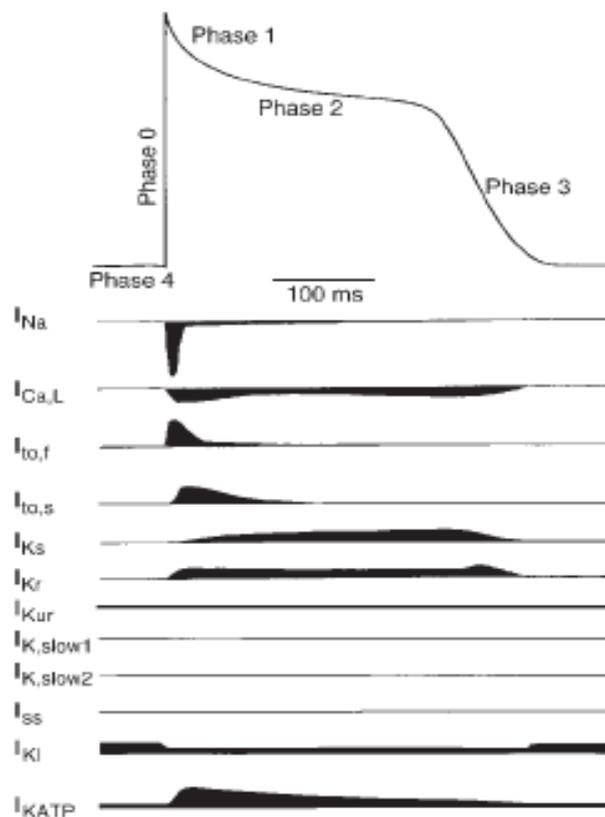


Figura 4: Participação dos diferentes tipos de correntes iônicas na gênese do potencial de ação cardíaco ventricular de humanos. Extraído de Nerbonne & Kass, 2005.

Em situações normais, a geração de um PA determina um evento de contração celular. Com a descoberta do cálcio como mediador da contração muscular pela interação com proteínas envolvidas na maquinaria contrátil, Hill, em 1949, julgou impossível atribuir à difusão o mecanismo responsável pelo fornecimento de cálcio necessário aos ciclos de batimentos cardíacos, por ser um processo muito lento. Mais tarde Carl Wiggers identificou pela primeira vez, a correlação entre a excitabilidade elétrica e a contração muscular, estruturando as bases do que hoje conhecemos como acoplamento excitação-contração (ECC, do inglês, *excitation contraction coupling*) (Fabiato & Fabiato, 1972; Fabiato & Fabiato, 1979; Bers, 2001; Landis, 1976, Bers & Guo, 2005). Esse fenômeno é caracterizado pela abertura de canais para cálcio durante o PA que estão concentrados nas projeções de membrana que formam o sistema de túbulos-T (Brette et al, 2006). Esses por sua vez, estão próximos a um segundo sistema de membranas intracelular, que forma o retículo sarcoplasmático (SR, do inglês, *sarcoplasmic reticulum*). Na membrana do SR são encontrados canais iônicos seletivos para cálcio e ativados por cálcio, denominados receptores de rianodina (RyR,

do inglês *ryanodin receptor*). O Ca^{+2} proveniente dos canais na membrana plasmática ativam os receptores de RyR presentes na membrana do SR, processo conhecido como CICR (do inglês, *calcium induced calcium release*) o que desencadeia a liberação dos estoques de cálcio que são armazenados nessa organela, elevando de maneira muito rápida a concentração intracelular desse íon, viabilizando seu envolvimento na contratilidade celular. Esse mecanismo explica como estímulos elétricos estão associados aos mecanismos contráteis inerentes às células cardíacas, garantindo um rápido acesso do cálcio a essa maquinaria. A figura 5 apresenta uma representação esquemática desse processo.

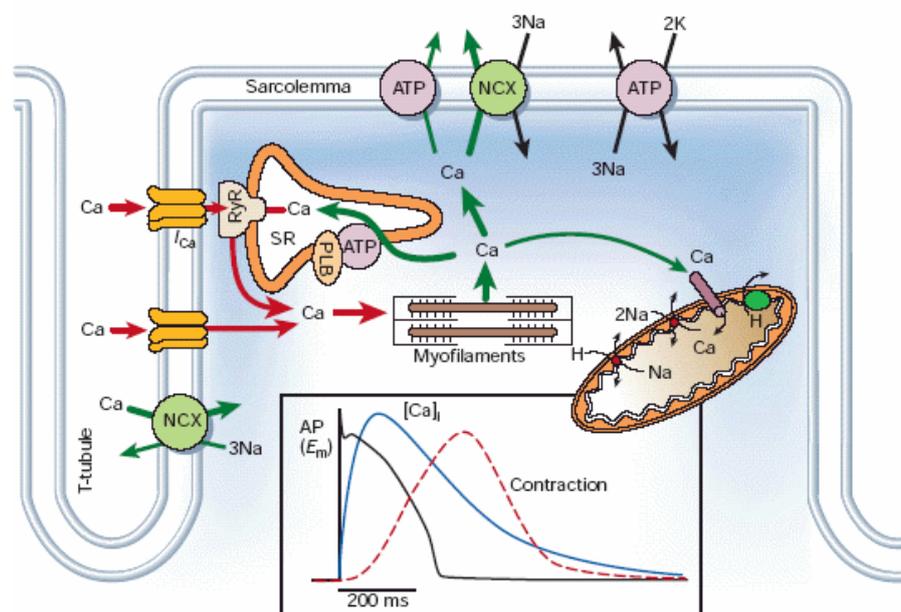


Figura 5: Esquema demonstrando a participação dos principais componentes envolvidos no ECC, bem como a participação e dinâmica do cálcio nesse processo. Na figura, o componente “ATP” transportando cálcio para fora da célula representa a bomba de cálcio do sarcolema. Extraído de Bers, 2002.

O cálcio advindo dos estoques presentes no RS é o principal responsável por estimular o processo contrátil nas células musculares cardíacas. Esse processo é determinado pelo ciclo de pontes cruzadas, que acontece nas unidades funcionais de contração muscular, denominadas sarcômeros. O ciclo de pontes cruzadas pode ser didaticamente separado em etapas (figura 6): A miosina ligada ao ATP assume uma posição estendida, perpendicular ao filamento de actina. A interação entre actina e

miosina aumenta significativamente a capacidade ATPásica da miosina. Entretanto, para que isso ocorra o sítio de interação da actina com a miosina deve estar desbloqueado. Esse desbloqueio tem uma participação fundamental do cálcio proveniente do SR. Os íons cálcio interagem com a troponina C (TnC), aumentando significativamente a sua força de interação com a troponina I (TnI), concomitante à redução na afinidade da ligação de TnI com a actina. Essa conformação favorece um posicionamento mais axial do complexo tropomiosina-troponina, removendo o impedimento estérico de interação entre actina e miosina (Bers, 2001). A liberação do fosfato inorgânico associado ao complexo actina-miosina aumenta significativamente a força de interação entre essas moléculas, e esse complexo passa por pelo menos dois estágios energéticos através dos quais o ADP permanece associado ao complexo, caracterizado pela rotação da cabeça de miosina, o que provoca o deslizamento dos filamentos finos em direção ao centro do sarcômero. Fisicamente, esse processo envolve a transformação da energia química armazenada na ligação do ATP em energia mecânica e trabalho.

Finalmente, o ADP se desliga do complexo, o que aumenta ainda mais a interação entre actina e miosina, mas rapidamente a ligação de um próximo ATP (de forma mais pronunciada quando da fosforilação de TnI) enfraquece a interação entre actina e miosina, desfazendo a interação física entre essas moléculas, e forçando a miosina a alcançar sua posição ativada novamente para um próximo ciclo de ligações cruzadas ou propiciando condições para que se instale o processo de relaxamento. Caso os sítios de interação da actina com a miosina permaneçam expostos (em função da elevada concentração de cálcio no citoplasma), o ciclo de pontes cruzadas se sustenta, forçando o deslizamento progressivo dos filamentos finos em direção ao centro do sarcômero e com isso, provocando o seu encurtamento (Berne et al, 2000; Bers, 2001).

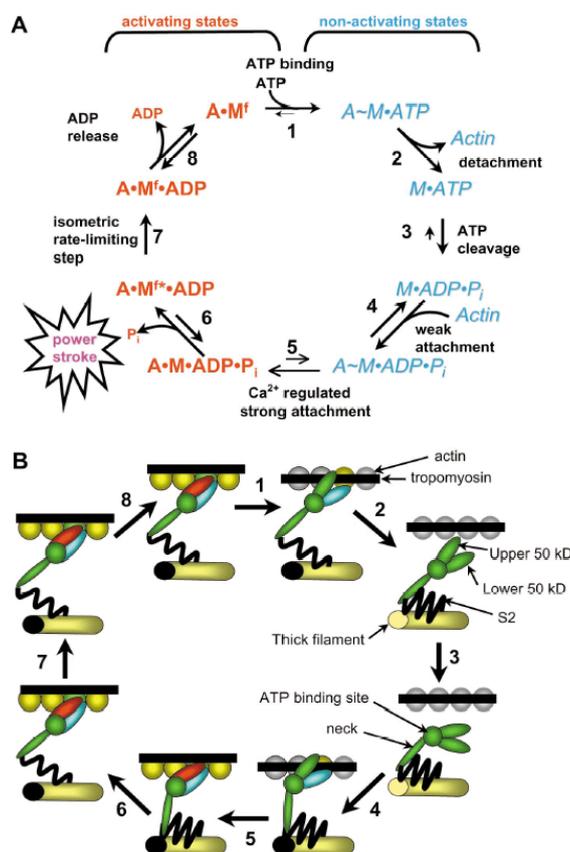


Figura 6: Representação das etapas envolvidas no ciclo de pontes cruzadas durante o processo de contração celular. Em (A) a participação do ATP e em (B) a caracterização espacial dos miofilamentos nesse processo. Adaptado de Gordon et al, (2001).

Para que o ciclo de pontes cruzadas seja interrompido, é necessária a remoção do cálcio citoplasmático. Pelo menos quatro sistemas diferentes estão envolvidos na diminuição da concentração de cálcio citoplasmático, a saber: 1) bomba de Ca^{2+} ATPase do SR (SERCA, do inglês *Sarco-Endoplasmic reticulum calcium*) que faz a recaptação de cálcio para o próprio RS, 2) trocador sódio-cálcio presente no sarcolema (NCX, do inglês *sodium calcium exchanger*), 3) bomba de Ca^{2+} ATPase do sarcolema e 4) uniporte de cálcio mitocondrial, como representado na figura 5 (Bers, 2008; Bers 2002).

1.1.4- Disfunções da atividade elétrica do coração

Como exemplificado anteriormente, a função elétrica do coração é de extrema importância para o funcionamento apropriado de sua atividade contrátil. Alterações estruturais e/ou funcionais do tecido cardíaco podem implicar em alterações na

condução e propagação do impulso elétrico no coração, muitas vezes causando condições clínicas severas. As arritmias são caracterizadas como mudanças no ritmo, regularidade, origem e condução do impulso cardíaco (Thaler, 2010). Elas podem ser causadas por: 1) um aumento na excitabilidade da membrana celular, levando o surgimento de taquicardias induzidas por ganho de automaticidade ou ativação de gatilhos celulares para batimentos prematuros, a maioria associada a despolarizações pós-potenciais precoce e tardio; 2) um defeito na formação do impulso elétrico no NSA, o que geralmente causa a bradicardia sinoatrial, pausa sinoatrial ou a síndrome bradi-taquicárdica e 3) uma redução na condução normal célula-célula levando, com isso, a um bloqueio do sistema de condução ou a uma redução na propagação do sinal elétrico em determinadas regiões do miocárdio (Rokita & Anderson, 2012). As arritmias podem ser classificadas a partir do local de origem (atrial, ventricular ou juncional), pela mudança no ritmo de contração (taquicardia e bradicardia), pelo mecanismo de geração (fenômenos de reentradas, alterações de automaticidade e gatilhos celulares para a contração) ou pela duração (batimentos isolados prematuros, sustentada ou não sustentada).

1.2- A Doença de Chagas

1.2.1- Aspectos etiológicos e epidemiológicos da Doença de Chagas

A Doença de Chagas é assim conhecida após sua identificação, em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas (Chagas C, 1909). É uma zoonose que acomete aproximadamente 6-10 milhões de pessoas no mundo dependendo do estudo epidemiológico (OMS factsheets, 2014; Strasen et al, 2014), sendo uma das causas mais importantes, se não a principal responsável pelos casos de insuficiência cardíaca na América Latina (Bocchi et al, 2013; Strasen et al, 2014). Dessa forma, essa enfermidade constitui um importante problema de saúde pública em países endêmicos da doença, além de representar uma das patologias mais onerosas dentre as chamadas doenças tropicais negligenciadas (Nunes et al, 2013).

O agente etiológico da Doença de Chagas é o *Trypanossoma cruzi* (reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastidea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*). A forma principal de transmissão da doença é através de vetores dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodinus* (classe Insecta, ordem Hemiptera, família Reduviidae) apesar de terem sido observados transmissão por 12 outros gêneros (Coura & Viñas, 2010). De maneira simplificada, o vetor hematófago

infectado elimina fezes próximas ao local da ferida provocada durante o forrageio no hospedeiro vertebrado. Os parasitas presentes nessas fezes, após sofrerem diferenciação para as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica no trato intestinal do vetor, podem ser passivamente conduzidos ao local da ferida. No hospedeiro vertebrado, os parasitas se diferenciam na forma tripomastigota, capaz de parasitar diferentes células, inclusive cardiomiócitos. No interior das células, eles se diferenciam em amastigotas, iniciando o processo de replicação. Esse processo de multiplicação termina com a diferenciação das formas amastigotas novamente em tripomastigotas, as quais alcançam novamente a corrente sanguínea e/ou interstício através da lise da célula infectada. Esse processo então pode se repetir, aumentando significativamente a carga parasitária no hospedeiro, o que favorece a infecção de outros vetores durante o forrageio, possibilitando a perpetuação do ciclo da doença (Andrade & Andrews, 2005).

Apesar do ciclo descrito acima ser a principal forma de transmissão da doença, outros mecanismos também podem estar envolvidos, principalmente em países não endêmicos dos vetores dessa enfermidade. Dentre essas formas secundárias de transmissão, destaca-se a transfusão de sangue infectado, transplante de órgãos, e acidentes de laboratório (Coura & Viñas, 2010).

1.2.2- Aspectos clínicos da Doença de Chagas

A Doença de Chagas é classicamente dividida em duas fases, aguda e crônica, a qual pode ser classificada como cardíaca, indeterminada ou do trato digestivo. Na fase aguda em geral, não se observam sintomas graves. Ela é caracterizada pelo grande e rápido aumento na parasitemia e nos ninhos de parasitas no tecido cardíaco. Esse fenômeno é acompanhado por um infiltrado inflamatório mononuclear, congestão aguda e edema (Dos Santos et al, 2001). A inflamação do tecido cardíaco determina o principal sinal clínico observado na fase aguda da Doença de Chagas, uma intensa miocardite difusa, que pode originar dano ao miócito cardíaco, bem como ao sistema de vasos e inervação do coração. A relação entre número de parasitas e intensidade da miocardite não é linear; ao contrário, parece estar muito relacionada à diferença na virulência entre cepas e na resposta imune do hospedeiro (Souza et al, 1996).

A nível celular é possível observar um remodelamento eletro-mecânico dos cardiomiócitos, caracterizado pelo prolongamento do PA dos miócitos ventriculares, associado à redução na densidade das correntes de potássio e de cálcio (Roman-Campos et al, 2013). A redução das correntes de Ca^{2+} também está relacionada a uma

assincronia da liberação desse íon do SR, bem como redução do transiente e da capacidade contrátil dos cardiomiócitos isolados de diferentes regiões do coração (Roman-Campos et al, 2009; Roman-campos et al, 2013). Além disso, na fase aguda é observada uma deservação do sistema autonômico do coração, principalmente relacionada a uma destruição dos neurônios parassimpáticos e simpáticos (Machado & Ribeiro, 1989). Outros sinais clínicos característicos da fase aguda, destacam-se a taquicardia e arritmias diversas como alternância de onda P (dissociação átrio-ventricular), distúrbios de repolarização (Brener et al, 2000), além de marcadores para hipertrofia cardíaca terem sido identificados (Roman-Campos et al, 2013).

Após a resolução da fase aguda, alguns pacientes entram em uma fase definida como indeterminada, na qual sintomas e sinais clínicos não são identificados, apesar de confirmada a infecção por métodos sorológicos ou parasitológicos (Ribeiro & Rocha, 1998), mas aproximadamente um terço desses pacientes evolui para a fase crônica da doença duas décadas após a infecção inicial (Nunes et al, 2013).

Na fase crônica a detecção do parasito no hospedeiro é rara. Entretanto, há uma inflamação crônica no tecido cardíaco, mesmo considerando a baixa carga parasitária no tecido. Além disso, observa-se a presença de áreas de fibrose no miocárdio e no sistema condutor (Roman-Campos et al, 2013; Postan et al, 1986; Andrade et al, 1978). Nessa fase, os cardiomiócitos também experimentam alterações em sua função elétrica e contrátil. Roman-Campos e colaboradores, (Roman-Campos et al, 2013b) demonstraram prolongamento do PA dos miócitos ventriculares associado à redução da densidade das correntes de cálcio e potássio nessas células. Outros trabalhos do mesmo grupo apresentam evidências de uma redução na capacidade contrátil do cardiomiócito (Roman-Campos et al, 2009) e aumento na expressão de marcadores de hipertrofia (Roman-Campos et al, 2013). Não obstante, usando um sistema de infecção *in vitro* em células isoladas, de Carvalho e colaboradores 1992, demonstraram uma redução na expressão de Conexina-43, provocando mau funcionamento das junções *gap* entre pares de cardiomiócitos, e com isso, gerando os problemas de condução. A soma desses fatores estruturais e funcionais do tecido e células do coração é responsável pela observação de diversos sinais clínicos na fase crônica: de forma mais precoce, bloqueios do sistema de condução (Ribeiro et al, 2013; Maguire et al, 1987) e disfunções diastólicas. A progressão da doença determina uma cardiopatia dilatada, que pode desencadear disfunção ventricular e insuficiência cardíaca além de diversos tipos de alterações no ECG, arritmias severas e morte súbita.

Por fim, a progressão da patologia está altamente associada à cepa de parasitas infectantes. Cada cepa possui tropismos preferenciais para determinados órgãos, e dentro desse tropismo, uma virulência e taxa de multiplicação. Esse fator pode ser crucial na determinação do aparecimento das diferentes formas da doença (Coura & Viñas, 2010) além de desencadear, juntamente com o tipo de resposta imune montada pelo hospedeiro, uma progressão mais branda ou severa.

1.3- Espécies Reativas de Oxigênio e Oxido nítrico

1.3.1- ROS: Vias de produção e modulação eletromecânica nos cardiomiócitos

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) são moléculas derivadas de oxigênio, com alta capacidade de oxidar outros compostos. Elas incluem radicais livres, como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH), radical peroxil (RO_2) e alcóxil, mas também outros agentes oxidantes não radicais, como ozônio (O_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Bedard & Krause, 2007). A produção de ROS tem um papel importante na modulação de diversas funções fisiológicas, como indução mitogênica, de senescência celular, apoptose, proteção contra infecções, além de participar de diversas vias de sinalização celular (Valko et al, 2007; Aggarwal & Makielski, 2011; Erickson et al, 2011). Particularmente nos cardiomiócitos, elas foram associadas ao controle do manejo intracelular de cálcio em um mecanismo de produção de ROS associado ao estiramento celular (Prosser et al, 2011; Prosser et al, 2013). Apesar disso, a produção descompensada de ROS pode levar à oxidação e perda de função de componentes celulares, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, o que pode ocasionar efeitos deletérios, muitas vezes opostos aos benéficos quando em situações de produção fisiológica dessas moléculas (Bedard & Krause, 2007; Valko et al, 2007). Especificamente no coração, o estresse oxidativo já foi associado a disfunções cardíacas que incluem hipertrofia, insuficiência cardíaca congestiva, cardiopatias e arritmias (Aggarwal & Makielski, 2011)

Diversos mecanismos contribuem para a geração de ROS no tecido cardíaco. Essa produção pode ser advinda de subprodutos de outras reações biológicas, incluindo reações da cadeia respiratória mitocondrial, produção nos peroxissomos, pelo citocromo P-450 e produção de ROS pela proteína xantina oxidase, um componente da via de catabolismo das purinas. Apesar disso, outros mecanismos são capazes de gerar ROS diretamente como produto principal de suas reações. Nesse contexto, a família das

NADPHoxidases (Nox) tem um papel primordial, provendo a produção de ânions superóxido e consequentemente outros radicais derivados dessa molécula (como peróxido de hidrogênio pela desmutação espontânea ou ação da superóxido desmutase e peroxinitrito, pela reação com óxido nítrico (NO)). Nos cardiomiócitos, as duas principais isoformas dessas enzimas são a Nox2 (no coração adulto encontra-se localizada principalmente associada ao sarcolema, controlando as cascatas sensíveis ao status redox, a partir do controle da atividade de kinases e fosfatases, da expressão gênica e controle da inativação do NO dependendo de O_2^-) e Nox4 (muito importante durante o desenvolvimento embrionário participando da diferenciação cardíaca, e no coração adulto, é constitutivamente expressa na mitocôndria). Além disso, outras fontes contribuem para a geração de ROS no coração, principalmente células endoteliais e inflamatórias (Bedard & Krause, 2007; Erickson et al, 2011). A figura 7 (Aggarwal & Makielski, 2011) apresenta algumas das principais fontes de ROS no coração.

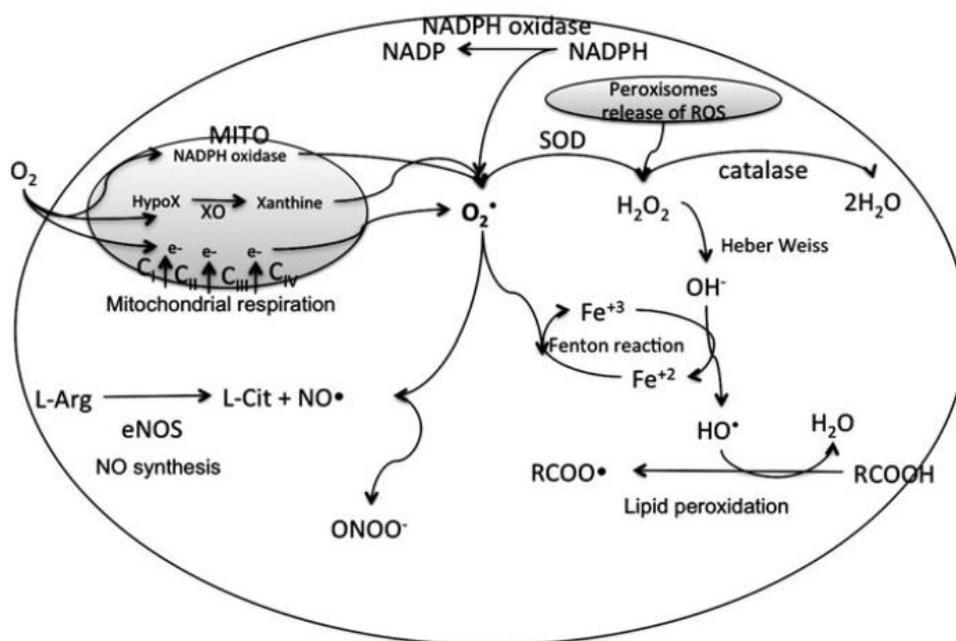


Figura 7: Principais vias de produção de ROS nos cardiomiócitos. Extraído de Aggarwal & Mikielski, 2013.

Essa produção de ROS é balanceada pela ação de agentes antioxidantes celulares, que atuam basicamente por dois mecanismos: a transformação das espécies reativas em produtos mais inócuos para a célula ou a reversão da oxidação de moléculas danificadas. Dentre esses componentes antioxidantes, destaca-se a os componentes

enzimáticos, representados principalmente pela glutathione peroxidase que age regenerando as moléculas danificadas pela oxidação em detrimento de sua própria oxidação, e pela família das superóxido desmutase, que convertem os ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, o qual pode ser convertido em moléculas de água pela catalase. Os antioxidantes não enzimáticos são representados principalmente por vitaminas (ácido ascórbico, alfa-tocoferol), carotenoides, flavonoides e outros (Valko et al, 2007; Aggarwal & Makielski, 2011).

A produção de ROS regula diversos aspectos da excitabilidade e contratilidade dos cardiomiócitos, muitos desses efeitos controversos e ainda não bem estabelecidos. Existem evidências da ação de despolarização do potencial de membrana dos cardiomiócitos, seja pela inibição de correntes de potássio, ou pelo aumento da janela da corrente de sódio (em resposta à própria despolarização da membrana, que promove uma sobreposição das curvas estacionárias de ativação e inativação dos canais de sódio, prolongando a ativação da corrente). Além disso, já foi demonstrado aumento na densidade da corrente de cálcio e da atividade dos RyRs, em associação com a redução da atividade da SERCA para a recaptação do cálcio e o aumento da atividade do trocador sódio-cálcio. Esses fatores em conjunto, aumentam a probabilidade de ocorrência de eventos de despolarização pós-potenciais, aumentando as chances de arritmias. Além disso, as alterações no manejo de cálcio podem provocar disfunções na contratilidade dos cardiomiócitos. Por outro lado, redução da duração do PA em função da ativação de canais para potássio sensíveis a ATP também foi observado de maneira dependente de ROS, além da redução das correntes de cálcio e da atividade dos RyRs. Esses efeitos opostos aparentemente estão relacionados com o tipo de ROS e sua ação direta na oxidação de moléculas alvo, sua concentração e tempo de exposição, além de comunicação com outras vias de sinalização sensíveis ao status redox da célula, as quais podem modular a atividade e expressão de canais iônicos e proteínas envolvidas no manejo do cálcio e na maquinaria contrátil do cardiomiócito (Aggarwal & Makielski, 2011; Erickson et al, 2011).

1.3.2- NO: Vias de produção e modulação eletromecânica nos cardiomiócitos

Assim como ROS, o NO tem sido atribuído como um importante modulador do controle da função cardíaca. A sua produção se dá através da conversão de L-arginina + O₂ em citrulina + NO, desempenhada pelas óxido nítrico sintases (NOS). São

conhecidas 3 isoformas dessas enzimas, duas das quais, a eNOS (NOS3) e nNOS (NOS1) são constitutivamente expressas no coração e são ativadas pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Por outro lado, a iNOS (NOS2), a letra “i” refere-se à forma induzida, em geral tem sua expressão induzida por fatores inflamatórios e sua atividade é essencialmente independente de Ca^{2+} (Sears et al, 2004). No coração, o NO é classicamente relacionado ao controle do tônus vascular e fluxo sanguíneo coronariano (e.g. Furchgott & Zawadzki, 1980; Moncada et al, 1991), entretanto, seus efeitos na excitabilidade e contratilidade dos cardiomiócitos e conseqüentemente na manutenção dos parâmetros eletromecânicos do coração são muito representativos, e vem ganhando atenção nos últimos anos.

A figura 8 apresenta uma representação esquemática de alguns dos principais alvos do NO regulando a excitabilidade, contratilidade e o manejo intracelular de cálcio no cardiomiócito. Já foi demonstrado uma redução da densidade da $\text{I}_{\text{Ca-L}}$ induzido por NO produzido pela eNOS, pela fosforilação dependente de cGMP via proteína quinase G (PKG) dos canais de cálcio $\text{Ca}_v1.2$. Além disso, a PKG também é capaz de fosforilar TnI, e com isso reduzir a sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (Massion et al, 2003). O NO também tem um papel relevante em desencadear um aumento progressivo da probabilidade de abertura dos RyR (Lim et al, 2008). Esse conjunto de fatores determina efeitos funcionais diversos, muitas vezes paradoxais, dependendo da isoforma de NOS considerada e da concentração de NO disponível. Massion e colaboradores em 2003 apresentaram evidências de um efeito inotrópico positivo em baixas concentrações de NO e negativo em altas concentrações. Além disso, o a dessensibilização dos miofilamentos pode provocar o efeito lusitrópico positivo induzido por NO, e simultaneamente, contribuir para a reserva diastólica e participar do mecanismo de Frank-starling, em resposta ao aumento da pré-carga resultante da maior distensão das fibras no período diastólico.

De maneira geral, os efeitos produzidos por NO dependem da isoforma de NOS ativada, o que reflete também uma dependência de concentração, uma vez que cada isoforma possui localização preferencial. Por exemplo, a nNOS encontra-se preferencialmente localizada na membrana do SR, enquanto a eNOS é encontrada principalmente associada à invaginações da membrana plasmática denominadas cavéolas. A localização subcelular do NO e sua concentração determinam os alvos e conseqüentemente a modulação da função celular, seja pela nitrosilação direta de

moléculas alvo ou pela modulação indireta secundária em função da modulação da atividade de outras vias bioquímicas (Lim et al, 2008; Hare, 2003).

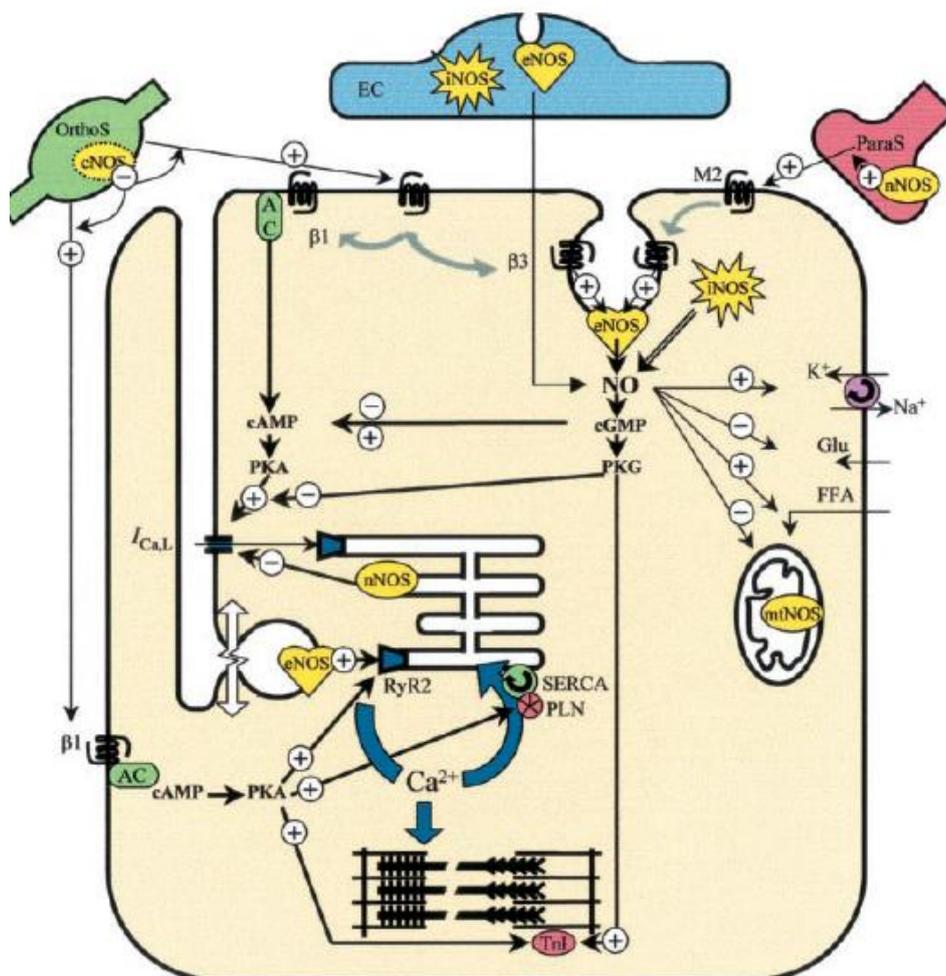


Figura 8: Fontes de produção autócrinas e parácrinas de NO e seu papel na regulação da excitabilidade e contratilidade dos cardiomiócitos. Extraído de Massion et al, 2003.

1.3.3- ROS, NO e sua relação com a Doença de Chagas

Durante o desenvolvimento da doença de Chagas ocorre a geração de um processo inflamatório intenso, em função da presença de parasitas na circulação, interstício e no interior das células. Isso pode ser verificado, por exemplo, pelo intenso infiltrado inflamatório presente tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. Esse processo inflamatório é acompanhado por um aumento na taxa de produção de ROS e NO, o que está relacionado com a capacidade das células do hospedeiro em resolver o processo infeccioso. Durante a infecção, o aumento na produção de ROS é observado em função do aumento da atividade de diversos sistemas que contribuem em

sua formação, incluindo a atividade das Nox e aumento no vazamento de ROS da cadeia respiratória. Isso ainda é agravado pela redução dos sistemas enzimáticos anti-oxidantes (Gupta et al, 2009), e modelos utilizando tratamento com anti-oxidantes ou modelos de privação dessas moléculas provocam respectivamente uma melhora e agravamento dos danos cardíacos durante a infecção por *T.cruzi* (Wen et al, 2006, Carvalho et al, 2006).

Em relação ao NO, quando o *T. cruzi* infecta os macrófagos do hospedeiro, ocorre a secreção por essas células de diversas moléculas sinalizadoras, incluindo a interleucina-12 e TNF- α . A interleucina-12 é capaz de induzir a produção de Interferon- γ (IFN- γ) pelas células NK (do inglês, *natural killer*) (Aliberti et al, 1996), a qual potencializa a resposta antimicrobica de macrófagos, contribuindo para a eliminação do parasita. O IFN- γ estimula, através da desfosforilação de NOS pela proteína quinase B (akt), o aumento na concentração de NO (Gazzinelli et al, 1992; Jung et al, 2015). O aumento na concentração de NO constitui um importante componente do controle à infecção, principalmente pela formação de peroxinitrito quando associado à O^{2-} o qual tem um efeito protetor bem consolidado no controle das tripanossomíases.

2- JUSTIFICATIVA

Desde sua identificação em 1909, a Doença de Chagas se tornou foco de diversos estudos no sentido de prevenir a infecção, no entendimento da biologia e controle dos vetores invertebrados e no desenvolvimento de estratégias para o tratamento dos sintomas dos pacientes. Essa atenção é justificada pela alta incidência e prevalência da doença em regiões que hospedam os vetores, como na América Latina, onde constitui uma das principais causas responsáveis pelos casos de insuficiência cardíaca (Bocchi et al, 2013; Strasen et al, 2014), sendo considerada uma das patologias mais onerosas dentre as chamadas doenças tropicais negligenciadas (Nunes et al, 2013). Durante o desenvolvimento da doença, em ambas as fases, aguda e crônica, é possível observar um intenso processo inflamatório, ao qual estão associadas a produção acentuada de ROS e NO (advindos de efeitos colaterais de reações biológicas alteradas pela infecção, ou como estratégia de combate ao parasita). Entretanto, ROS e NO são ambos moduladores importantes da atividade elétrica e contrátil do coração, bem como de muitos componentes intracelulares envolvidos no manejo intracelular de cálcio e no acoplamento excitação-contração nos cardiomiócitos. Não obstante, a quantidade, a qualidade e o tempo de exposição dessas moléculas podem ocasionar efeitos distintos na função cardíaca, muitas vezes paradoxais entre si, e diversos fatores como a cepa dos parasitas, o tipo e amplitude da resposta imunológica montada pelo hospedeiro bem como condições ambientais podem modificar a relação entre a produção e degradação dessas moléculas. Dessa forma, considerando todos os relatos envolvendo o papel de ROS e NO no remodelamento eletromecânico do coração e, considerando seu papel primordial no processo de controle da infecção, é de extrema importância a realização de estudos que busquem relacionar a manutenção da atividade elétrica-contrátil do coração durante o desenvolvimento da Doença de Chagas com a produção e o balanço de ROS e NO.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho é avaliar os efeitos da produção de ROS e NO no remodelamento elétrico e mecânico do coração durante o desenvolvimento da fase aguda da Doença de Chagas.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1- Investigar os efeitos da produção de ROS e NO no PA cardíaco durante a fase aguda da Doença de Chagas, utilizando a técnica de *Whole-cell patch-clamp* na modalidade *current clamp*;

3.2.2- Investigar os efeitos da produção de ROS e NO sobre as correntes de cálcio e potássio dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas, por meio da técnica de *Whole-cell patch-clamp* na modalidade *voltage-clamp*;

3.2.3- Avaliar os efeitos da produção de ROS e NO na contratilidade celular do miócito cardíaco durante a fase aguda da Doença de Chagas, por meio da técnica de contratilidade celular por detecção de bordas;

3.2.4- Investigar os efeitos da produção de ROS e NO nas propriedades do transiente citoplasmático de cálcio dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas, por meio da técnica de microscopia confocal;

3.2.5- Analisar os efeitos da produção de ROS e NO no perfil eletrocardiográfico dos camundongos durante a fase aguda da Doença de Chagas, por meio da técnica de ECG;

3.2.6- Analisar os efeitos da produção de ROS e NO nos parâmetros da função cardíaca dos camundongos durante a fase aguda da Doença de Chagas, por meio da técnica de coração isolado utilizando o sistema de Langendorff de fluxo constante.

4- MÉTODOS

4.1- Grupos experimentais

Durante a execução do projeto foram utilizados quatro grupos experimentais: Os dois primeiros grupos são constituídos por camundongos C57Bl6/N e camundongos gp91PHOX *knockout* (Phox KO) (Pollock et al, 1995), machos, com idade de 8 semanas. Matrizes dos camundongos Phox KO foram reproduzidas e mantidas pelo laboratório de Gnotobiologia, departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, respeitando-se o ciclo diário de 12 h de iluminação. Água e ração específica foram fornecidos *ad libitum*.

Cada um desses dois grupos foi dividido em 2 subgrupos, de animais não infectados ou infectados com 1000 u da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y, de forma intraperitoneal, quando os animais atingiram 6 semanas de idade. Todos os experimentos a seguir descritos foram realizados 15 dias pós-infecção (dpi) dos animais. Os procedimentos relacionados ao manejo dos animais foram aprovados e realizados em concordância com as normas estabelecidas pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA-UFMG), aprovados segundo o protocolo n° 214/2011.

4.2- Isolamento dos cardiomiócitos

Os experimentos apresentados neste projeto foram realizados a partir de cardiomiócitos oriundos do ventrículo esquerdo, isolados de acordo com o método descrito por Shioya (2007), com pequenas alterações. Nesse processo, os camundongos foram eutanaziados por decapitação 10 min após serem heparinizados (50u, i.p.) e tiveram o esterno retirado para a rápida remoção do coração. Os corações removidos foram então mantidos em solução de CIB (do inglês, *cell isolation buffer*, contendo, em mM: 130 NaCl; 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂; 0,33 NaH₂PO₄; 22 glicose; 25 HEPES) isenta de cálcio pela adição de EGTA (0,4 mM), onde fez-se a limpeza dos fragmentos de pulmão, tecidos vascular e adiposo, deixando intacto apenas o tronco aórtico, através do qual os corações foram canulados e montados em um sistema de Langendorff de pressão de perfusão constante (~73 mmHg), mantidos à temperatura de 37 °C. Os corações foram então perfundidos de maneira retrógrada com CIB+EGTA por 2-5 min para a que o sangue presente no sistema das coronárias e câmaras cardíacas fosse eliminado. Após isso, o coração foi perfundido por 4-5 min com a solução CIB (sem EGTA) acrescida dos seguintes componentes: 0,3 mM de CaCl₂; 0,8 mg/mL de

colagenase do tipo II; 0,06 mg/mL de proteinase tipo XXIII e 0,06 mg/mL de tripsina. Após essa etapa inicial de digestão enzimática, os corações foram seccionados, separando-se apenas o ventrículo esquerdo, que foi transferido para uma segunda solução de CIB (sem EGTA), com a mesma quantidade de enzimas citadas acima, porém contendo 0,7 mM de CaCl_2 , durante 7 min, mantida aquecida à 37 °C. Após leve agitação mecânica utilizando-se pipeta de transferência, o sobrenadante foi filtrado em malha de 200 μm e centrifugado a 1000 rpm por 20 segundos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuscitado em solução CIB contendo 1,3 mM de CaCl_2 e 2 mg/mL de albumina sérica bovina. Após 10 min em repouso a solução foi novamente centrifugada e o pellet foi ressuscitado em solução de Tyrode (contendo, em mM: 140 NaCl; 5,4 KCl; 0,5 MgCl_2 ; 0,33 NaH_2PO_4 ; 11 glicose; 5 HEPES e 1,8 CaCl_2), onde as células foram mantidas por até 5 h a temperatura ambiente, para realização dos experimentos.

4.3- Experimentos de contratilidade celular

Miócitos cardíacos provenientes do ventrículo esquerdo recém-isolados foram utilizados nos ensaios de contratilidade celular por detecção de bordas. Para a análise da contratilidade celular, as células foram plaqueadas em uma lamínula acoplada à uma câmara contendo um par de eletrodos paralelos, por meio dos quais foi feita a estimulação de campo para evocar a contração celular. A estimulação foi feita utilizando-se um estimulador elétrico, através de pulsos com duração de 4 ms e intensidade de 80 V bifásico com frequência de estimulação de 1 e 3 Hz. Durante os experimentos de contratilidade, as células foram mantidas em uma solução de Tyrode e em temperatura ambiente (25-30 °C). A câmara contendo as células plaqueadas foi montada em um microscópio invertido (Eclipse, TS 100, Nikon, Japão), e as imagens foram visualizadas em um computador utilizando uma câmera NTSC (MyoCamCCD100V, Ionoptix, Milton, MA, USA). Estas imagens foram utilizadas para mensurar o encurtamento celular em resposta a um estímulo elétrico usando um sistema de vídeo detector de bordas (Ionoptix, Milton, MA, USA) previamente calibrado para a objetiva utilizada. As variáveis envolvendo a contração e relaxamento da célula foram calculados baseando-se no sinal digitalizado obtido pelo sistema de detecção de bordas do conversor analógico-digital IonWizard A/D (Ionoptix, Milton, MA, USA). Entre 5-10 contrações consecutivas foram utilizadas para realizar a média de contração de uma determinada célula.

4.4- Experimentos de *patch-clamp*

Cardiomiócitos provenientes do ventrículo esquerdo recém isolados também foram plaqueadas e banhadas com solução de Tyrode. A placa contendo as células foi acoplada a um microscópio invertido (Axiovert 100 M, Zeiss, Alemanha). Foi utilizado um amplificador EPC 9.2 (HEKA Instruments, Germany) para a medida de correntes iônicas e potenciais transmembrana nos cardiomiócitos isolados, tendo como referência um eletrodo imerso na placa contendo as células isoladas, o qual foi conectado ao amplificador via *headstage*. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se as configurações *whole-cell voltage-clamp*, para medir as correntes iônicas macroscópicas, ou *whole-cell current-clamp* para medir potenciais de ação. As pipetas utilizadas nos experimentos possuíam resistência entre 1-2 M Ω . Todas as correntes foram filtradas por meio de um filtro Bessel, passa-baixa com frequência de corte de 2.9 kHz. Após o estabelecimento da configuração *Whole-cell*, as células foram mantidas em repouso por um intervalo de 3-5 min, de modo a permitir com que o meio intracelular se equilibrasse com a solução de pipeta. Os transientes capacitivos foram anulados em todos os experimentos, e para todos os experimentos de *Whole-cell voltage clamp*, utilizou-se a compensação eletrônica da resistência em série (50-65%). Células com resistência em série superiores a 8 M Ω não foram utilizadas durante as análises. As correntes adquiridas foram digitalizadas por meio de um conversor de sinal analógico-digital e armazenadas em computador. Durante a análise dos experimentos, os registros foram exportados em formato de texto (Igor) e convertidos para a extensão “.abf”, para então serem analisados usando-se o *software* Clampfit 10 (Molecular Devices, EUA).

Registros do PA: As pipetas de vidro contendo o eletrodo de estimulação foram preenchidas com solução interna contendo, em mM: 20 KCl; 130 K-aspartato; 130 KOH; 10 HEPES; 2 MgCl₂; 5 NaCl, 5 EGTA, ajustado para pH 7.2 com KOH (solução interna 1), ou a mesma solução descrita sem a presença de EGTA (solução interna 2). Em ambos os casos, a solução externa utilizada foi a solução de Tyrode. Quando utilizada a solução interna 1, os PAs foram obtidos a partir de um potencial de membrana clampeado em -80 mV e frequência de estimulação de 1 Hz. Foram gravados entre 40-80 PAs para cada célula, sendo o último utilizado para análise. Quando utilizada a solução interna 2, os PAs foram obtidos a partir de um potencial de membrana livre e não clampeado (equivalente ao potencial de repouso da própria célula após a diálise da solução de pipeta com o meio intracelular), utilizando frequência de

estimulação de 1 Hz e 3 Hz. Os primeiros 60 PAs foram gravados para verificar a estabilização da forma de onda do PA, e a média dos 30 PAs consecutivos foi utilizada na análise para cada célula. A média dos desvios padrão obtidos para cada conjunto de 30 potenciais analisados foi utilizada como medida da amplitude da alternância da duração do PA. Em ambos os protocolos os potenciais foram deflagrados por meio de pulsos quadrados com amplitude de 1 nA e duração variável entre 3-5 ms. A frequência de aquisição do sinal digital foi de 10 kHz.

Corrente total de potássio de saída: Os registros das correntes de potássio de saída foram realizados utilizando solução de pipeta contendo, em mM: 140 KCl, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 5 Glicose, pH ajustado para 7.2 com KOH. A solução extracelular utilizada foi a solução de Tyrode acrescido de 100 µM de CdCl₂ para bloquear a corrente de Ca²⁺. As correntes foram obtidas através de pulsos quadrados com duração de 3 s, com incrementos de +10 mV entre os pulsos a cada 15 s, variando o potencial transmembrana entre -40 e 70 mV, partindo de um potencial de membrana de -80 mV. Um pré-pulso de 40 mV com 50 ms de duração foi utilizado antes de cada pulso teste, de modo a inativar as correntes de sódio (INa). Todos os registros foram amostrados à frequência de 5 kHz.

Corrente de cálcio: Os registros eletrofisiológicos das correntes de cálcio tipo L foram feitos utilizando a solução interna em mM: 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 5 NaCl, 10 Hepes, 5 EGTA, pH 7.2, ajustado com CsOH. A solução externa utilizada foi também a solução de Tyrode. A curva de relação corrente-voltagem para a ativação dos canais de cálcio foi feita através de pulsos quadrados com 30 ms de duração, variando entre -40 a +50 mV, com incrementos de +10 mV e intervalo de 10 s entre cada pulso e partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV. Um pré-pulso de 50 ms de duração, partindo do potencial de membrana a -40 mV foi aplicado para inativar as INa. Os dados foram digitalizados a uma frequência de aquisição a 10 kHz. A curva da relação corrente-voltagem para ativação dos canais de cálcio tipo L foi ajustada utilizando-se uma função modificada da distribuição de Boltzmann, na forma:

$$I_v = G_{max} * \frac{(V_m - E_k)}{1 + e^{(V_a - V_m)/S}}$$

Sendo I_v a corrente medida em cada potencial testado (Y); G_{max} a condutância máxima; V_m , potencial de membrana em cada pulso teste (X); E_k , potencial de equilíbrio eletroquímico do íon; V_a , voltagem que ativa 50% dos canais; S , fator de inclinação da curva.

4.5- Microscopia confocal

Os miócitos cardíacos provenientes do ventrículo esquerdo recém-isolados foram marcadas pela adição do indicador fluorescente de cálcio Fluo-4 em sua forma acetoximetil éster (AM), na solução de Tyrode, respeitando uma concentração final de 5 μM do marcador. Em todos os experimentos foi utilizada solução estoque do fluoróforo na concentração de 5 mM, diluída em DMSO 100%.

As células foram mantidas em leve agitação por 30 min à temperatura ambiente, e após esse tempo, foram centrifugadas e ressuspensas em solução de Tyrode, onde permaneceram por mais 10 min para desesterificação da forma AM ester.

As mudanças transitórias na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocadas através dos transientes citoplasmáticos de cálcio foram medidas através do método de microscopia confocal, por meio do sistema de microscopia confocal Zeiss LSM 510 meta (Zeiss, Alemanha), localizado no Centro de Microscopia da UFMG (CAPI-ICB). Durante esse procedimento as células, após a marcação com o fluoróforo indicador de cálcio, foram depositadas em uma lamínula acoplada a uma câmara que continha um par de eletrodos paralelos através dos quais foi feita a estimulação de campo para evocação dos transientes de cálcio, por meio de pulsos com duração de 4 ms e amplitude de 80 V, bifásicos, com frequência de estimulação de 1 e 3 Hz. Para aquisição dos transientes de cálcio foi realizada a excitação das células marcadas utilizando laser de luz monocromática com frequência de 488. A luz emitida pelo processo de fluorescência após a excitação do fluoróforo associado ao Ca^{2+} foi filtrada por um filtro passa-alta de 505 nm e então captada e amplificada por um detector tipo tubo fotomultiplicador. A linha de varredura (fixada em 512 *pixels*) foi posicionada ao longo do eixo longitudinal dos cardiomiócitos, evitando-se as regiões dos núcleos. A resolução espacial variou de 0,1 a 0,3 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ e a resolução temporal utilizada neste trabalho foi de 1,92 ms/linha. O tamanho do *pinhole* foi ajustado para 276 μm , correspondente à uma fatia óptica <2,0 μm . Foram gravadas 5210 linhas, equivalente a aproximadamente 10 s de registro, durante os quais foi feita a aquisição de eventos de transientes de cálcio citoplasmáticos, tanto para 1 quanto 3 Hz. As mudanças na fluorescência (F) foram normalizadas pela fluorescência basal (F0) antes do primeiro transiente registrado, de tal modo que alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estão expressas como F/F0, valor que representa a média da amplitude dos 10 transientes obtidos. A média dos desvios padrões obtidos para cada conjunto de 10 transientes foi utilizada como medida da variação na amplitude entre os

transientes. O sinal analógico obtido pelo detector foi digitalizado utilizando sistema de 12 bits e armazenado em um computador. As análises da intensidade do sinal de fluorescência foram feitas utilizando o *software* Image-J.

4.6- Eletrocardiografia

O ECG foi realizado através de eletrodos de agulha posicionados subcutaneamente em cada membro para os registros eletrocardiográficos na derivação DII. Antes dos experimentos os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina 10%, anestésico geral, e cloridrato de xilazina 2%, relaxante muscular (0,1 ml; i.p.). O ECG e a frequência cardíaca (FC) foram monitorados continuamente durante 30 min por um amplificador de ECG (MP100, Biopac System Inc., EUA). As arritmias verificadas no ECG foram analisadas obedecendo à convenção de Lambeth sobre diretrizes para o estudo de arritmias (Walker et al, 1988). De acordo com essa convenção, os eventos arrítmicos podem ser definidos por um traçado eletrocardiográfico que apresenta um complexo QRS com alta amplitude, ausência ou múltiplas ondas P ou por um ritmo irregular de batimentos cardíaco (definido por irregularidades no segmento R-R). A taquicardia ventricular é definida como 3 ou mais contrações prematuras ventriculares consecutivas. Os eventos arrítmicos foram quantificados durante 10 min.

4.7- Análise da função cardíaca *ex vivo* pela técnica de coração isolado

Para avaliação da função cardíaca *ex vivo*, utilizou-se a técnica de coração isolado de Langendorff com fluxo constante. Essa preparação é constituída por um tubo de vidro conectado a um reservatório de solução nutritora de Krebs-Ringer (em mM: NaCl 118,40; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄ 1,17; CaCl₂ 2,5; Dextrose anidra 1,65 e NaHCO₃ 26,30) que foi oxigenada com mistura carbogênica (95% O₂, 5% CO₂) e mantida a 37 ± 1 °C através da circulação de água aquecida. Os animais foram heparinizados (400 U.I., i.p.) 10 min antes da eutanásia por decapitação. O coração foi retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritora resfriada (4 °C). Dessa forma, o metabolismo do miocárdio e o consumo de oxigênio foram reduzidos preservando o coração para o experimento. Em seguida, a aorta ascendente foi seccionada e fixada na ponta de uma cânula acoplada ao sistema de perfusão. Um fluxo de 2 mL foi perfundido constantemente durante todo o experimento. Para o registro da força contrátil, um pequeno gancho foi fixado no ápice do ventrículo esquerdo e

conectado a um transdutor de força. Uma tensão de aproximadamente $0,5 \pm 0,2$ g foi aplicada ao coração (tensão diastólica) e mantida constante durante o experimento. Um pequeno tudo de polietileno (P10; 0,5 cm) foi inserido dentro da câmara cardíaca ventricular esquerda, para evitar o acúmulo de solução em função da contribuição do sistema de veias mínimas. A frequência cardíaca intrínseca do coração foi calculada a partir das medidas diretas de tensão sendo que os sinais registrados pelo transdutor foram amplificados e digitalizados por meio de um sistema de aquisição e análise de dados analógico-digital (MP100 - AcqKnowledge III, Biopac System Inc., EUA). Um transdutor de pressão também foi acoplado ao sistema para análise da pressão de perfusão. O tempo de estabilização da preparação foi de 30 min seguidos de 30 min de registro.

4.8- Análise de parâmetros hemodinâmicos *in vivo*

Para a análise de parâmetros hemodinâmicos, pressão arterial média (PAM) e FC, foi realizada a técnica de pletismografia de cauda utilizando para isso, o pletismógrafo RTBP 2000 Kent-Scientific (Litchfield Ct 06759, EUA). Durante os experimentos, os camundongos foram acondicionados em um tubo cilíndrico de acrílico onde eram aquecidos e ventilados. A cauda dos animais foi encaixada a um manguito de borracha que foi adaptado à região proximal e ligado ao esfigmomanômetro para inflar e desinsuflar automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 50 s. Próximo ao manguito foi acoplado um transdutor de pulso que captava os sinais de PAM e FC a serem enviados e registrados em um computador.

4.9- Análises estatísticas

Os dados contidos nesse trabalho foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste *one-way ANOVA* ou *two-way ANOVA* seguidos pelo pós-teste de *Newman-keuls* para comparação entre pares, nas situações aplicáveis. Foi aceito como diferença estatisticamente significativa qualquer comparação que resultou num valor de $p < 0,05$. Foram usados os *softwares* ImageJ para análise das imagens, Clampfit para a análise eletrofisiológica, Graph Pad Prism 5.0 para confecção dos gráficos e para os ajustes das curvas.

5- RESULTADOS

5.1- Papel de ROS e NO na contratilidade dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas

A Doença de Chagas tem como um de seus principais sintomas a insuficiência cardíaca, principalmente nos estágios mais avançados da doença, a qual está intimamente relacionada com as propriedades mecânicas do coração e consequentemente dos cardiomiócitos. Ao analisar a contratilidade celular (Figura 9), constatamos uma redução na fração de encurtamento (Figura 9B) das células WT_15dpi ($6,7 \pm 0,45$ %) e das células isoladas de camundongos PHOXKO_15dpi ($6,5 \pm 0,6$ %) em relação aos controles WT ($9,2 \pm 0,4$ %) e PHOXKO ($9,7 \pm 0,5$ %). Além disso, a incubação prévia das células por 30 min com o L-NAME não restaurou a fração de encurtamento no grupo PHOXKO_LNAME_15dpi ($96,3 \pm 0,5$ %), ainda que tenha restituído a média desse parâmetro no grupo WT_15dpi ($9,1 \pm 0,6$ %) e não tenha alterado a média nos grupos WT_LNAME ($8,1 \pm 0,4$ %) e PHOXKO_LNAME ($8,6 \pm 0,4$ %) em relação aos seus respectivos controles.

Quando consideramos o tempo para atingir o pico da contração (Figura 9C), não foi possível observar nenhuma diferença entre os grupos analisados, WT ($99,9 \pm 3,5$ ms), WT_LNAME ($89,3 \pm 2,8$ ms), WT_15dpi ($96,6 \pm 3,7$ ms), WT_LNAME_15dpi ($88,0 \pm 2,6$ ms), PHOXKO ($91,3 \pm 2,2$ ms), PHOXKO_LNAME ($83,4 \pm 2,0$ ms) PHOXKO_15dpi ($94,2 \pm 2,9$ ms) PHOXKO_LNAME_15dpi ($87,9 \pm 2,0$ ms). Apesar disso, os animais WT_15dpi e PHOXKO_15dpi apresentaram aumento na taxa máxima de relaxamento celular ($141,2 \pm 13,1$ m/s e $145,7 \pm 17,7$ m/s, respectivamente) em relação aos outros grupos, que não apresentaram diferença significativa entre si WT ($204,7 \pm 11,9$ m/s), WT_LNAME ($194,0 \pm 11,4$ m/s), WT_LNAME_15dpi ($223,4 \pm 23,8$ m/s), PHOXKO ($222,5 \pm 166,0$ m/s), PHOXKO_LNAME ($192,3 \pm 10,1$ m/s) PHOXKO_LNAME_15dpi ($172,1 \pm 194$ m/s) (Figura 9D).

Além da análise da taxa máxima para o relaxamento, também foi analisado o tempo necessário para que se proceda 90% desse processo (Figura 9F). Foi possível observar que os camundongos PHOXKO apresentam menor tempo para o relaxamento em relação aos animais WT ($89,2 \pm 3,1$ ms e $104,7 \pm 4,5$ ms, respectivamente). Essa redução foi inibida pela infecção com *T. cruzi*, e esse parâmetro ficou ainda mais prolongado após a incubação das células com o L-NAME (PHOXKO_15dpi: $94,9 \pm 4,2$ ms; PHOXKO_LNAME_15dpi: $115,7 \pm 4,9$ ms). Os demais grupos não diferiram

significativamente entre si e entre os valores respectivos aos grupos PHOXKO_15dpi e PHOXKO_LNAME_15dpi (WT_LNAME: $102,7 \pm 3,0$ ms; WT_15dpi: $108,7 \pm 4,2$ ms; WT_LNAME_15dpi: $94,8 \pm 4,3$ ms PHOXKO_LNAME: $99,6 \pm 3,0$ ms).

Finalmente, foi observado aumento no desenvolvimento de contrações arrítmicas nos animais PHOXKO_15dpi em relação aos outros grupos experimentais, que não diferem entre si significativamente, WT: $1,4 \pm 0,4$; WT_LNAME: $2,6 \pm 0,7$ PHOXKO: $1,5 \pm 0,4$; PHOXKO_LNAME: $2,8 \pm 0,7$; WT_15dpi: $1,4 \pm 0,5$; WT_LNAME_15dpi: $1,2 \pm 0,3$; PHOXKO_LNAME_15dpi: $1,4 \pm 0,5$.

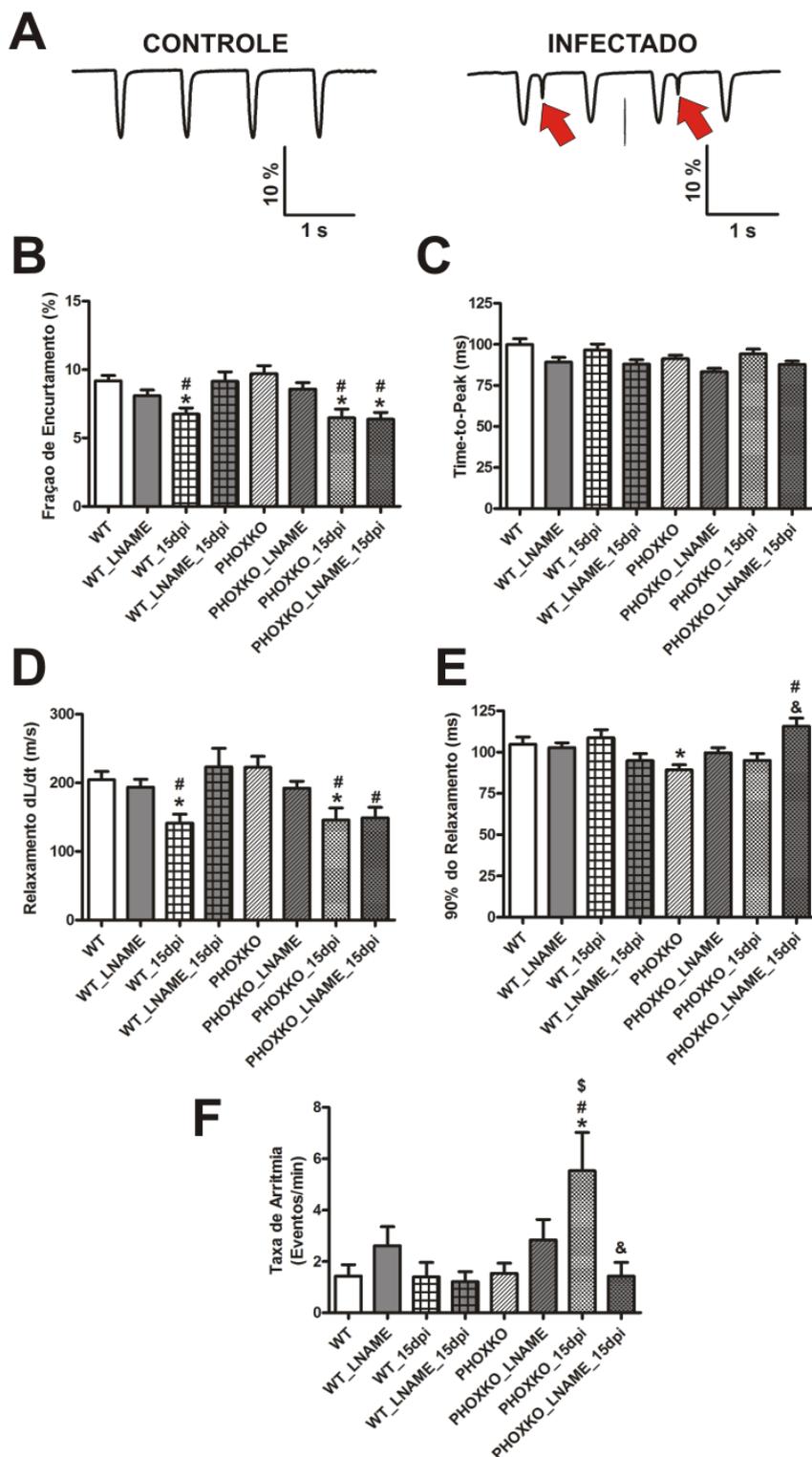


Figura 9: Papel de ROS e NO nas propriedades contráteis dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) traçados representativos de uma sequência de 4 eventos de contração celular em animais não infectados (à esquerda, no caso de uma célula de um camundongo WT), e uma sequência típica observada em animais infectados (à direita, célula de animal

PHOXKO_15dpi) evidenciando a redução na fração de encurtamento observado nesses grupos. As setas vermelhas demonstram a ocorrência de eventos de contrações arrítmicas, independentes da estimulação de campo, comumente observadas nos animais PHOXKO_15dpi. Abaixo, observa-se o gráfico da média da fração de encurtamento (B), tempo para o pico da contração (C), taxa máxima de relaxamento (D), eventos de arritmia celular/minuto de registro (E), e tempo para 90% do relaxamento da célula (F) para os diversos grupos estudados (WT, n=49); (WT_LNAME, n=43); (WT_15dpi, n=32); (WT_LNAME_15dpi, n=24) (PHOXKO, n=45); (PHOXKO_LNAME, n=40); (PHOXKO_15dpi, n=29); (PHOXKO_LNAME_15dpi, n=25). As barras com fundo branco representam células na ausência de L-NAME e barras com fundo cinza, após a incubação prévia das células por 30 min com L-NAME (10 μ M). * comparação entre os grupos em relação ao WT; # comparação entre grupos em relação ao PHOXKO; \$ comparação entre WT_15dpi e PHOXKO_15dpi; & comparação entre PHOXKO_15dpi e PHOXKO_LNAME_15dpi. $p < 0,05$, *One-way ANOVA*.

5.2- Papel de ROS e NO nas propriedades do PA dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas

Diversos estudos demonstram a capacidade de ambos, ROS e NO, em modular as propriedades de diversos canais iônicos e proteínas transportadoras, componentes importantes na manutenção da excitabilidade celular dos cardiomiócitos. Ao analisar o PA em células isoladas utilizando na solução interna da pipeta o quelante de cálcio EGTA (ver métodos), observamos que os cardiomiócitos provenientes de animais WT_15dpi ($26,3 \pm 1,4$ ms, n=42 a 90% da repolarização) possuem a fase de repolarização (APR, do inglês, *Action Potential Repolarization*) mais prolongada quando comparados aos animais WT ($21,2 \pm 1,4$ ms, n=34 a 90% da repolarização). Esse fenômeno não foi observado nos cardiomiócitos provenientes de animais PHOXKO_15dpi, os quais não apresentaram prolongamento do PA quando comparados aos animais WT ou PHOXKO ($20,1 \pm 1,3$ ms, n=36 vs. $21,2 \pm 1,4$ ms, n=34 e $19,7 \pm 0,7$ ms, n=51, respectivamente, a 90% da repolarização) (figura 10).

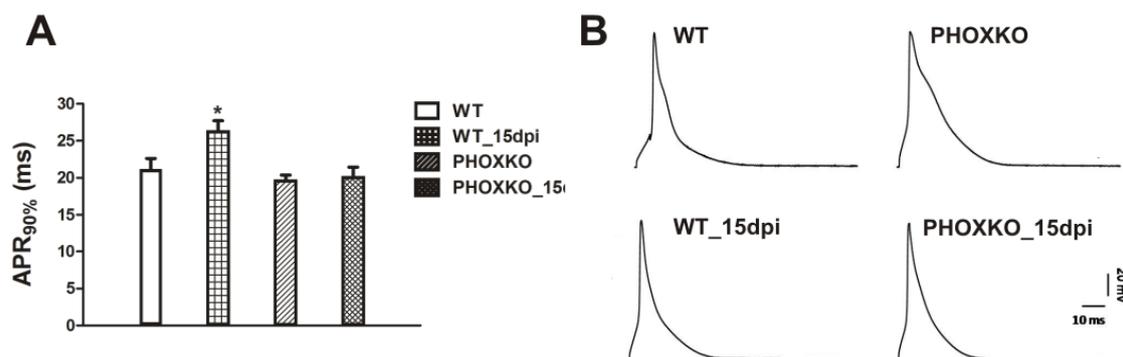


Figura 10: Papel de ROS e NO nas propriedades do PA em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) *Plot* do tempo para que ocorra 90% da repolarização do potencial nos diferentes grupos. (B) Registros representativos do PA nas células dos diferentes grupos, controle (WT), controle 15 dias após infecção com *T.cruzi* cepa Y (WT_15dpi), camundongos NOX2^{-/-} (PHOXKO), e camundongos NOX2^{-/-} 15 dias após a infecção (PHOXKO_15dpi), evidenciando as diferenças na morfologia do PA ventricular nos diferentes grupos. * comparação entre os grupos em relação ao WT. $p < 0,05$, *One-way ANOVA*.

Entretanto, a figura 11 mostra o perfil do PA dos cardiomiócitos quando os experimentos foram realizados na ausência de EGTA: Apesar de uma leve tendência, não foi possível observar um prolongamento da fase de repolarização do PA de cardiomiócitos advindos de animais WT_15dpi ($205,7 \pm 27,3$ ms, $n=11$ a 90% da repolarização) quando comparados aos WT ou PHOX ($169,8 \pm 32,8$ ms, $n=21$ e $118,6 \pm 25,7$ ms, $n=13$ respectivamente, a 90% da repolarização), os quais não diferem entre si com relação a esse parâmetro. Por outro lado, os animais PHOXKO_15dpi apresentaram PA muito prolongado quando comparado aos outros grupos ($329,8 \pm 37,3$ ms, $n=19$). Além disso, esse prolongamento observado da repolarização do PA não foi alterado após a incubação das células por 30 min com o inibidor inespecífico das óxido nítrico sintases, *N^G-nitro-L-arginine methyl Ester* (L-NAME), em relação aos respectivos grupos equivalentes na ausência desse composto ($107,3 \pm 35,6$, $n=7$; $199,4 \pm 25,8$, $n=14$; $79,5 \pm 21,3$, $n=9$; $260,9 \pm 40,0$, $n=15$, respectivamente, para os grupos WT_LNAME; WT_15dpi_LNAME; PHOXKO_LNAME; PHOXKO15dpi_NAME).

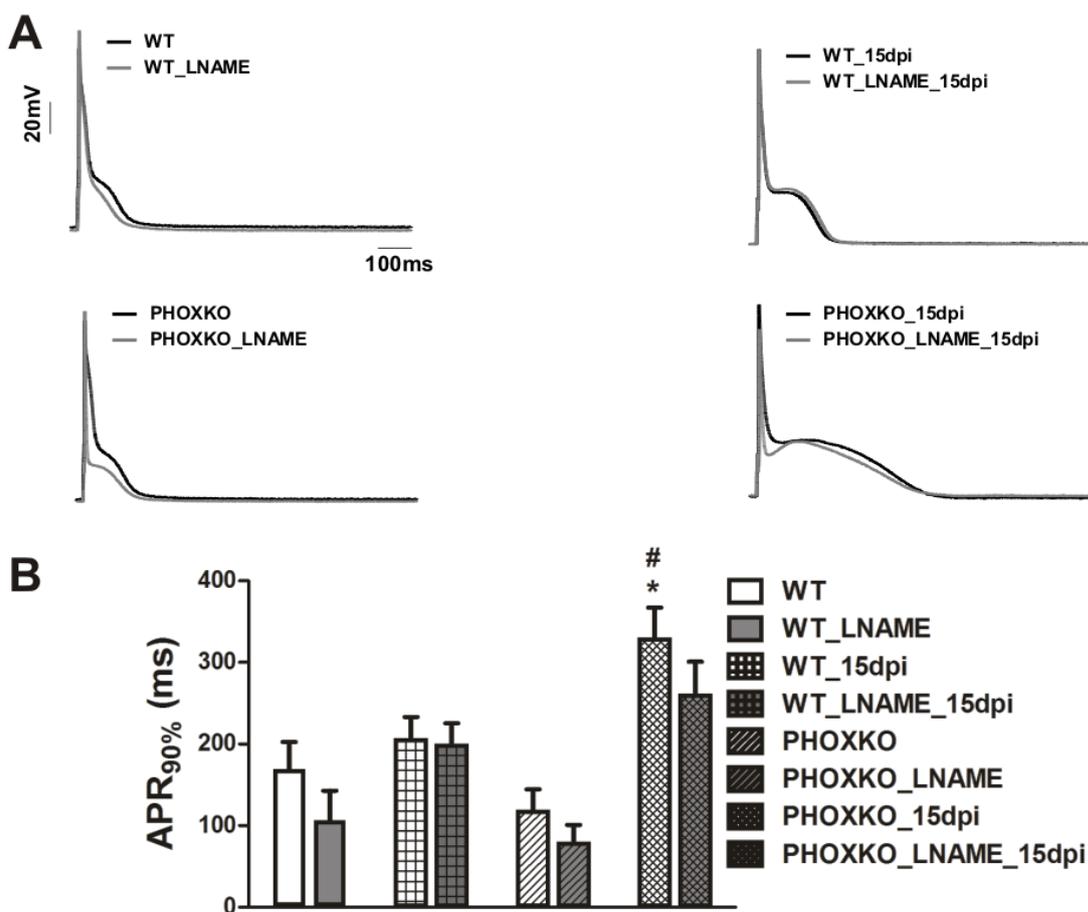


Figura 11: Papel de ROS, NO e manejo intracelular de cálcio nas propriedades do PA em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) Registros representativos do PA para células dos diferentes grupos, controle (WT), controle 15 dias após infecção com *T.cruzi* cepa Y (WT_15dpi), camundongos NOX2^{-/-} (PHOXKO), e camundongos NOX2^{-/-} 15 dias após a infecção (PHOXKO_15dpi), evidenciando as diferenças na morfologia do PA ventricular nos diferentes grupos. Os traçados em preto representam PAs na ausência de L-NAME, e os traçados em cinza, PAs após a incubação prévia das células por 30 min com L-NAME (10 μ M). (B) *Plot* do tempo para que ocorra 90% da repolarização do potencial de ação nos diferentes grupos. * comparação entre os grupos em relação ao WT. # comparação entre grupos em relação ao PHOXKO. $p < 0,05$, *One-way ANOVA*.

Um fator importante na geração e propagação de arritmias cardíacas é a flutuação da duração do PA em torno de sua média, denominado alternância do PA (Bers, 2005). Dessa forma, resolvemos investigar o desvio padrão da média do tempo

necessário para que ocorra 90% da repolarização, em uma sequência de 30 PAs estáveis, medidos no protocolo sem a presença de EGTA (rever métodos para mais detalhes). A figura 12 mostra que a média do desvio padrão para os PAs provenientes de animais PHOXKO_15dpi ($89,1 \pm 22.4$ ms, $n=19$) é significativamente aumentada quando comparada aos animais WT ($9,8 \pm 2,6$ ms, $n=21$), PHOXKO ($9,8 \pm 3.6$ ms, $n=13$), e até mesmo WT_15dpi ($30,0 \pm 10,2$ ms, $n=12$), os quais não apresentam diferença significativa entre si, apesar de haver uma tendência ao aumento do desvio associado aos animais WT_15dpi em relação aos WT. Esse aumento na variação da duração do PA nos cardiomiócitos dos animais PHOXKO_15dpi foi revertido pela administração do L-NAME ($20,5 \pm 3,3$ ms, $n=13$), ainda que a alternância do PA não tenha sido afetada pela incubação prévia desse fármaco nos outros grupos experimentais em relação aos respectivos grupos equivalentes na ausência do L-NAME: $14,2 \pm 5,9$, $n=7$; $24,2 \pm 5,48$, $n=15$; $5,9 \pm 1,9$, $n=9$; respectivamente, para os grupos WT_LNAME; WT_15dpi_LNAME; PHOXKO_LNAME).

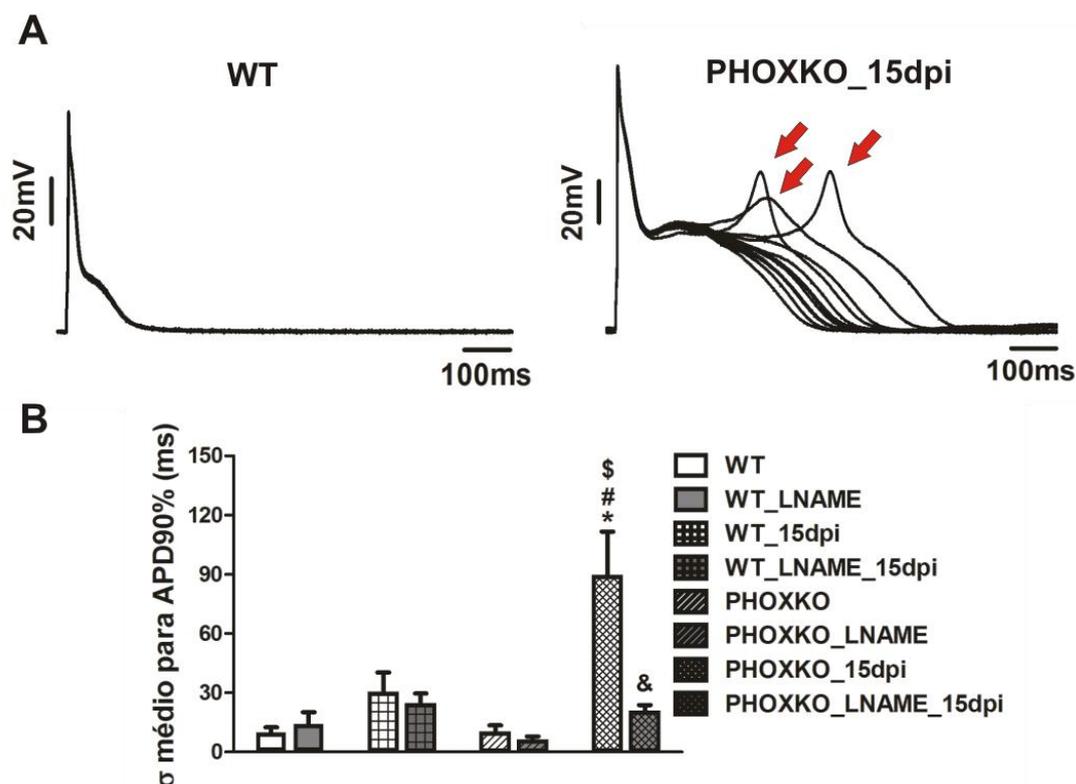


Figura 12: Papel de ROS e NO na alternância da duração do PA em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da Doença de Chagas.

(A) Registros representativos de uma sequência de 10 PAs em animais não infectados (painel superior à esquerda, no caso de uma célula de um camundongo WT), e uma sequência típica observada em animais infectados (painel superior à direita, célula de animal PHOXKO_15dpi) evidenciando o aumento na alternância da duração do PA observado nesse grupo. As setas vermelhas demonstram a ocorrência de eventos de pós-despolarização, comumente observadas nesse grupo. (B) *Plot* do desvio padrão médio obtido pelos desvios de uma sequência de 30 PAs associados à cada célula analisada nos diferentes grupos. As barras com fundo branco representam células na ausência de L-NAME e barras com fundo cinza, após a incubação prévia das células por 30 min com L-NAME (10 μ M). * comparação entre os grupos em relação ao WT; # comparação entre grupos em relação ao PHOXKO; \$ comparação entre WT_15dpi e PHOXKO_15dpi; & comparação entre PHOXKO_15dpi e PHOXKO_LNAME_15dpi. $p < 0,05$, *One-way ANOVA*.

Além da fase de repolarização, outras variáveis do PA foram investigadas. Os parâmetros encontrados para essas variáveis estão organizados na Tabela 1. A amplitude do PA, assim como a máxima taxa de repolarização, o potencial repouso, a média de tempo para 50% da repolarização e o respectivo desvio padrão médio da sequência dos PAs analisados não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Apesar disso, um leve aumento na máxima taxa de despolarização foi observado nos animais WT_15dpi, seguido por uma leve redução na máxima taxa de repolarização desse grupo, ainda que esse valor não seja significativo.

Tabela 1: Variáveis do potencial de ação nos diferentes grupos experimentais

	WT	WT_LNAME	WT_15dpi	WT_LNAME_15dpi	PHOXKO	PHOXKO_LNAME	PHOXKO_15dpi	PHOXKO_LNAME_15dpi
Variáveis	média E.P.M. n							
APR50% (ms)	11,1 1,5 17	8,7 2,2 7	16,0 2,5 12	15,7 2,4 15	11,5 2,3 13	8,8 2,6 9	17,3 3,1 19	16,9 2,6 15
$\sigma_{APR50\%}$ (ms)	0,2 0,05 17	0,3 0,1 7	0,4 0,07 12	0,4 0,1 15	0,3 0,08 13	0,2 0,09 9	0,7 0,3 19	0,7 0,2 15
PA_Amplitude (ms)	112,8 1,6 17	113,4 2,3 7	121,0 1,1 12	108,7 9,0 15	121,7 0,7 13	114,3 3,1 9	117,1 1,6 19	114,8 2,8 15
Em (V)	-65,01 0,4 17	-65,5 0,9 7	-65,5 0,6 12	-63,4 2,3 15	-65,5 0,7 13	-65,1 0,4 9	-66,1 0,1 19	-65,1 0,4 15
Max. dV/dt despol. (V/ms)	124,4 15,0 17	193,3 27,4 7	221,7* 10,5 12	192,2 14,7 15	175,3 26,2 13	216,1 20,9 9	185,6 13,6 19	200,5 14,2 15
Max. dV/dt repol. (V/ms)	-16,4 1,5 17	-16,8 2,3 7	-13,6 1,7 12	-13,3 1,7 15	-15,8 2,4 13	-23,65 4,5 9	-14,3 3,2 19	-13,2 1,5 15

Resultados expressos como média \pm E.P.M.; * diferença significativa em relação ao WT (* $p < 0,05$, *one-way ANOVA*). Em: potencial de repouso, Max. dV/dt despol.: máxima taxa de despolarização; Max dV/dt repol.: máxima taxa de repolarização; $\sigma_{APR50\%}$: desvio padrão médio do tempo para 50% da repolarização do PA.

5.3- Papel de ROS e NO na modulação das correntes de potássio dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas

O aumento na fase de repolarização do PA observado sugere a modulação da atividade de diversos canais iônicos que influenciam, de alguma maneira, nesse processo. Dessa forma, resolvemos investigar as correntes de potássio nos cardiomiócitos isolados, as quais constituem o principal mecanismo responsável pela fase de repolarização do PA cardíaco. Esses experimentos, juntamente com as medidas das correntes de cálcio e do PA utilizando protocolo com EGTA, foram feitos em conjunto e já estão publicados em outro trabalho (Roman-Campos et al, 2011). Os cardiomiócitos provenientes de animais WT_15dpi ($23,7 \pm 1,5$ pA/pF, $n=23$)

apresentam a densidade das correntes de potássio de saída reduzida, por exemplo, quando as células foram estimuladas por pulsos a +70 mV, quando comparada à densidade das corrente de potássio dos cardiomiócitos isolados dos animais WT ($33,4 \pm 3,6$ pA/pF, n=23) e PHOX ($37,7 \pm 3,8$ pA/pF, n=14), os quais não diferem entre si. Em contrapartida, essa redução não foi observada no grupo PHOXKO_15dpi ($34,9 \pm 2,7$ pA/pF, n=16), que apresenta densidade das correntes de potássio semelhantes aos grupos WT e PHOX. A densidade de corrente foi avaliada considerando o pico da corrente normalizado pela capacitância da célula. Apesar da redução da densidade de corrente observada nos animais WT_15dpi, em nenhum grupo foi observado alteração na dependência de voltagem para a ativação desses canais, medida pela comparação do V1/2, voltagem necessária para se atingir metade da densidade máxima da corrente ($16,9 \pm 2,2$ mV; $17,6 \pm 1,1$ mV; $17,9 \pm 1,3$ mV; $17,9 \pm 1,5$ mV, respectivamente, para células dos grupos WT, WT_15dpi, PHOXKO e PHOXKO_15dpi).

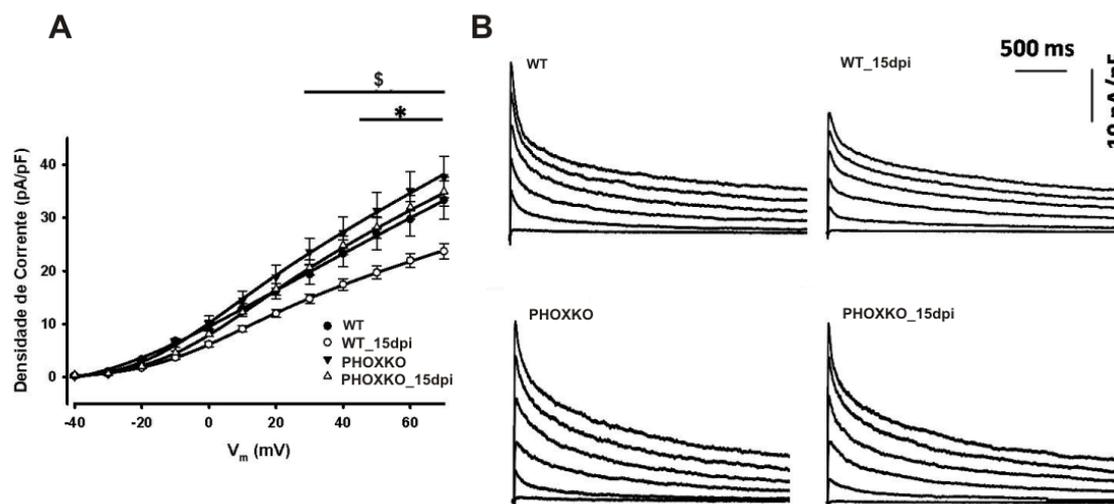


Figura 13: Papel de ROS e NO na modulação da corrente transiente rápida de saída de potássio (I_{to}) em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) Gráfico que apresenta a relação corrente-voltagem obtida pela normalização do pico da corrente registrado pela capacitância celular, em função dos diversos potenciais testados. Os círculos representam média \pm E.P.M. (B) Registros representativos de correntes medidas em cada potencial testado, para células dos diferentes grupos, controle (WT), controle 15 dia após infecção com *T. cruzi* cepa Y (WT_15dpi), camundongos NOX2^{-/-} (PHOXKO), e camundongos NOX2^{-/-} 15 dias após a infecção (PHOXKO_15dpi), evidenciando as diferenças na média da

densidade das correntes apresentadas em (A). * comparação entre WT e WT_15 dpi; \$ comparação entre WT_15 dpi e PHOXKO_15dpi. $p < 0,05$, *two-way ANOVA*.

Outro componente importante envolvido principalmente nas fases finais da repolarização do PA é a corrente de potássio retificadora de entrada, I_{K1} (Nerbonne & Kass, 2005). De forma surpreendente, como mostrado na figura 14, os animais PHOXKO15_dpi apresentaram aumento na densidade de I_{K1} quando comparados aos outros grupos experimentais, os quais não diferiram entre si ($-17,2 \pm 1,1$ pA/pF $n=18$; $-17,5 \pm 1,1$ pA/pF $n=18$; $-16,4 \pm 0,9$ pA/pF $n=20$; e $-25,4 \pm 2,2$ pA/pF $n=16$, respectivamente, a -130 mV, para células dos animais WT, WT_15dpi, PHOXKO e PHOXKO_15dpi).

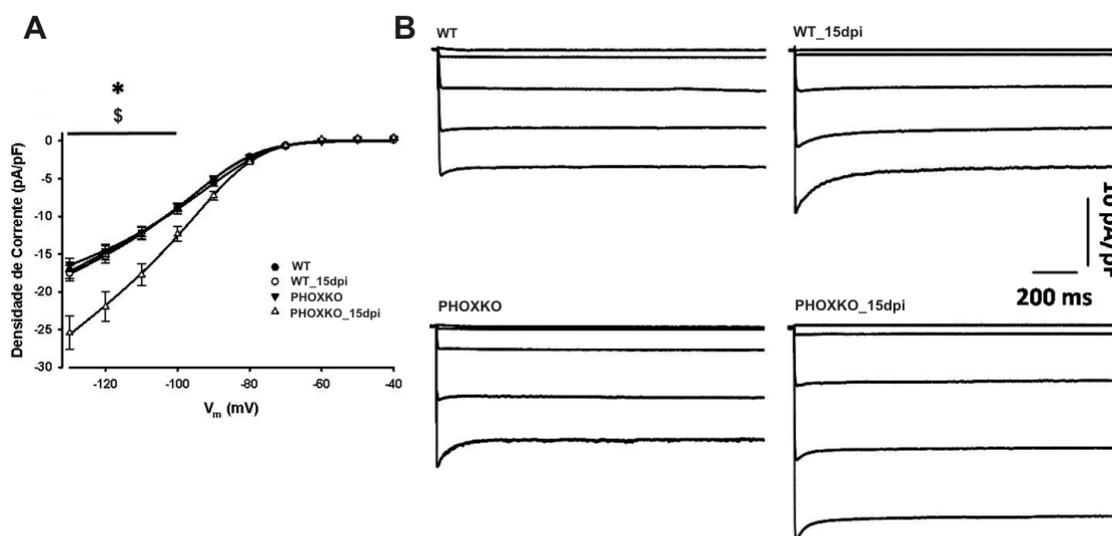


Figura14: Papel de ROS e NO na modulação da corrente de potássio retificadora de entrada (I_{K1}) em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) Gráfico que apresenta uma relação corrente-voltagem obtida pela normalização do pico da corrente registrado pela capacitância celular, em função dos diversos potenciais testados. Os círculos representam média \pm E.P.M. (B) Registros representativos de correntes medidas em cada potencial testado, para células dos diferentes grupos, controle (WT), controle 15 dias após infecção com *T. cruzi* cepa Y (WT_15dpi), camundongos NOX2^{-/-} (PHOXKO), e camundongos NOX2^{-/-} 15 dias após a infecção (PHOXKO_15dpi), evidenciando as diferenças na média da

densidade das correntes apresentadas em (A). * comparação entre WT e WT_15 dpi; \$ comparação entre WT_15 dpi e PHOXKO_15dpi. $p < 0,05$, *two-way ANOVA*.

5.4- Envolvimento de ROS e NO na modulação das correntes de cálcio tipo-L dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas

Um outro componente importante envolvido no processo de repolarização do PA e também no ECC é a corrente de cálcio tipo-L. A figura 15A, apresenta uma curva da densidade da corrente em função da voltagem aplicada para ativação de I_{Ca-L} . Podemos observar que quando submetidas a um pulso despolarizante de +10mV, as células advindas dos animais WT_15dpi ($-4,9 \pm 0,2$ pA/pF, $n=25$) apresentam redução da densidade de I_{Ca-L} quando comparado aos grupos WT ($-8,4 \pm 0,3$ pA/pF, $n=25$) e PHOXKO ($-7,1 \pm 0,4$ pA/pF, $n=26$), os quais não diferem significativamente entre si. Por outro lado, os animais PHOXKO_15dpi não apresentam nenhuma atenuação da I_{Ca-L} . ($-7,3 \pm 0,4$ pA/pF, $n=19$) quando comparado aos grupos WT ou PHOXKO. Além disso, a dependência de voltagem para a ativação dos canais, medida através da comparação do $V_{1/2}$ não foi alterada entre os grupos ($-9,2 \pm 0,5$ mV, $-9,5 \pm 0,9$ mV, $-9,4 \pm 0,6$ mV, $-9,6 \pm 0,5$ mV para células dos animais WT, WT_15dpi, PHOXKO e PHOXKO_15dpi).

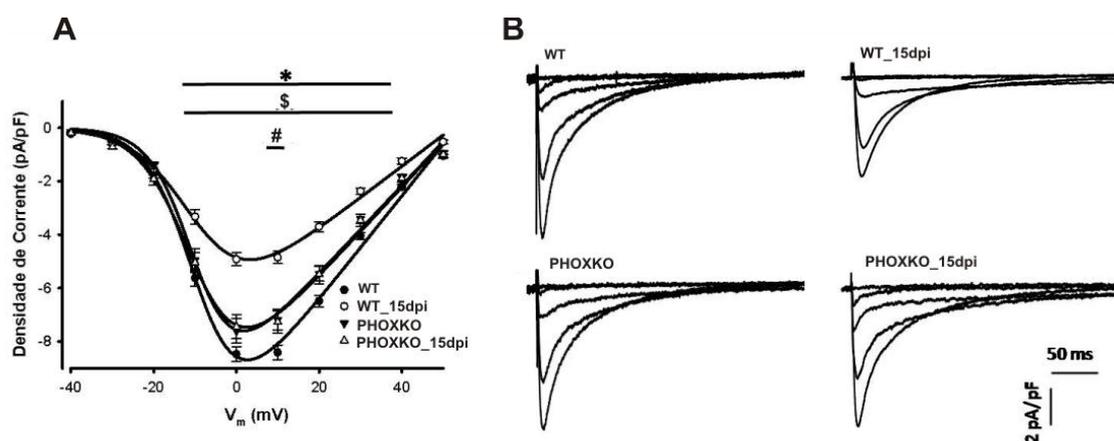


Figura 15: Papel de ROS e NO na modulação da corrente de cálcio tipo-L em cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) Gráfico que apresenta uma relação corrente-voltagem obtida pela normalização do pico da corrente registrado pela capacitância celular, em função dos

diversos potenciais testados. Os círculos representam média \pm E.P.M. As curvas foram ajustadas utilizando a equação 1(métodos). (B) Registros representativos de correntes medidas em cada potencial testado, para células dos diferentes grupos, controle (WT), controle 15 dias após infecção com *T. cruzi* cepa Y (WT_15dpi), camundongos NOX2^{-/-} (PHOXKO), e camundongos NOX2^{-/-} 15 dias após a infecção (PHOXKO_15dpi), evidenciando as diferenças na média da densidade das correntes apresentadas em (A). * comparação entre WT e WT_15 dpi; # comparação entre WT e PHOXKO; \$ comparação entre WT_15 dpi e PHOXKO_15dpi. $p < 0,05$, *two-way ANOVA*.

5.5- Envolvimento de ROS e NO no manejo intracelular de cálcio dos cardiomiócitos durante a fase aguda da Doença de Chagas

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

A figura 16B apresenta a média dos transientes citoplasmáticos de cálcio obtidos para cada grupo experimental. É possível perceber uma pequena redução, porém não significativa, do transiente de cálcio dos cardiomiócitos isolados de animais WT_15dpi ($2,2 \pm 0,1$, $n=15$) em relação aos WT ($2,7 \pm 0,1$, $n=19$) e PHOX ($2,5 \pm 0,1$, $n=22$), os quais não possuem diferença significativa entre si. Por outro lado, os animais PHOXKO ($1,8 \pm 0,1$, $n=18$) apresentaram profunda redução no transiente citoplasmático de cálcio quando comparado aos outros grupos. Além disso, nessa mesma figura é possível observar que a incubação prévia das células com L-NAME não foi capaz de restaurar a amplitude do transiente nos animais PHOXKO_LNAME_15dpi ($1,95 \pm 0,1$, $n=12$), tampouco provocou alterações significativas nos transiente dos outros grupos ($2,6 \pm 0,1$, $n=16$; $2,1 \pm 0,2$, $n=3$; $2,5 \pm 0,1$, $n=16$, respectivamente, para células dos grupos WT_LNAME, WT_LNAME_15dpi, PHOXKO_LNAME).

Um outro aspecto importante do manejo de cálcio nos cardiomiócitos é o processo de extinção do evento transiente de aumento de cálcio citoplasmático, necessário para que se proceda o relaxamento celular (figura 16C). Um dos

componentes principais nesse processo é a atividade da SERCA, que pode ser indiretamente medida com base no processo de decaimento da fluorescência associada ao transiente de cálcio. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais na constante exponencial do decaimento do transiente, na presença ou na ausência de L-NAME, como apresentado na figura 16C ($224,7 \pm 9,5$, $n=19$; $160,6 \pm 7,7$, $n=16$; $214,2 \pm 8,9$, $n=14$; $187,8 \pm 22,2$, $n=3$; $309,7 \pm 22,2$, $n=21$; $302,6 \pm 23,9$, $n=16$; $237,5 \pm 28,8$, $n=15$; $333,1 \pm 13,4$, $n=9$, respectivamente, para células dos grupos WT, WT_LNAME, WT_15dpi, WT_LNAME_15dpi, PHOXKO, PHOXKO_LNAME, PHOXKO_LNAME_15dpi).

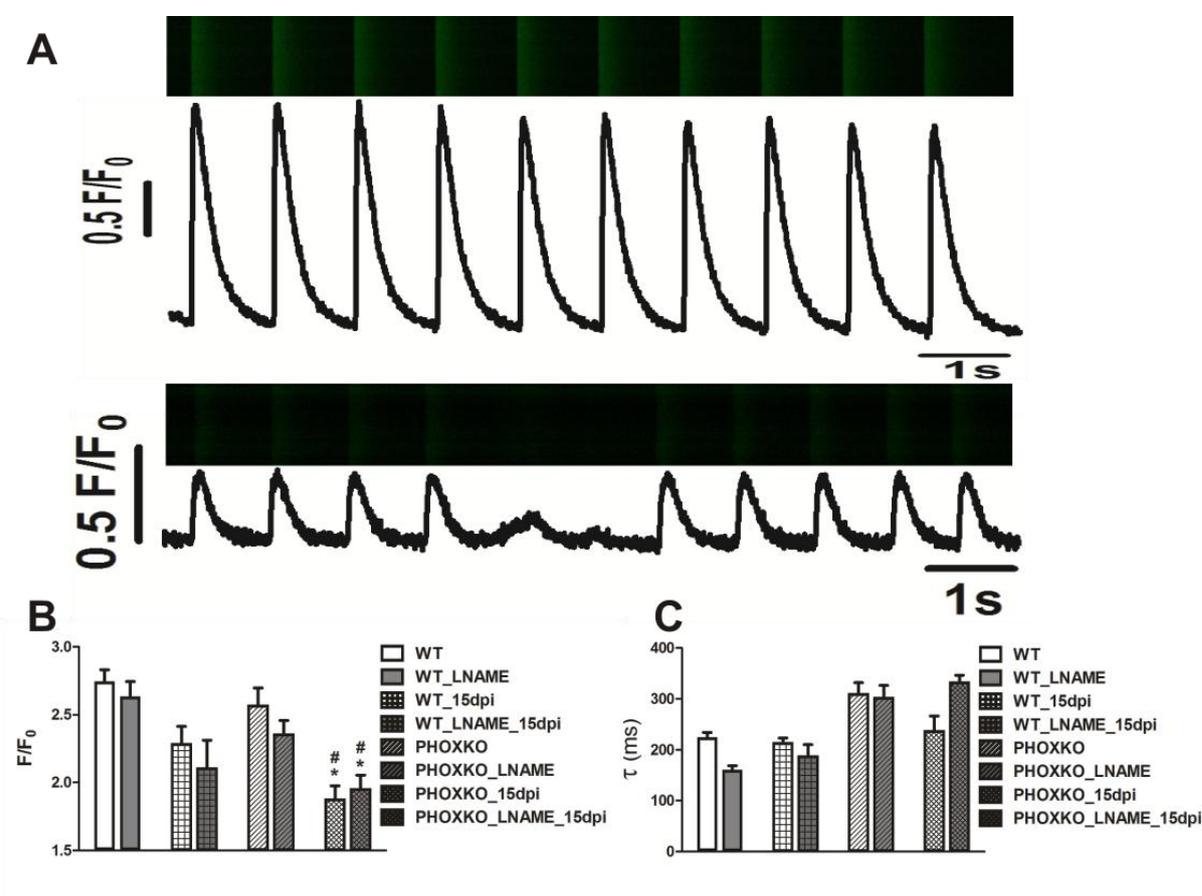


Figura 16: Papel de ROS e NO no manejo intracelular de cálcio em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) Registros representativos de uma sequência de 10 eventos de transiente de cálcio em animais não infectados (painel superior, no caso de uma célula de um camundongo WT), e uma sequência típica observada em animais infectados (painel inferior, célula de animal PHOXKO_15dpi) evidenciando a redução da amplitude do transiente de cálcio observada nesse grupo. (B) Gráfico que sumariza as médias da amplitude do transiente

observadas nos diferentes grupos experimentais. (C) *Plot* da média da constante de decaimento do transiente para os diferentes grupos experimentais. As barras com fundo branco representam células na ausência de L-NAME e barras com fundo cinza, após a incubação prévia das células por 30 min com L-NAME (10 μ M). *comparação entre os grupos em relação ao WT; # comparação entre grupos em relação ao PHOXKO. $p < 0,05$, *One-way ANOVA*.

5.6- Papel de ROS e NO na modulação das dos parâmetros da função cardíaca durante a fase aguda da Doença de Chagas

De posse dos resultados que evidenciam alterações mecânicas e elétricas a nível celular nos cardiomiócitos infectados, decidimos avaliar como a produção e o balanço de ROS e NO interferem na função cardíaca e parâmetros hemodinâmicos *in vivo* e *ex vivo*. Utilizando a técnica de pletismografia de cauda foram avaliados parâmetros hemodinâmicos, PAM e FC. Como resultado, observou-se uma redução na pressão arterial média dos camundongos PHOXKO_15dpi ($82,4 \pm 4,3$ mmHg, $n=5$) em relação aos controles, WT ($123,1 \pm 6,1$ mmHg, $n=5$) e PHOXKO ($131,4 \pm 17,0$ mmHg, $n=5$), e em relação aos WT_15dpi ($111,9 \pm 5,1$ mmHg, $n=5$), os quais não diferem significativamente entre si (figura 17A). Já em relação à FC (Figura 17B), os camundongos WT_15dpi apresentaram FC elevada ($696,6 \pm 8,0$ bpm, $n=5$) quando comparada aos outros grupos WT: $582,1 \pm 51,5$ bpm, $n=5$; PHOXKO: $481,9 \pm 37,0$ bpm, $n=5$; PHOXKO_15dpi: $554,8 \pm 13,0$ bpm, $n=5$, os quais não diferem significativamente entre si.

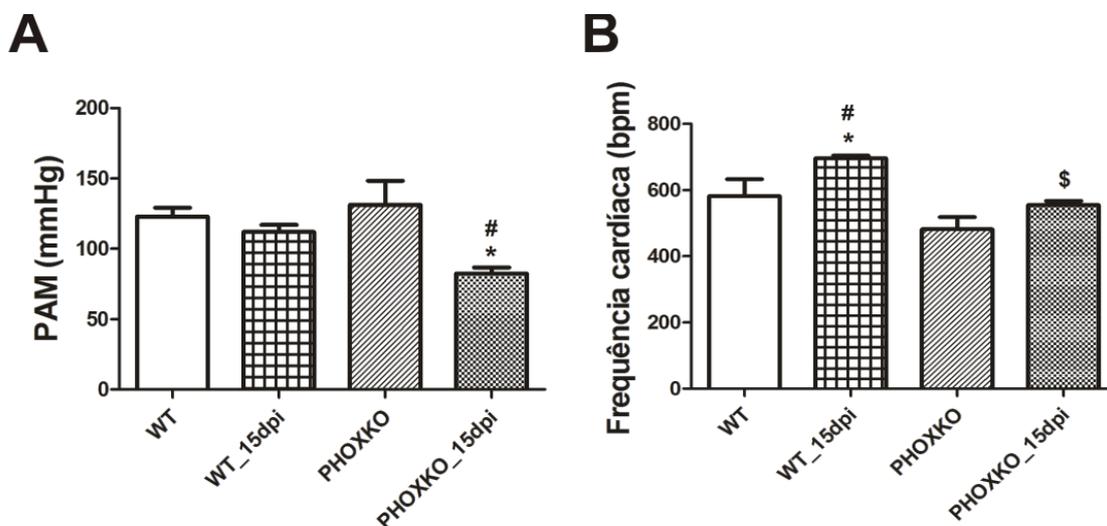


Figura 17: Envolvimento ROS e NO com parâmetros hemodinâmicos durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) PAM observada nos diferentes grupos experimentais. (B) FC em animais acordados obtida pela plestimografia de cauda, para os diferentes grupos experimentais. * comparação entre os grupos em relação ao WT; # comparação entre grupos em relação ao PHOXKO; \$ comparação entre WT_15dpi e PHOXKO_15dpi. $p < 0,05$, *One-way ANOVA*.

Durante o desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica, um dos principais sinais clínicos observados, principalmente em estágios mais avançados da fase crônica, é a insuficiência cardíaca. Dessa forma, avaliamos a função cardíaca no órgão como um todo, utilizando a técnica de coração isolado montado em um sistema de Langendorff de fluxo constante. Considerando a tensão sistólica não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais, WT: $0,9 \pm 0,03$ g, $n=7$; PHOXKO: $0,9 \pm 0,08$ g $n=4$; WT_15dpi: $1,1 \pm 0,1$ g $n=4$ e PHOXKO_15dpi: $0,9 \pm 0,1$ g $n=5$ (figura 18A). Por outro lado, a tensão diastólica nos animais PHOXKO_15dpi e WT_15dpi foi significativamente menor em relação aos controles (WT: $0,5 \pm 0,01$ g, $n=7$; WT_15dpi: $0,41 \pm 0,01$ g $n=4$ PHOXKO: $0,51 \pm 0,01$ g, $n=4$; e PHOXKO_15dpi: $0,43 \pm 0,01$ g $n=5$ (figura 18B), ainda que não diferiram significativamente entre si.

Em relação à FC intrínseca do coração, foi observado um incremento do parâmetro associado à essa variável nos corações analisados de animais PHOXKO_15dpi ($395,4 \pm 30,9$ bpm, $n=5$) quando comparado aos controles WT ($159,4 \pm 33,6$ bpm, $n=7$) e PHOXKO ($255,5 \pm 11,1$ bpm, $n=4$) e também em relação ao grupo WT_15dpi ($281,9 \pm 33,2$ bpm, $n=4$). Apesar disso, os animais WT_15dpi apresentaram FC intrínseca aumentada em relação aos controles, WT e PHOXKO, que não diferem entre si.

Finalmente, a pressão de perfusão do coração (figura 18D) foi estatisticamente maior nos animais PHOXKO_15dpi ($47,5 \pm 5,9$ mmHg, $n=5$) e PHOXKO ($56,6 \pm 4,6$ mmHg, $n=4$) quando comparadas aos animais WT ($26,7 \pm 5,1$ mmHg, $n=7$), não sendo estatisticamente diferentes dos animais WT_15dpi ($36,7 \pm 3,4$ mmHg, $n=4$). É possível observar uma pequena redução desse parâmetro em função da infecção nos animais PHOXKO_15dpi em relação ao controle, ainda que essa redução não tenha sido representativa para o nível de significância adotado.

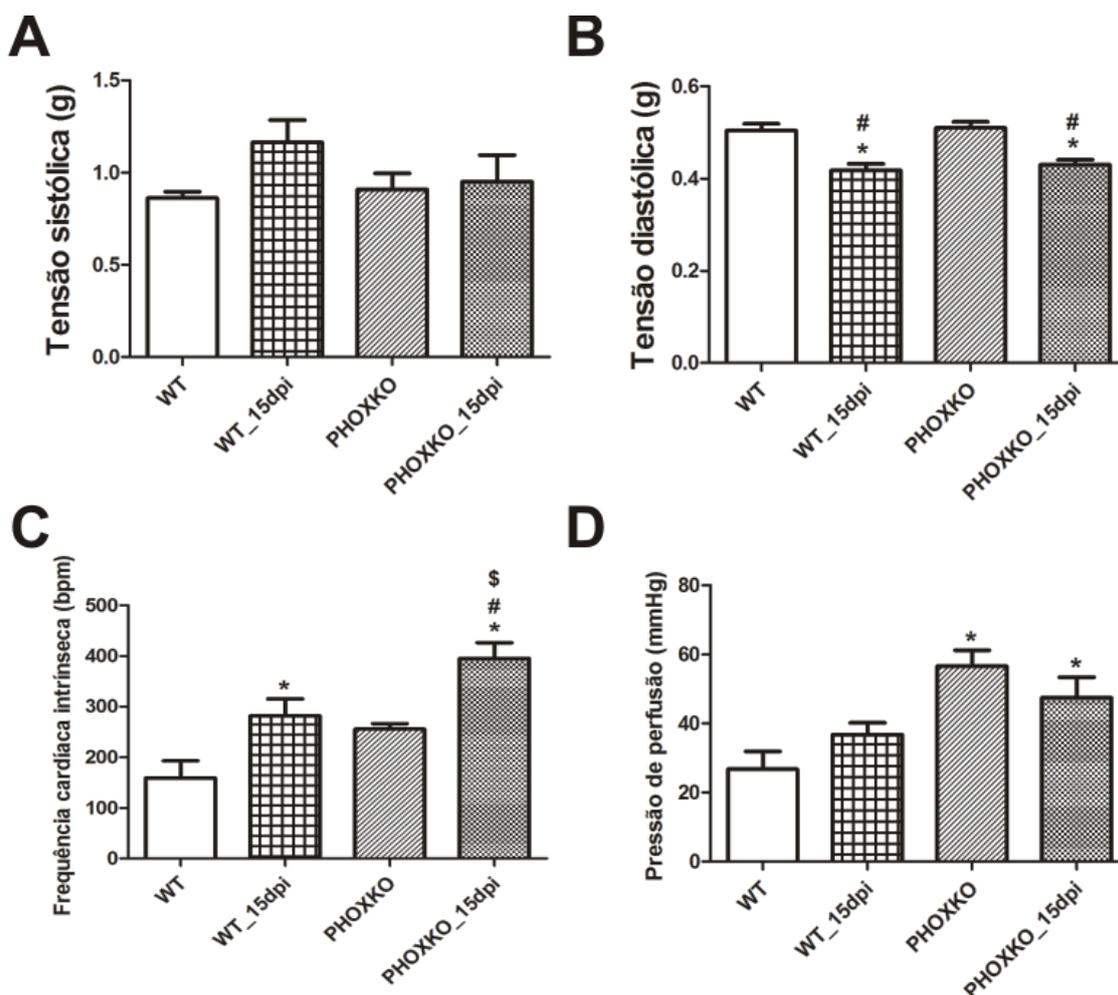


Figura 18: Relação da produção de ROS e NO na função cardíaca de camundongos durante a fase aguda da Doença de Chagas. *Plot* da média da Tensão sistólica (A), tensão diastólica (B), Frequência cardíaca intrínseca do coração (C) e pressão de perfusão coronariana (D), obtidos pela técnica de coração isolado, para os diferentes grupos experimentais * comparação entre os grupos em relação ao WT; # comparação entre grupos em relação ao PHOXKO; \$ comparação entre WT_15dpi e PHOXKO_15dpi. $p < 0,05$, *One-way ANOVA*.

5.7- Envolvimento de ROS e NO na geração e propagação de arritmias cardíacas durante a fase aguda da Doença de Chagas

Um dos sinais clínicos mais importantes durante o desenvolvimento da Doença de Chagas são as arritmias cardíacas. Os resultados referentes às arritmias mostraram que há um aumento significativo dos eventos arrítmicos nos animais PHOXKO_15dpi em relação aos demais grupos experimentais WT, PHOXKO e WT_15dpi. Além disso, houve um aumento significativo entre WT_15dpi e os controles WT e PHOXKO (figura

19B): WT: $3,0 \pm 2,3$, n=8; PHOXKO: $2,1 \pm 0,7$, n=7; PHOXKO_15dpi: $31,5 \pm 7,8$, n=7 e WT_15dpi: $17,5 \pm 3,6$, n=8 números de eventos arrítmicos/10 min.

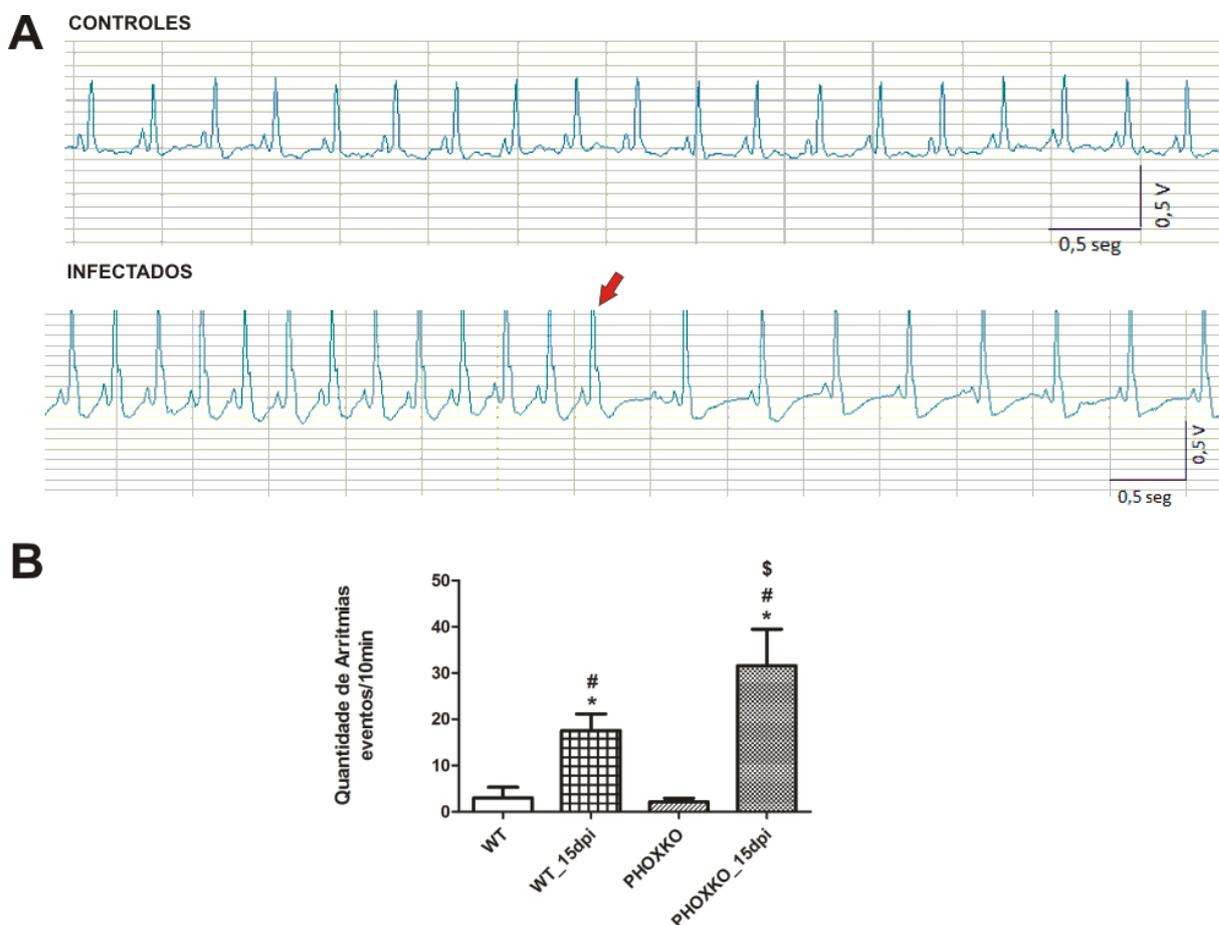


Figura19: Papel de ROS e NO na geração de arritmias cardíacas durante a fase aguda da Doença de Chagas. (A) Registros representativos do ECG de animais não infectados (painel superior, no caso de uma célula de um camundongo WT), e um ECG típico de animais infectados (painel inferior, célula de animal PHOXKO_15dpi) evidenciando o final de uma taquicardia ventricular (seta vermelha), comumente observadas nesse grupo. (B) Gráfico que sumariza a quantidade de eventos arrítmicos por unidade de tempo, observados nos diferentes grupos experimentais. * comparação entre os grupos em relação ao WT; # comparação entre grupos em relação ao PHOXKO \$ comparação entre WT_15dpi e PHOXKO_15dpi. $p < 0,05$, *One-way ANOVA*.

6- DISCUSSÃO

A Doença de Chagas é uma patologia de extrema relevância em regiões endêmicas dos vetores da doença. Atualmente, estima-se que esta zoonose acometa aproximadamente 6-10 milhões de pessoas no mundo (OMS factsheets, 2014; Strasen et al, 2014), a maioria na América latina, onde constitui uma das principais causas responsáveis pelos casos de insuficiência cardíaca (Bocchi et al, 2013; Strasen et al, 2014), e é considerada uma das patologias mais onerosas dentre as chamadas doenças tropicais negligenciadas (Nunes et al, 2013). A sintomatologia da doença de Chagas é tipicamente dividida em duas fases, aguda e crônica. Em ambas as fases é possível observar um intenso processo inflamatório associado à infecção pelo *T. cruzi*. Associado a esse processo inflamatório, por sua vez, observa-se a produção acentuada de ROS e NO, advindas de efeitos colaterais de reações biológicas alteradas pela infecção, ou como estratégia de combate ao parasita. Essas moléculas reativas já foram extensivamente associadas à habilidade de modular direta ou indiretamente a atividade de canais iônicos, proteínas contráteis e proteínas envolvidas no manejo intracelular de cálcio (Wu et al, 2012; Nerbonne, 2011; Rozanski & Xu, 2002; Hare, 2003; Prosser et al, 2011; Aggarwal & Makielski, 2013; dentre outros), podendo assim, constituir um importante fator da disfunção do sistema cardiovascular, dependendo da extensão de sua produção e os tipos de moléculas envolvidas.

Diversos estudos demonstraram alterações nas propriedades elétricas dos cardiomiócitos associadas à Doença de Chagas. Em nosso modelo observamos que a infecção aguda com *T. cruzi* da cepa Y foi capaz de promover aumento na duração do PA cardíaco quando comparado ao PA proveniente de animais controle. De fato, outros trabalhos mostraram esse mesmo perfil de prolongamento do PA utilizando diferentes cepas de parasitas e em diferentes fases da doença (Roman campos et al, 2013; Roman campos et al, 2013b). Dentre os dois grupos de camundongos infectados, esse prolongamento do potencial foi significativo apenas em animais WT_15dpi, em oposição aos PAs obtidos das células de animais PHOXKO15_dpi, que tiveram a fase de repolarização semelhante aos controles (WT e PHOXKO). Esses resultados sugerem que a produção de espécies reativas pela via da NOX2 é de grande importância no remodelamento elétrico dos cardiomiócitos durante a infecção aguda por *T. cruzi*, de modo que a inibição dessa via de produção de ROS previne o prolongamento do PA nos animais infectados. É importante ressaltar que o modelo de camundongos gp91phox^{-/-} é

incapaz de produzir ROS através do complexo da NOX2, que é uma das fontes principais dessas moléculas durante a infecção (Mandelker, 2008). Todavia, outras fontes de ROS ainda podem estar presentes nesses animais, incluindo, por exemplo, a atividade constitutiva da NOX4, o vazamento de elétrons da cadeia respiratória na mitocôndria ou a atividade da xantina oxidase. Entretanto, como mencionado anteriormente, a modulação de funções celulares aparentemente não depende apenas da presença de ROS, mas também de sua quantidade e qualidade, além do tempo de exposição. Além disso, ainda devem-se considerar as fontes que promovem a extinção de ROS no citoplasma, como os sistemas enzimáticos antioxidantes, vitaminas, carotenos, etc. (Aggarwal & Makielski, 2011). Dessa forma, ainda que esses animais produzam uma pequena quantidade de ROS, de forma semelhante aos animais não infectados, essas moléculas não são capazes de desencadear um remodelamento elétrico dos cardiomiócitos observado nos animais WT_15dpi.

Os resultados discutidos acima se referem à análise do PA cardíaco utilizando o quelante de cálcio EGTA. Essa manobra experimental possibilitou avaliar os efeitos de ROS no PA durante a infecção por *T. Cruzi* de forma independente da liberação de cálcio do SR induzida pelo cálcio que entra via I_{Ca-L} . A partir desses resultados, com o objetivo de entender melhor as bases eletrofisiológicas envolvidas no prolongamento da fase de repolarização do PA, resolveu-se analisar as correntes de potássio e cálcio nos cardiomiócitos isolados, dois componentes intimamente relacionados a fase de repolarização.

De maneira coerente ao observado para o PA, os animais WT_15dpi apresentaram uma redução no pico das correntes de potássio de saída quando comparados aos animais WT ou PHOXKO. Essa redução das correntes de potássio é um forte argumento que justifica o retardo observado na repolarização, uma vez que a abertura dos canais para potássio, nas condições do gradiente eletroquímico imposto às células durante o experimento, levaria à saída de cargas positivas do meio intracelular para o extracelular, e com isso, guiando o processo da repolarização. Já os camundongos PHOXKO_15dpi não apresentaram tal redução, sugerindo um papel importante da oxidação desses canais por ROS. De fato, já foi demonstrado uma redução da I_{to} em miócitos ventriculares de ratos em função da oxidação de radicais sulfidril, presentes na subunidade α e/ou subunidades acessórias do canal, em sua porção citoplasmática (Rozanski & Xu, 2002), mostrando que a oxidação desse tipo de canal é capaz de provocar redução da densidade da corrente. Além disso, outros

trabalhos mostraram a capacidade de calmodulina cinase II (CAMKII), a qual é sensível ao balanço redox das células (Erickson et al, 2011), em modular I_{to} (Nerbonne, 2011; Niwa & Nerbonne, 2010; Patel & Campbell, 2005). É importante deixar claro que o pico das correntes de potássio é uma composição de diversos fenótipos de correntes associados a entidades moleculares diferentes, mas no caso dos cardiomiócitos ventriculares de camundongos, os componentes majoritários do pico da corrente estão associados às correntes I_{to} (Xu et al, 1999).

Apesar dessa redução observada na densidade das correntes de potássio de saída, esse fenômeno não pode ser atribuído a mudanças na dependência de voltagem para a ativação desses canais, a qual permaneceu inalterada em todos os grupos. Um fato interessante é que apenas nos animais PHOXHO_15dpi foi observado um aumento em I_{K1} , componente importante na nas fases finais da repolarização e no controle do potencial de repouso das células (Nerbonne & Kass, 2005). Apesar desse aumento em I_{K1} , não foi possível observar diferença no potencial de repouso nesses animais PHOXKO_15dpi, tampouco encurtamento da fase de repolarização.

Outro componente intimamente relacionado com a repolarização dos cardiomiócitos é a I_{Ca-L} . A corrente de cálcio é um empecilho à repolarização, e um aumento significativo dessa corrente pode promover um retardo nesse processo. Em nossos experimentos observamos que os animais WT_15dpi apresentaram redução em I_{Ca-L} quando comparados aos controles, WT e PHOXKO, os quais não diferem entre si. Dessa forma, esse componente não está associado ao retardo na repolarização observado nesse grupo de animais. Essa redução nas correntes de cálcio pode desempenhar um papel importante para a redução da contratilidade celular observada nesses animais, como será discutido mais a frente, uma vez que o cálcio proveniente desses canais é responsável por engatilhar a liberação dos estoques de cálcio do SR, principal envolvido na contração celular. Esse evento de liberação de cálcio induzida pelo cálcio é dependente da concentração desse íon, que pode ser significativamente alterada pela redução da corrente de cálcio tipo-L, uma vez que esse sistema possui uma separação espacial (espaço diádico) muito diminuta.

Os animais PHOXKO_15dpi não apresentaram redução de I_{Ca-L} quando comparado aos grupos controles. De fato, diversos trabalhos mostram a capacidade de ROS em reduzir I_{Ca-L} nos cardiomiócitos (Lacampagne et al, 1995; Favero et al, 1995; Gill et al, 1995). Dessa forma, podemos concluir que a inibição da produção de ROS via NOX2 previne o remodelamento elétrico do PA cardíaco observado nos animais

WT_15dpi, e assim, poderia prevenir a geração e propagação de arritmias cardíacas, por manter a função elétrica dos cardiomiócitos intacta. Entretanto como demonstrado por (Santiago et al, 2012), os camundongos PHOXKO possuem altíssima mortalidade quando infectados por *T. cruzi*, ainda que a curva de parasitemia seja semelhante aos de animais WT infectados. Essa mortalidade foi associada à superprodução de NO, o qual, não sendo tamponado pelo ânion superóxido para geração de peroxinitrito (eficaz no controle da parasitemia), atuava no sistema vascular, promovendo redução da resistência vascular periférica, desencadeando a queda brusca da pressão com conseguinte colapso do sistema circulatório (Santiago et al, 2012). Apesar dessa sugestão, o tratamento dos animais com o inibidor específico de iNOS foi capaz de reverter a queda na pressão arterial, mas não reverteu a alta mortalidade observada nos animais PHOXKO infectados. Dessa forma, outros fatores devem contribuir para esse fenômeno. Um dos sinais clínicos tipicamente associados à doença em humanos é a morte súbita, muitas vezes o primeiro e único sinal identificado no paciente. Esse fenômeno se manifesta por eventos de arritmias severas, incluindo taquicardias ventriculares ou fibrilação ventricular (Fishman et al, 2010). Considerando essas informações e a alta mortalidade dos animais PHOXKO15_dpi, nós hipotetizamos que a causa provável da mortalidade nesses animais era a geração e propagação de arritmias severas. Essas arritmias em geral estão também associadas ao remodelamento elétrico dos cardiomiócitos.

Um componente importante que interfere na excitabilidade da célula cardíaca (bem como na contratilidade) é a dinâmica do cálcio intracelular. Dessa forma voltemos nossa atenção para o PA cardíaco, dessa vez sem a utilização de EGTA, e com isso, possibilitando estudar a influência do manejo intracelular de cálcio nas propriedades elétricas dos cardiomiócitos. Utilizando esse delineamento experimental foi possível observar um prolongamento da fase de repolarização do PA muito grande nos animais PHOXKO_15dpi quando comparados aos controles, WT e PHOXKO. De maneira contrária o grupo WT_15dpi não apresentou diferença significativa nesse parâmetro quando comparado aos controles, apesar de ser observado um ligeiro prolongamento, o qual provavelmente está associado com a já discutida redução das correntes de potássio de saída. Uma possibilidade para o prolongamento observado principalmente nas fases finais do PA quando da ausência do quelante de cálcio, é a sobreposição da repolarização do PA com os processos de drenagem do íon do citoplasma. Um componente desse sistema é o trocador sódio cálcio (NCX, do inglês, *sodium calcium*

exchanger), que em seu funcionamento normal, faz o transporte de 3 íons sódio para o interior do citoplasma concomitante ao transporte de 1 íon cálcio para o meio extracelular. Essa proteína transportadora funciona a todo o momento, mas sua atividade é mais significativa após a liberação dos estoques de cálcio do SR, quando a concentração desse íon aumenta muito no meio intracelular, favorecendo seu funcionamento nesse sentido (Bers, 2005). Esse fenômeno é de extrema importância na manutenção da quantidade de cálcio estocada no SR, uma vez que contrabalança a entrada de Ca^{2+} pela corrente de cálcio tipo-L, e com isso, regulando de forma precisa a liberação de cálcio e os eventos contráteis da célula em condição fisiológica (Dibb et al, 2007). É importante observar que o transporte arquitetado pelo NCX é eletrogênico, e quando funcionando nesse sentido, bombeando 1 íon cálcio para o meio extracelular a cada 3 íons sódio para o meio intracelular, gera uma corrente despolarizante, determinando uma barreira à repolarização e por esse motivo promovendo o prolongamento do PA.

A partir dessas ideias, nós hipotetizamos que o prolongamento do PA observado nos animais PHOXKO_15dpi está relacionado à alteração no manejo citoplasmático de cálcio, o que reflete alteração no funcionamento do NCX (e possivelmente outros componentes envolvidos no PA). Dados corroborando essa hipótese serão discutidos mais a frente, juntamente com a medida dos transientes de cálcio pela microscopia confocal.

Em relação aos animais WT_15dpi, não foi observado prolongamento significativo do PA quando comparado aos controles WT e PHOXKO, utilizando o protocolo sem EGTA, apesar de ser observado um ligeiro prolongamento, o qual provavelmente está associado a redução das correntes de potássio de saída. Nesses experimentos, entretanto, a contribuição da redução das correntes de potássio no prolongamento do PA aparentemente encontra-se mascarada pela contribuição da dinâmica intracelular do cálcio na excitabilidade da célula cardíaca. Esse dado é intrigante, uma vez que alguns estudos, incluindo esse próprio, demonstram o prolongamento do PA utilizando o protocolo com EGTA. Além disso, já foi relatado prolongamento da onda T no ECG em animais infectados, sugerindo atraso na repolarização ventricular (Roman-Campos et al, 2013). Entretanto, esse prolongamento do PA ventricular, pelo menos na fase aguda da Doença de Chagas utilizando a cepa Y, não foi significativo comparado aos controles, quando se leva em consideração a influência da dinâmica de cálcio na forma da onda do PA.

Ainda em relação ao PA, já foi descrito que a alternância de sua duração é um diagnóstico precursor de arritmias severas, incluindo taquicardia e fibrilação ventricular (Bers, 2005). Em nosso modelo podemos observar uma grande alternância na duração do PA nos animais PHOXKO_15dpi, medido por meio da análise da média dos desvios padrão obtidos para uma sequência de 30 PAs analisados para cada célula. Quanto maior o desvio associado à média desses 30 PAs, maior a alternância da duração. Essa alternância não foi observada nos animais WT, PHOXKO e WT_15dpi, nos quais uma vez estabilizado o PA após a diálise do meio intracelular pela solução de pipeta, (ver métodos), sua duração flutuava muito pouco em relação à média. Esse resultado sugere fortemente um maior potencial para a geração de arritmias severas nos animais PHOXKO_15dpi, o que poderia explicar a alta mortalidade observada nesses animais.

É importante ressaltar que a alternância na duração do PA observada nos animais PHOXKO_15dpi foi parcialmente revertida pela incubação prévia das células com L-NAME. Esse fato sugere que o excesso de NO em relação as ROS é um fator importante na determinação dessa alternância. Entretanto, mesmo reduzindo de forma significativa a alternância do PA em relação ao grupo PHOXKO_15dpi, esse fenômeno ainda é significativamente maior quando comparado aos controles, sugerindo que outros fatores que não a modulação direta pelo NO podem estar envolvidos, incluindo alterações provocadas pelo próprio NO de efeito mais lento, como a ativação de vias biossintéticas que levam à alteração da atividade dos componentes envolvidos na dinâmica de cálcio.

Por fim, é importante ressaltar que outros parâmetros do PA como máxima taxa de despolarização, taxa máxima de repolarização, potencial de repouso, tempo para se atingir 50% da repolarização e amplitude do PA sofreram alterações muito pontuais ou não significativas estatisticamente pela infecção aguda por *T. cruzi* da cepa Y, tanto em animais WT_15dpi quanto PHOXKO_15dpi. Um fato interessante foi a ligeira redução na taxa máxima de repolarização do PA nos cardiomiócitos obtidos de animais WT_15dpi em relação aos controles, WT e PHOXKO. Ainda, que essa redução não tenha sido estatisticamente significativa para o nível de significância adotado, esse fato está possivelmente associado com a redução do pico das correntes de potássio de saída nessas células, uma vez que constituem o principal mecanismo envolvido nas fases iniciais mais rápidas da repolarização, como já discutido acima.

Como mencionado anteriormente, a dinâmica intracelular do cálcio tem bastante influência tanto nas propriedades elétricas quanto mecânicas da célula cardíaca,

constituindo a base do acoplamento excitação/contração. Quando medimos o transiente citoplasmático de cálcio, podemos constatar uma redução significativa desse transiente nos animais PHOXKO_15dpi em relação aos controles, WT e PHOXKO, enquanto os animais WT_15dpi apresentaram uma leve redução no transiente, porém não significativo em relação aos controles. Esses resultados a primeira vista, parecem contraditórios aos observados nas correntes de cálcio tipo-L, em que se foi observado uma redução da densidade dessas correntes nos animais WT15_dpi, enquanto que nos animais PHOXKO_15dpi ela permaneceu inalterada. O principal mecanismo envolvido na ativação dos RyR é a ativação desses canais para cálcio contidos na membrana, os quais estão localizados preferencialmente no sistema de túbulos T, assumindo uma co-localização com o complexo de membranas do SR (Bers, 2001). Essa associação entre os canais tipo-L e o SR permite uma liberação sincronizada do cálcio, importante para a manutenção do processo de contração da célula (Kelly et al, 1996; Brutsaert, 2003; Bers, 2001). De fato, outros trabalhos do nosso grupo já demonstraram uma assincronia da liberação de cálcio ocasionada pela infecção por *T. cruzi*, o que poderia contribuir para a redução observada na contratilidade celular (Roman-campos et al, 2013). A ativação dos RyR com consequente geração do transiente de cálcio será tão maior quanto maior a concentração de cálcio disponível na região da fenda diádica, a qual é determinada pela integração da corrente de cálcio tipo-L. Dessa forma, seria razoável admitir que uma maior densidade da corrente de cálcio tipo-L estaria relacionada com uma maior amplitude do transiente de cálcio.

Outros fatores, entretanto, podem influenciar na dinâmica intracelular de cálcio, e com isso alterá-lo significativamente. Diversos estudos apontam como efeito da presença do NO o aumento na probabilidade de abertura dos RyRs. Esse aumento pode ocorrer diretamente através de reação de nitrosilação em grupos nucleofílicos presentes nesses canais iônicos (Massion & Balligand, 2003; Kojda et al, 1996) ou pela fosforilação induzida pela produção de cGMP e consequente ativação de PKG. No coração normal, a quantidade de cálcio que entra (principalmente via I_{Ca-L}) deve se igualar à quantidade de cálcio que é mandada para fora da célula (principalmente através da atividade do NCX). Entretanto, se a probabilidade de abertura dos RyR aumentar durante o período diastólico, pode haver um vazamento diastólico de cálcio do SR (Lim et al, 2008). Assumindo que a atividade do NCX não esteja diminuída, esse processo pode progressivamente reduzir o conteúdo de cálcio do retículo pelo desbalanço na quantidade de cálcio que entra e sai da célula a cada ciclo de contração,

levando à redução do transiente de cálcio quando a célula atingir um novo estado estacionário por ambos os motivos, aumento na concentração diastólica de cálcio e redução da carga de cálcio do SR. Por fim, o aumento na concentração diastólica de cálcio ainda pode contribuir para a inativação do canal de cálcio dependente de cálcio, e com isso, reduzir a quantidade de íons que efetivamente permeiam o canal, dessa forma contribuindo para a redução transiente de cálcio, evento que não é possível ser visualizado utilizando EGTA na solução de pipeta.

Corroborando ainda mais com esse mecanismo proposto, a probabilidade de abertura dos RyR via nitrosilação dos resíduos tiol nesses canais apresenta dependência de concentração, observados pelo aumento progressivo na probabilidade de abertura em resposta à nitrosilação de até 12 resíduos nesses canais (Xu et al, 1998). O mesmo trabalho ainda demonstrou que a oxidação de sete ou mais resíduos induz a abertura irreversível dos receptores, contribuindo ainda mais para o vazamento do cálcio nos cardiomiócitos. Esse mecanismo pode explicar a redução do transiente de cálcio associada aos animais PHOXKO_15dpi, nos quais, de fato, já foi demonstrado uma superprodução de NO (Santiago et al, 2012). De maneira coerente, Roman-Campos et al., (2013) demonstrou aumento no nível de mRNA e/ou de proteína das três isoformas de NOS no tecido cardíaco durante a infecção por *T. cruzi*. Entretanto, a incubação prévia das células com L-NAME não foi capaz de reverter a amplitude do transiente de cálcio, o que sugere um mecanismo duradouro e/ou irreversível de modificação do NO (dada a natureza estável da oxidação dos resíduos tiol, uma ligação covalente), ou outros mecanismos envolvidos.

No mesmo trabalho Roman-Campos et al., (2013) descreve uma relação complexa entre a amplitude do transiente e a infecção, sendo que na fase aguda não foi observado alteração no transiente, enquanto na fase crônica inicial, a amplitude do transiente encontra-se aumentada. Dois achados interessantes demonstram superexpressão da NCX (Hasenfuss et al, 1999) durante a infecção por *T. cruzi*, contribuiria, no processo descrito acima, para a redução do transiente de cálcio. Outros trabalhos também demonstram a capacidade de ROS em aumentar os níveis desse transportador (Iwamoto et al, 1996; Hilgemann et al, 1991). Apesar disso, ROS foi demonstrado como capaz de induzir o aumento na concentração intracelular de Na^+ pelo aparecimento da corrente tardia de sódio (Wagner et al, 2013; Kassmann et al, 2008), fator que reduz a eficiência da troca no sentido normal e favorecendo o sentido reverso do funcionamento do trocador, o que poderia contribuir para os resultados observados

nesse trabalho para os animais WT_15dpi na modulação da amplitude do transiente de cálcio.

De maneira geral, esses dados sugerem que a modulação da dinâmica de cálcio depende não apenas do aumento na produção de ROS ou NO, mas sim da proporção entre essas moléculas, a quantidade e o tempo de exposição, fatores que podem variar dependendo da cepa utilizada, parasitemia e resposta imune do hospedeiro.

Outro componente importante para o manejo do cálcio no cardiomiócito é a recaptação desses íons para o SR após o evento de contração celular. Esse fenômeno é importante tanto para a manutenção dos níveis apropriados de Ca^{2+} no retículo quanto para possibilitar o processo de relaxamento (Bers, 2001). A recaptação do cálcio para o SR é realizada basicamente pela SERCA, e uma forma de se medir indiretamente sua atividade é através da taxa de decaimento do transiente, uma vez que sua participação nesse processo é majoritária. Em nosso modelo, não foi possível observar alteração da taxa de decaimento do transiente em nenhum dos grupos estudados, demonstrando que pelo menos na fase aguda da Doença de Chagas, não ocorre alteração da função dessa proteína. Apesar disso, Roman-Campos et al, (2012) demonstrou efeitos opostos de redução e aumento na atividade da SERCA, nas fases aguda e crônica da Doença de Chagas, utilizando a cepa colombiana de *T. cruzi*. Além disso, ROS já foi mostrado como capaz de modular (diminuindo) a atividade da SERCA.

A partir dos resultados encontrados para os efeitos de ROS e NO nas propriedades elétricas dos cardiomiócitos e no manejo intracelular de cálcio durante a infecção, resolvemos então avaliar como essas moléculas participam na modulação da função contrátil. Foi observado uma redução na fração de encurtamento dos cardiomiócitos provenientes dos animais infectados, WT_15dpi e PHOXKO_15dpi, em relação aos controles. Considerando os camundongos PHOXKO_15dpi, essa redução na fração de encurtamento está coerente com a grande redução observada no transiente de cálcio, o que sugere uma menor concentração relativa de cálcio durante a sístole celular em relação à concentração na diástole, principalmente associado à uma maior concentração diastólica de cálcio esperada nessas células, como já discutido. De forma interessante, essa redução também é observada nos animais WT_15dpi, com magnitude semelhante aos controles, apesar do transiente de cálcio nesse grupo sofrer apenas uma leve redução, não significativa para o nível de significância adotado. Entretanto, outros fatores podem contribuir para a redução da fração de encurtamento da célula, observado nesse e em outros trabalhos para a fase aguda da doença (Roman-Campos et al, 2009).

Outro trabalho de nosso grupo relatou aumento na assincronia da liberação de cálcio pelo SR como efeito da infecção aguda por *T. cruzi*. Nos cardiomiócitos normais, o sistema de túbulos T forma uma rede de invaginações transversais que se aproximam espacialmente do sistema de membranas do SR, aproximando os canais de cálcio tipo L (LTCC, do inglês *L-type calcium channel*) preferencialmente localizados nessa região dos RyRs pela formação das díades (Soeller & Cannell, 1999; Gaur & Rudy, 2011), o que garante uma liberação praticamente sincrônica de cálcio induzida pela I_{Ca-L} ativada durante o PA (Cheng et al, 1994). Alterações na quantidade dos componentes envolvidos no evento de CICR, como número de LTCC, RyRs, e proteínas regulatórias como triadina, e junctofilina-2 podem influenciar significativamente o acoplamento excitação contração e as propriedades contráteis da célula como um todo (Gaur & Rudy, 2011). Como exemplo existe relatos de que durante a insuficiência cardíaca, bastante associada ao estresse oxidativo, o remodelamento do coração leva ao desarranjo dos túbulos-T nas díades (Song et al, 2006). A alteração nas propriedades estruturais e funcionais da díade já foi associada à assincronia na liberação de cálcio (Gaur & Rudy, 2011), o que constitui um substrato para a redução da contratilidade celular observada, (ainda que a liberação assincrônica do cálcio induza um transiente de cálcio inalterado ou levemente diminuído). É importante ressaltar que a incubação prévia com L-NAME restaurou a fração de encurtamento nos animais WT_15dpi, mas não nos PHOXKO_15dpi. Esse dado sugere que a redução observada na fração de encurtamento é dependente da concentração de NO de uma maneira complexa, de modo que em concentrações mais elevadas (como é esperado nos animais PHOXKO_15dpi), possam ocorrer modificações duradouras em componentes envolvidos na liberação de cálcio e/ou miofilamentos, de modo que a inibição aguda das isoformas de NOS não seja suficiente para reverter esse quadro.

Além da fração de encurtamento, a cinética de contração e relaxamento também foram analisadas. Em relação ao tempo necessário para se atingir o pico da contração, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Apesar disso, o processo de relaxamento celular é bastante modificado durante a fase aguda da Doença de Chagas: foi observado em ambos os grupos, WT_15dpi e PHOXKO_15dpi uma redução na taxa máxima de relaxamento celular. Como discutido acima, esse fator corrobora ainda mais com um possível aumento na assincronia da liberação do cálcio do SR, o que atrasaria as fases iniciais mais rápidas do relaxamento, reduzindo assim, esse parâmetro. Não obstante, o L-NAME não foi capaz de restaurar a taxa máxima de

relaxamento nas células dos animais PHOXKO15_dpi, ainda que tenha sido eficaz para o grupo WT_15dpi, o que sugere novamente a participação do NO de forma dependente de concentração na modulação desse parâmetro.

Em relação ao tempo para que se ocorra 90% do relaxamento, foi observado uma aceleração nos animais PHOXKO em relação aos WT, o qual é revertido pela incubação prévia dessas células com L-NAME. Esse fator pode ser associado a uma maior disponibilidade de NO nesses animais, mesmo em condição basal pela ausência da produção de ROS pela NOX2, o que confere um efeito lusitrópico positivo em função da redução da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio advinda da fosforilação de TnI pela PKG, ativada pelo aumento na concentração de cGMP induzida por NO (Bers, 2001). Esse efeito lusitrópico positivo não foi pronunciado nos animais PHOXKO_15dpi, quando é esperado um aumento muito grande na concentração de NO. Esses resultados sugerem que o efeito lusitrópico positivo induzido pelo mecanismo acima não apresenta dependência de concentração tão pronunciada como outros sistemas descritos, por exemplo, a nitrosilação direta dos RyRs pelo NO como discutido nesse trabalho. Além disso, o efeito lusitrópico foi revertido nos animais PHOXKO_15dpi pela incubação com L-NAME. Em conjunto esses argumentos apontam para a hipótese da participação do NO nesse processo, de maneira reversível e com baixa dependência de concentração.

Finalmente, nos cardiomiócitos PHOXKO_15dpi, foi observada uma taxa muito elevada de eventos de contração arrítmicos, independentes da estimulação de campo. Essas arritmias se correlacionam muito bem com as alterações observadas pelo prolongamento no PA, com consequente aumento na taxa de eventos de pós-despolarização precoce e tardia, bem como da alternância do PA, e demonstram que as alterações na excitabilidade celular em nosso modelo podem desencadear disfunções contráteis dos cardiomiócitos. Ainda, esse aumento na taxa de arritmias foi abolido pela incubação prévia com L-NAME, evidenciando o papel da concentração de NO nesse processo, como discutido anteriormente para a excitabilidade e manejo intracelular do cálcio.

Conforme já mencionado, os animais PHOXKO15_dpi apresentaram propensão à arritmias. A partir desses resultados, resolvemos realizar um eletrocardiograma para avaliar se essa propensão a arritmias observada a nível celular realmente acomete o coração de forma significativa. Os animais PHOXKO_15dpi apresentaram uma taxa de arritmias muito grande comparado tanto aos grupos controle WT e PHOXKO, quanto

quando comparados ao grupo WT_15dpi, ainda que os animais WT_15dpi apresentem maior proporção dessas arritmias quando comparado aos controles. Esses resultados corroboram nossa hipótese anterior de que os camundongos PHOXKO infectados morrem em função do desenvolvimento de arritmias severas. É importante ressaltar que a propensão às arritmias observadas a nível celular provavelmente subestimam a propensão real do desencadeamento das arritmias cardíacas, pois excluem fatores relacionados ao remodelamento anatômico e funcional do tecido muscular cardíaco e do sistema de condução elétrica. De fato, o aumento de fibrose no tecido cardíaco (Roman-Campos et al, 2012) pode ser relevante, por exemplo, no estabelecimento de fenômenos de reentrada cardíaca. Além disso, de Carvalho et al, 1992 mostrou alteração na distribuição das junções *gap* (principal componente responsável pela comunicação elétrica célula a célula) em células infectadas com *T. cruzi*, o que poderia contribuir para a geração de arritmias e distúrbios de condução.

Uma observação interessante publicada por Santiago et al, (2012) é a de que o tratamento com o inibidor específico da iNOS não provocou melhora na mortalidade dos camundongos PHOXKO infectados. Entretanto, como discutido anteriormente, existem evidências de que não apenas a iNOS, mas todas as isoformas de NOS tem seus níveis aumentados durante a infecção por *T. cruzi*. Dessa forma, ainda que a iNOS tenha sido inibida, esse fator não necessariamente confere a proteção às arritmias observadas nesses animais. Em concordância com essa assertiva, a localização das NOS no citoplasma é um importante fator determinante do destino do NO, uma vez que essa molécula é extremamente reativa, não sendo capaz de se difundir por longas distâncias até encontrar um alvo (Massion et al, 2013). Apesar disso, outros trabalhos demonstram uma melhora, em um modelo canino de insuficiência cardíaca (Chen et al, 2002), após a inibição de iNOS. Essas evidências em conjunto sugerem a participação diferencial e complementar das diferentes isoformas de NOS na geração e propagação das arritmias cardíacas, bem como na função contrátil do coração.

Durante os ensaios de contratilidade celular, podemos constatar uma redução na fração de encurtamento dos cardiomiócitos isolados de camundongos PHOXKO_15dpi quando comparados aos controles, bem como uma aceleração da taxa de relaxamento (efeito lusitropico positivo). Dessa forma, buscamos avaliar se as alterações mecânicas observadas a nível celular refletiam alteração na função cardíaca no órgão como um todo, utilizando a técnica de coração isolado montado em um sistema de Langendorff de fluxo constante. De forma surpreendente, não foram encontradas diferenças

significativas na pressão sistólica em nenhum dos grupos estudados, ainda que uma redução na contratilidade celular tenha sido observada dentre os animais infectados. Entretanto, uma possível explicação para esse fenômeno é o aumento da frequência cardíaca intrínseca do coração observada nos animais PHOXKO_15dpi em relação aos controles e nos animais WT_15dpi em relação aos animais WT. Esse aumento na frequência pode refletir no aumento da força de contração independente do mecanismo de Frank-Starling, conhecido como relação força-frequência (FFR, do inglês, *force-frequency relationship*) e dessa forma, camuflar a redução na contratilidade celular observada.

Esse aumento na força de contração pode estar associado principalmente a 4 mecanismos: aumento de I_{Ca-L} , com consequente aumento da concentração de cálcio diastólico (em função do aumento de cálcio via I_{Ca-L} e tempo reduzido entre os ciclos de contração para extrusão do cálcio do citoplasma), concomitante ao aumento no conteúdo de cálcio do SR (devido ao aumento na concentração diastólica de cálcio e em função do aumento na taxa de recaptção do cálcio pela SERCA aparentemente associado à fosforilação do fosfolambam pela CAMKII) e por fim, o acúmulo de sódio intracelular, o qual desvia a atividade do NCX para seu sentido reverso, minorando ainda mais a extrusão do cálcio (Wu et al, 2012; Bers, 2001). Muitos estudos apontam uma FFR negativa em ratos e camundongos, entretanto, a clássica FFR positiva já foi demonstrada e revisada para ambos os modelos (Bers, 2001; Wu Y1,2012).

Por outro lado, a tensão diastólica nos animais PHOXKO_15dpi e WT_15dpi foi significativamente menor em relação aos controles. À primeira vista esses resultados podem parecer contraditórios, uma vez que os dados do transiente de cálcio e contratilidade celular, associado à superprodução de NO apontam, em conjunto, para um aumento na concentração diastólica de cálcio nesses animais. Entretanto, essa redução na tensão diastólica pode estar associada a outro efeito classicamente associado ao NO: a ativação da PKG via aumento na produção de cGMP. A ativação dessa via já foi extensivamente associada à redução da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (Lim et al, 2008; Massion et al, 2013). Dessa forma, ainda que a concentração de cálcio diastólica seja elevada nesses animais, a redução na sensibilidade a esse íon poderia mais que compensar o aumento em sua concentração. É interessante lembrar que mesmo os animais WT_15dpi poderiam ter a redução na pressão diastólica dependente desse mecanismo, uma vez que, como mencionado anteriormente, a expressão de todas

as isoformas de NOS podem estar aumentadas durante a doença (Roman-Campos et al, 2012), contribuindo para o aumento na concentração de NO e ativação dessa via.

Um achado interessante foi quanto à pressão de perfusão entre os grupos. Foi observado um aumento desse parâmetro nos animais PHOXKO em relação aos animais WT, o que sugere alteração na resistência vascular total do sistema coronariano desses animais em condições de não infecção, o que pode ocorrer pela diminuição na quantidade de vasos, no calibre e/ou aumento do tônus vascular. Entretanto, a infecção por *T. cruzi* aumentou significativamente a pressão de perfusão no grupo WT_15dpi em relação aos WT, entretanto, nos animais PHOXKO_15dpi esse aumento não foi significativo em relação aos animais PHOXKO, sugerindo que de alguma forma, o aumento na vasoconstrição associada à infecção foi contra balanceada, provavelmente pela superdisponibilidade de NO, o qual possui efeito vasodilatador bem estabelecido.

Finalmente, quando voltamos nossa atenção para os parâmetros hemodinâmicos, em concordância com trabalhos anteriores, observamos uma redução na PAM dos animais PHOXKO_15dpi em relação aos outros grupos WT, PHOXKO e WT_15dpi. Essa redução da pressão muito provavelmente está relacionada ao aumento na concentração de NO com consequente redução da resistência vascular periférica. De forma interessante, essa redução da PAM não reflete redução da FC, o que novamente aponta para uma redução da resistência vascular e/ou diminuição do volume de ejeção do coração, uma vez que a pressão arterial pode ser descrita pela multiplicação do débito cardíaco (volume de ejeção do coração X frequência cardíaca) pela resistência periférica. Nos animais WT_15dpi, entretanto, observou-se aumento na FC, o que, devido à manutenção da PAM, sugere redução da resistência periférica e/ou redução do volume de ejeção do coração durante a fase aguda da infecção por Chagas.

7- CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento desse trabalho investigamos as alterações na contratilidade, excitabilidade e manejo intracelular de cálcio dos cardiomiócitos, bem como a função elétrica e contrátil do coração como um todo durante a fase aguda da Doença de Chagas, buscando entender como tais alterações são influenciadas pela produção e balanço entre ROS e NO. De maneira geral, podemos concluir que a concentração dessas moléculas, bem como o balanço da produção entre elas estão associadas com a alteração na função de diversos componentes envolvidos na excitabilidade e contratilidade celular, bem como no acoplamento excitação contração. Essas alterações podem determinar uma predisposição ou não à arritmias cardíacas severas e disfunções contráteis, que eventualmente podem evoluir para quadros de insuficiência cardíaca, sinais clínicos comumente associados à essa doença. Dessa forma, esse trabalho provê novas perspectivas no desenvolvimento de abordagens mais específicas e precisas para o tratamento e/ou melhora na saúde dos pacientes acometidos pela Doença de Chagas.

8- REFERÊNCIAS

Adesse D, Goldenberg RC, Fortes FS, Jasmin, Iacobas DA, Iacobas S, Campos de Carvalho AC, de Narareth Meirelles M, Huang H, Soares MB, Tanowitz HB, Garzoni LR, Spray DC. Gap junctions and chagas disease. *Adv Parasitol* 2011;76:63-81.

Aggarwal NT, Makielski JC. Redox control of cardiac excitability. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(4):432-468.

Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and Immunity* 1996;64:1961-1967.

Andrade L, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology* 2005;3:819-823.

Andrade ZA, Andrade SG, Oliveira GB, Alonso DR. Histopathology of the conducting tissue of heart on Chagas' myocarditis. *American Heart Journal* 1978;95:316-324.

Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, et al. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* 1994;269(44):27580-8.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87(1):245-313.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.

Bers DM, Guo T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1047:86-98.

Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 2008;70:23-49.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415,6868:198-205.

Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. Second Edition. Netherland: Kluwer Academic Publishers, 2001.

Bers DM. *Inotropic mechanisms in cardiac muscle* *Heart Physiology and Pathophysiology*. 4º ed. 2001.

Bocchi EA, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gómez E, Castro P; Interamerican Society of Cardiology. The reality of heart failure in Latin America. *J Am Coll Cardiol* 2013;10;62(11):949-958.

Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara-Koogan, 2 ed, 2000.

Brette F, Sallé L, Orchard CH. Quantification of calcium entry at the T-tubules and surface membrane in rat ventricular myocytes. *Biophys J* 2006;90:381-38.

Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev* 2003;83(1):59-115.

Carvalho LSC, Camargos ERS, Almeida CT, Peluzio MCG, Alvarez-leite JI, Chiari E, Reis DA. Vitamin deficiency enhances pathology in acute *Trypanosoma cruzi* infected rats. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 2006;100:1025-1031.

Chagas C 1909. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen. n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1:159-218.

Chen YJ, Traverse JH, Ruisheng D, Hou MX, Bache RJ. Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart. *Circulation* 2002;106:273-279.

Cheng H, Cannell MB, Lederer WJ. Propagation of excitation-contraction coupling into ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 1994;428(3-4):415-417.

Conde-Garcia EA. Biofísica. São Paulo: Savier, 1998.

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010;465(7301):S6-7 doi: 10.1038/nature09221.

Danilo Roman Campos (UFMG, 4 de Março, 2011). Alterações eletromecânicas do miócito cardíaco na fase aguda da doença de Chagas em modelo murino: papel do óxido nítrico, interferon-gama e ânion superóxido. <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/UCSD-8H5PGK>.

De Carvalho AC, Tanowitz HB, Wittner M, Dermietzel R, Roy C, Hertzberg EL, Spray DC. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with *Trypanosoma cruzi*. *Circulation Research* 1992;70:733-742.

DeFelicis, LJ. Electrical properties of the cells: patch clamp for biologists, Ed. Plenum Press, NY1997.

Dos Santos PV, Roffe E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, et al. Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD6L(LOW)LFA-1(HIGH)VLA-4(HIGH) activation

phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes and Infection* 2001;3:971-984.

Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME. CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev* 2011;91(3):889-915.

Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 1979;41:473-84.

Fabiato A, Fabiato F. Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas. Calcium-dependent cyclic and tonic contractions. *Circ Res* 1972;31(3):293-307.

Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. Hydrogen peroxide stimulates the Ca²⁺ release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995;270(43):25557-63.

Ferreira LR, Frade AF1, Baron MA1, Navarro IC1, Kalil J1, Chevillard C1, Cunha-Neto E1. Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. *World J Cardiol* 2014;26(8):782-790.

Fishman GI, Chugh SS, Dimarco JP, Albert CM, Anderson ME, Bonow RO, et al. Sudden cardiac death prediction and prevention: report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop. *Circulation* 2010;122(22):2335-2348.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.

Gaur N, Rudy Y. Multiscale modeling of calcium cycling in cardiac ventricular myocyte: macroscopic consequences of microscopic dyadic function. *Biophys J* 2011;100(12):2904-12.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-g-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves and L argine dependent, nitrogen oxide-mediated mechanisms inhabitable by interleukin-10 and transforming grown factor-b. *European Journal of Immunology* 1992;22:2501-2056.

Gill JS, McKenna WJ, Camm AJ. Free radicals irreversibly decrease Ca²⁺ currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 1995;292(3-4):337-340.

Gioda CR, Roman-Campos D, Carneiro-Júnior MA, da Silva KA, de Souza MO, Mendes LJ, Natali AJ, Cruz JS. Impaired cellular contractile function in thiamine-deficient rat cardiomyocytes. *Eur J Heart Fail* 2009;11(12):1126-1128.

Gordon AM. Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *News Physiol Sci* 2001;16:49-55.

Gupta S, Wen JJ, Garg NJ. Oxidative stress in Chagas disease. Interdisciplinary perspective on infectious disease, 2009.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 11° ed: Elsevier, 2006.

Hansefuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 199;99:641-648.

Hare JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 2003 Jul;35(7):719-729

Hilgemann DW, Nicoll DA, Philipson KD. Charge movement during Na⁺ translocation by native and cloned cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Nature* 1991;352(6337):715-718.

Hille, B. Ion Channels of Excitable Membranes. 3a edição, Sinauer Associates Inc, 2002.

Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imagawa T, Yamanaka HI, Shigekawa M. Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem* 1996;271(23):13609-15.

Jaakko Malmivuo, Robert Plonsey. Bioelectromagnetism - Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields, Oxford University Press, New York, 1995.

Jung DH, Kim KH, Byeon HE, Park HJ, Park B, Rhee DK, Um SH, Pyo S. Involvement of ATF3 in the negative regulation of iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Immunol Res* [Epub ahead of print].

Kassmann M, Hansel A, Leipold E, Birkenbeil J, Lu SQ, Hoshi T, Heinemann SH. Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflugers Arch* 2008;456(6):1085-1095.

Katz AM. Physiology of the heart. Ed. Raven Press, 4 ed. 2006.

Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996;79(3):363-80.

Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schlüter KD, Piper HM, Noack E.

Lacampagne A, Duittoz A, Bolaños P, Peineau N, Argibay JA. Effect of sulfhydryl oxidation on ionic and gating currents associated with L type calcium channels in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1995;30(5):799-806.

Landis EM. Carl John Wiggers, May 28, 1883-April 29, 1963. *Biogr. Mem. Natl. Acad. Sci.* 18: 363-397, 1976

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica. Ed. Sarvier, 3 ed. 2002.

Lim G, Venetucci L, Eisner DA, Casade B. Does nitric oxide modulate cardiac ryanodine receptor function? Implications for excitation–contraction coupling. *Cardiovasc Res* 2008;77:256-264.

Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1996;78(1):91-101

Machado CRS, Ribeiro ALP. Experimental American trypanosomiasis in rats: sympathetic denervation, parasitism and inflammatory process. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1989;84:549-556.

Machado FS, Jelicks LA, Kirchoff LV, Shirani J, Nagajyothi F, Mukherjee S, et al. Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol Rev* 2012;20(2):53-65.

Maguire JH, Hoff R, Sherlock I, Guimarães AC, Sleigh AC, Ramos NB, Mott KE, Weller TH. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. *Circulation* 1987;75(6):1140-1145.

Mandelker L. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008;38(1):1-30,

Massion PB, Balligand JL. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol* 2003;546(Pt 1):63-75.

Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric Oxide and Cardiac Function: Ten Years After, and Continuing. *Circ Res* 2003;93:388-398.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiology Review* 2005;85:1205-1253.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85:1205-1253.

Nerbonne JM. Repolarizing cardiac potassium channels: multiple sites and mechanisms for CaMKII-mediated regulation. *Heart Rhythm* 2011;8(6):938-941.

Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(1):12-25.

Nunes MC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL; Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(9):767-776.

Patel SP, Campbell DL. Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 2005;569(Pt1):7-39.

Pollock JD, Williams DA, Mary AC, Gifford L, Li LL, Du X, Fisherman J, et al. Doerschuk I & Mary C. Dinayer I. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nature Genetics* 1995;9:202-209.

Postan M, Cheever AW, Dvorak JÁ, McDaniel JP. A histopathological analysis of the course of myocarditis in C3H/HE mice infected with *Trypanosoma cruzi* clone sylvio-X10/4. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1986;80:50-55.

Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 2011;333(6048):1440-5.

Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. X-ROS signalling is enhanced and graded by cyclic cardiomyocyte stretch. *Cardiovasc Res* 2013;98(2):307-314.

Randall D, Burggren W, French K. Eckert *Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações*. Ed. Guanabara Koogan, 2000.

Ribeiro AL, Rocha MO. Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31(3):301-314.

Ribeiro AL, Sabino EC, Marcolino MS, Salemi VM, Ianni BM, Fernandes F, et al. Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component. Electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi* seropositive and seronegative former blood donors. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(2):e2078.

Rokita AG e Anderson ME. New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). *Circulation* 2012;126:2125-2139.

Roman-Campos D, Campos AC, Gioda CR, Campos PP, Medeiros MA, Cruz JS. Cardiac structural changes and electrical remodeling in a thiamine-deficiency model in rats. *Life Science* 2009;84:817-824.

Roman-Campos D, Sales-Júnior P, Duarte HL, Gomes ER, Guatimosim S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cruz JS. Cardiomyocyte dysfunction during the chronic phase of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108(2):243-245 b.

Roman-Campos D, Sales-Junior P, Duarte HL, Gomes ER, Lara A, Campos P, et al. Novel insights into the development of chagasic cardiomyopathy: role of PI3Kinase/NO axis. *Int J Cardiol* 2013;167(6):3011-3020.

Romer AS, Parsons TS. *Anatomia Comparada dos Vertebrados*. Ed. Atheneu, 5 ed. 1985.

Rozanski GJ, Xu Z. Sulfhydryl modulation of K⁺ channels in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(12):1623-1632.

Sanches PC, Moffa PJ. Eletrocardiograma normal e patológico. Sao Paulo: Editora Roca, 2001.

Santiago HC, Gonzalez Lombana CZ, Macedo JP, Utsch L, Tafuri WL, Campagnole-Santos MJ, et al. NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(2):e1492.

Sears CE, Ashley EA, Casadei B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004;359(1446):1021-1044.

Selkurt EE. Fisiologia. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

Shioya T.A. A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models *J. Physiol Sci* 2007;57:327-335.

Soeller C, Cannell MB. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res* 1999;84(3):266-75.

Song LS, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(11):4305-4310.

Souza MM, Andrade SG, Barbosa AA, Raimunda AB, Santos TM, Alves VAF, Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system pathology in experimental Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1996;91:217-224.

Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol* 2014;103(1):1-10.

Tanowitz HB, Machado FS, Jelicks L. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis* 2009;51(6):524-39.

Thaler MS. The only EKG book you'll ever need. Wolters Kluwer Health; 2010.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.

Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(9):1063-1077.

Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RWF, Janse MJ, Yellon DM, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Research* 1988;22(7):447-455.

Wen JJ, Bhatia V, Popov VL, Garg NJ. Phenyl-tert-butyl nitronone reverses mitochondrial decay in acute Chagas' disease. *American Journal of Pathology* 2006;169:1953-1964.

World Health Organization (OMS). Factsheet on Chagas disease, 2014.

Wu Y, Luczak ED, Lee EJ, Hidalgo C, Yang J, Gao Z, Li J, Wehrens XH, Granzier H, Anderson ME. CaMKII effects on inotropic but not lusitropic force frequency responses require phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 2012;53(3):429-36.

Xu H, Guo W, Nerbonne JM. Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1999;113(5):661-78.

Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 1998;279(5348):234-237.