



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Alterações eletromecânicas do miócito cardíaco  
na fase aguda da doença de Chagas em modelo  
murino: papel do óxido nítrico, interferon- $\gamma$  e  
ânion superóxido**

**Danilo Roman Campos**

**Belo Horizonte - MG**

**Março - 2011**



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**

**Alterações eletromecânicas do miócito cardíaco  
na fase aguda da doença de Chagas em modelo  
murino: papel do óxido nítrico, interferon- $\gamma$  e  
ânion superóxido**

**Tese de doutorado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica e Imunologia  
do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Doutor em Bioquímica e Imunologia.**

**Aluno: Danilo Roman Campos**

**Orientador: Dr. Jader dos Santos Cruz**

**Belo Horizonte - MG**

**Março - 2011**



#### ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DANILO ROMAN CAMPOS.

Aos quatro dias do mês de março de 2011 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do curso para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Alterações eletromecânicas do miócito cardíaco na fase aguda da doença de Chagas em modelo murino: papel do óxido nítrico, interferon-gama e ânion superóxido", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Jader dos Santos Cruz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Wamberto Antônio Varanda, da Universidade de São Paulo, aprovado; Dra. Rosana Almada Bassani, da Universidade de Campinas, aprovado; Dra. Catherine Ropert, do Centro de Pesquisa René Rachou, aprovado; Dr. Dawidson Assis Gomes, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado e Dr. Jader dos Santos Cruz, Orientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovado. Pelas indicações, o candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 04 de março de 2011.

Dr. Wamberto Antônio Varanda – USP / RP

Dra. Rosana Almada Bassani – UNICAMP

Dra. Catherine Ropert - CPqRR

Dr. Dawidson Assis Gomes - UFMG

Dr. Jader dos Santos Cruz – Orientador – UFMG

## **Dedicatória**

Aos meus pais, pelo apoio, carinho e vida.

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, por permitir e me auxiliar na realização deste projeto.

Ao meu amigo, orientador e mentor Jader dos Santos Cruz, pela oportunidade de trabalho em conjunto ao longo desses anos e por tanto me ensinar.

Aos pesquisadores Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli, Dra. Caterine Ropert e Dr. Policarpo Ademar Sales Junior, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais e do Instituto René Rachou/BH, pelo auxílio na criação, experimentação e discussão do modelo e resultados utilizando a cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi*.

Às professoras Dra. Leda Quércia Vieira e Dra. Fabiana Simão Machado, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo auxílio nos experimentos com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

À professora Dra. Silvia Guamitosim, MSc. Enéas Ricardo de Moraes Gomes e MSc. Aline Alves Lara, do Departamento de Fisiologia, Farmacologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo auxílio nos experimentos de microscopia confocal e *western blot*.

Ao professor Dr. Anderson José Ferreira, do Departamento Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo auxílio nos experimentos de eletrocardiografia.

Ao professor Dr. Antônio José Natali, da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio nos experimentos de contratilidade celular.

Ao professor Dr. Rodrigo Ribeiro Resende, da Universidade Federal de São João Del-Rei, pelo auxílio nos experimentos de RT-PCR em tempo real.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Campos de Carvalho e à professora Dra. Narazeth Novaes Rocha, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo auxílio nos experimentos de ecocardiografia.

Aos membros da secretaria de pós-graduação em bioquímica e imunologia Celise Costa e Ubirajara Dutra pelo auxílio e presteza nas inúmeras necessidades durante esses

Aos meus pais que tanto me auxiliaram ao longo da minha vida e formação.

Ao meu amigo Eduardo A. D. Gervásio de Carvalho, pelo auxílio, amizade e discussões acaloradas sobre ciência nos diferentes botecos de Belo Horizonte.

Ao meu amigo e parceiro de pesquisa, Hugo Leonardo Lúcio Duarte, pelo auxílio e amizade, sem os quais dificilmente este trabalho teria sido realizado.

Aos membros do Laboratório de Membranas Excitáveis e Biologia Cardiovascular pelo auxílio e momentos de diversão.

Aos demais amigos formados ao longo desses anos de Instituto de Ciências Biológicas.

Aos amigos de minha cidade natal, que tanto auxiliaram com sua amizade e companheirismo ao longo de minha formação pessoal e acadêmica.

Aos amigos do período de graduação na Universidade Federal de Uberlândia, em especial a Samuel e Natássia, que de alguma forma contribuíram para minha formação, tanto acadêmica como pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (Pronex), por terem financiado este trabalho.

**Lembre que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore, viaje, descubra. Conheça.**

*Albert Einstein*

## Lista de Abreviaturas

- AE – Átrio esquerdo  
AEC – Acoplamento excitação-contração  
AKT – Proteína cinase de treonina/serina  
Ang II – Angiotensina II  
ANP – Peptídeo natriurético atrial  
ASK-1 – Cinase do tipo 1 reguladora de sinal apoptótico  
ATP – Trifosfato de adenosina  
BLC-2 – Linfoma 2 de célula B  
BNP – Peptídeo natriurético do tipo B  
CaMK – Cinase dependente de calmodulina  
CAMKII – proteína cinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina  
Cav – Canal de cálcio dependente de voltagem  
CDK – Cinase dependente de ciclina  
cGMP – Guanosina monofosfato cíclica  
DAG – Diacilglicerol  
DC – doença de Chagas  
DDP6 – Dipeptidil proteína 6 similar a aminopeptidase.  
DCVs – Doenças cardiovasculares  
ECG – Eletrocardiograma  
EGF – Fator de crescimento epidermal  
ELAM – Proteína de adesão leucócito endotélio  
Endo-1 – Endotelina-1;  
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial  
EPM – Erro padrão da média  
ERK – Cinase regulada por sinal extracelular  
FGF - Fator de crescimento de fibroblasto  
FGFR – Receptor do FGF  
FOXO – *Forkhead Box*  
GC-A – Guanilil ciclase-A  
GPCR – Receptor acoplado a proteína-G  
GSH – Glutathiona reduzida

GSK3- $\beta$  – Glicogênio sintase cinase 3- $\beta$   
HDAC – Deacetilase de histonas  
IC – Insuficiência cardíaca  
ICa,L- Corrente de cálcio do tipo L  
ICa,T – Corrente de cálcio do tipo T  
ICAM – Proteína de adesão intercelular  
IFN- $\gamma$  – Interferon- $\gamma$   
IFN- $\gamma^{-/-}$  - Camundongo *knockout* para IFN- $\gamma$   
IGF-I – Fator-1 de crescimento similar à insulina  
IK1 – Corrente de potássio retificadora de entrada  
IK<sub>ACh</sub> – Corrente de potássio ativada por acetilcolina  
IK<sub>ATP</sub> – Corrente de potássio sensível a ATP  
IKK – Inibidor da NF- $\kappa$ B  
IL-10 – Interleucina 10  
IL-12 – Interleucina 12  
IL-18 – Interleucina 18  
IL-1 $\beta$  - Interleucina - 1 $\beta$   
IL-2 – Interleucina 2  
INa – Corrente de sódio  
I<sub>NaCa</sub> – Corrente do trocador sódio-cálcio  
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível  
iNOS $^{-/-}$  - Camundongo *knockout* para iNOS  
Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> – Inositol-1,4,5-trisfosfato  
IP3 – Trisfosfato de inositol  
I<sub>to</sub> – Corrente de potássio transitória de saída  
I<sub>to,f</sub> – Corrente de potássio de saída transitória rápida  
I<sub>to,s</sub> – Corrente de potássio transitória de saída lenta  
I $\kappa$ B – Inibidor do NF- $\kappa$ B  
JNK – Cinase c-Jun N-terminal  
KO – *knockout*  
Kv – Canal de potássio dependente de voltagem  
L-NMMA – L-NG-monometil Arginina citrato II  
Mac – Macrófago

MAPKKK – Proteína cinase cinase cinase ativadora de mitógeno  
MAPKKKK – MAPKKK cinase  
MCP-1 – Proteína quimiática de monócito  
MEF – Fator ativador do miócito  
MEK – Proteína cinase cinase ativadora de mitógeno  
MHC-I – Complexo principal de histocompatibilidade do tipo I  
MHC-II – Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II  
MnSOD – Superóxido dismutase dependente de Manganês  
mTOR – Alvo de mamíferos da rapamicina  
MyHC – Cadeia pesada de miosina  
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADPH-oxidase – Nicotinamida adenina fosfato oxidase do tipo 2  
Nav – Canal de sódio dependente de voltagem  
NFAT – Fator nuclear de células T ativadas  
NF- $\kappa$ B – Fator nuclear  $\kappa$ B;  
NIK – Cinase indutora de NF- $\kappa$ B  
NK – Célula *natural Killer*  
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal  
NO – Óxido nítrico  
NOX1-5 – NADPH-oxidase 1-5  
NOX-2<sup>-/-</sup> - Camundongo *knockout* para gp91phox<sup>-/-</sup>  
PA – Potencial de ação  
PBN – Fenil-N-tert-butilnitrona  
PDK – Cinase dependente de fosfoinosítido  
PDNF – fator neurotrófico derivado de parasito  
PI3K – Cinase-3 fosfatitilinositol  
PKA – Proteína cinase A  
PKB – Proteína cinase B  
PKC – Proteína cinase C  
PKD – Proteína cinase D  
PKG – Proteína cinase G  
PLA2 – Fosfolipase A2  
PLB – Fosfolambana

PLC – Fosfolipase C  
Pol II – Polimerase II de RNA  
PP – Parede posterior  
RKT – Receptor tirosino-cinase  
RNA – Ácido ribonucleico  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
RS – Retículo sarcoplasmático  
RyR – Receptor de rianodina  
SERCA2A – Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático do subtipo 2A  
SNC – Sistema nervoso central  
TAK – TGF- $\beta$  cinase ativada  
TGFR – Receptor TGF  
TGF- $\beta$  – Fator- $\beta$  de transformação do crescimento  
TmT – Tropomiosina  
TnC – Troponina C  
TNFR – Receptor do TNF- $\alpha$   
TNFR1 – Receptor tipo 1 de TNF- $\alpha$   
TNFR2 – Receptor tipo 2 de TNF- $\alpha$   
TNF- $\alpha$  – Fator  $\alpha$  de necrose tumoral  
TnI – Troponina I  
TnT – Troponina T  
VACHT<sup>KD</sup> – Camundongos *knockdown* para o transportador vesicular de acetilcolina  
VCAM – Proteína celular de adesão vascular  
VD – Ventriculo direito  
VDAC – Canal aniônico dependente de voltagem  
VE – Ventriculo esquerdo  
VSMC – Célula da musculatura lisa vascular  
OMS – Organização mundial de saúde

## Resumo

A cardiopatia chásica, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, possui múltipla origem, sendo ainda desconhecida a gênese do problema cardíaco decorrente dessa doença. A fisiopatologia da doença de Chagas pode ser dividida em duas fases, aguda e crônica. Na fase aguda ocorre uma grande expansão do número de parasitos, com ativação do sistema imune e indução de uma intensa miocardite. Essas alterações podem induzir a arritmias complexas, e levar à morte. Apesar desses fatores, pouco se conhece sobre a gênese dos problemas cardíacos durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Por esse motivo, decidimos estudar a fase aguda da doença de Chagas em modelo murino, bem como avaliar a influência da cepa no estabelecimento da cardiopatia. A curva de parasitemia dos animais infectados com a cepa colombiana apresentou um caráter transitório, sendo que com 81 dias pós-infecção (dpi), já não foram mais detectados parasitos na circulação. A produção de MCP-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  seguiu um perfil similar ao da curva de parasitemia, sendo observada uma inflamação crônica aos 170 dpi. A infecção causou um aumento na duração do complexo QRS, bem como alternância de onda P e complexo QRS, com aumento da frequência cardíaca. Também foi observado hipertrofia cardíaca aos 30 dpi. Já aos 15 dpi, a ecocardiografia evidenciou uma redução na funcionalidade do coração. Adicionalmente a capacidade contrátil do miócito foi atenuada tanto no ventrículo direito quanto no esquerdo (VD e VE), aos 15, 30 e 45 dpi. Os resultados eletrocardiográficos evidenciaram que existe um remodelamento da eletrofisiologia do miócito cardíaco. Por esse motivo caracterizamos diferentes componentes iônicos dos VE e VD. Tanto para o VD quanto para o VE com 15 dpi, observamos uma redução na corrente de cálcio do tipo L ( $I_{Ca,L}$ ), porém sem alteração no tempo necessário para repolarização do potencial de ação (PA) no VE. Considerando-se apenas o VE, a corrente de potássio transiente rápida ( $I_{to}$ ) e o retificador de entrada ( $I_{K1}$ ) não foram alterados. Contudo, tanto o VE quanto o VD apresentaram uma redução na  $I_{Ca,L}$  e  $I_{to}$  aos 30 dpi, bem como um aumento no tempo necessário para repolarização do PA, seguido de um aumento, apenas no VE, da  $I_{K1}$ . Além disso, observamos que a produção basal de óxido nítrico em células do VE de animais aos 30 dpi encontra-se aumentada e a inibição dessa produção resultou em um recobro da  $I_{Ca,L}$ . Adicionalmente, a inibição de um passo *upstream* na via, a PI3Kinase, também recuperou parcialmente a  $I_{Ca,L}$ . Também estudamos a dinâmica intracelular de cálcio do VE em animais aos 30 dpi. Observamos, contudo, que não existe uma redução na

liberação transiente de cálcio, bem como em seu estoque intracelular do íon. A manutenção da liberação de cálcio foi observada mesmo com um aumento do tempo para o pico do transiente e da recaptura de cálcio, além de ter sido observado um desacoplamento entre o receptor de rianodina e o canal de cálcio do tipo L. Além disso, a frequência e a amplitude das *sparks* de cálcio não foram alteradas, fato que indica que outros mecanismos estão envolvidos no controle do receptor de rianodina durante a infecção. Uma via envolvida na redução da capacidade contrátil do VE é a do IFN- $\gamma$ . Quando avaliamos o encurtamento celular do miócito isolado do animal IFN- $\gamma^{-/-}$  com 15 e 26-28 dpi, o VE apresentou função contrátil similar à do controle. Entretanto, o VD do camundongo IFN- $\gamma^{-/-}$  infectado apresentou uma atenuação no encurtamento celular, maior do que a observada no animal controle infectado, indicando que o VD e o VE são modulados por vias distintas. Os parâmetros avaliados nos animais infectados com a cepa Y apresentaram resultados bem distintos daqueles observados nos infectados com a cepa colombiana. Quando avaliamos a funcionalidade do coração, observamos uma redução parcial e transitória da função cardíaca, sem, contudo, ocorrência de hipertrofia. Os animais infectados com a cepa Y apresentaram uma alteração transitória das propriedades elétricas dos miócitos isolados do ventrículo esquerdo, sendo que foi observada atenuação nos 15 e 30 dpi, com recobro dos valores aos 45 dpi. Aos 15 dpi ocorreu um aumento do tempo para repolarização do PA, redução da  $I_{to}$  e redução da  $I_{Ca,L}$ . Essas alterações não foram mais observadas com 45 dpi. Os mecanismos envolvidos na modulação negativa dessas correntes aos 15 dpi envolvem a produção de superóxido produzida pela nicotinamida e adenina fosfato oxidase do tipo 2, já que quando utilizamos o animal *knockout* para essa enzima não observamos as alterações relatadas acima. Finalmente, observamos que uma redução na atividade colinérgica do coração não é capaz de gerar as alterações elétricas observadas em nosso estudo. Sendo assim, nossos resultados sugerem que o estabelecimento de uma fase cardíaca crônica manifesta ou não na doença de Chagas, irá depender da cepa, sendo que essa irá determinar uma miocardite crônica ou transitória.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, cardiomiócito, hipertrofia, insuficiência cardíaca, corrente de potássio, dinâmica intracelular de cálcio, superóxido, óxido nítrico, interferon- $\gamma$

## ***Abstract***

Cardiomyopathy observed during infection by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* has unknown mechanism concerning your genesis. Chagas' disease is separated in two distinct phases, acute and chronic. In the acute phase it is observed a large number of parasites on blood stream, following activation of immune system which induces severe miocarditis. These alterations in many cases could lead to occurrence of severe arrhythmias, leading to death. Despite of the great importance of Chagas' disease in the Latin American, few is known about the mechanisms involved in the establishment of this disease. Based on that, we decided to evaluate the acute phase of Chagas' disease in murine model, as well as the influence of strain type in the cardiomyopathy development. Following infection and control of parasitemia with colombian strain of *Trypanosoma cruzi*, after 81 days, it was not possible to find parasites in the blood stream. The production of MCP-1, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  followed a similar profile of parasitemia curve, however it was possible to see a chronic inflammation at 170 days post-infection (dpi). At first we evaluated the electrocardiogram at 30 dpi. The infection caused an increased in the QRS interval, besides a P wave and QRS complex alternance, with increased heart frequency. Additionally, we observed heart hypertrophy and reduced heart performance at 30 and 15 dpi, respectively, as determined by echocardiography. When we evaluated the isolated cardiomyocyte function, by the shortening index, it was observed a significant reduction in cardiomyocyte shortening at 15, 30 and 45 dpi, in the left and right ventricles (LV and RV). Taking into account the electrocardiographic results, it is possible to realize that there is an electrical remodeling in isolated cardiomyocyte. Thus, we decided to determinate the cellular basis of this phenomenon. In the LV and RV, at 15 dpi we observed a reduced L-type calcium current ( $I_{Ca,L}$ ). In the LV, at 15 dpi, we did not observe any change in the action potential (AP), inward potassium current ( $I_{K1}$ ) and transient outward fast potassium current ( $I_{to}$ ). However, at 30 dpi, in the LV and RV we observed a reduced  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{to}$  and an increased time to AP repolarization, as well as and increased in  $I_{K1}$ , only in the LV. Besides, we demonstrated that LV has an increased production of nitric oxide at 30 dpi, and inhibition of nitric oxide synthase recovered  $I_{Ca,L}$  in LV at 30 dpi. Additionally, upstream inhibition in this pathway, the PI3kinase, partially recovered  $I_{Ca,L}$ . Trying to better understand the molecular basis of cardiomyocyte dysfunction, we evaluated the intracellular calcium dynamics in LF at 30 dpi. However, we did not observe any

reduction in calcium transient neither in the SR load. We did not observe alterations in calcium spark frequency and amplitude. In our study we postulate that LV dysfunction is determined, at least in part, by IFN- $\gamma$ . LV function in isolated myocyte from IFN- $\gamma^{-/-}$  was preserved at 15 and 26-28 dpi. However, RV shortening of myocyte from IFN- $\gamma^{-/-}$  infected mice was reduced depend on infection time. This is an indicative that LV and RV are differentially modulated. We performed some experiments in mice infected with Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Echocardiography revealed a partial and transitory reduction in heart function, however without hypertrophy. When we evaluated  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{to}$  and AP in LV in this group, we observed a reduction in  $I_{Ca,L}$  and  $I_{to}$  and an increase in AP duration at 15 dpi. However, at 30 and 45 dpi we observed either a partial or a complete recovery of all parameters studied, respectively. The mechanism(s) involved in alteration of  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{to}$  and AP waveform at 15 dpi was/were attributed to increased production of superoxide, since when we used knockout mice to NADPH-oxidase type 2, we did not observe any alteration . At last, we demonstrated that reduced cholinergic function in heart is not able to induce electrical remodeling basically in the same way as observed in our experimental model. Taking all together, our results demonstrate that the establishment or not of a cardiac chronic phase in Chagas' disease, is dependent on *Trypanosoma cruzi's* infective strain, which will determinate a chronic or transitory myocarditis.

**Key-words:** *Trypanosoma cruzi*, cardiomyocyte, hypertrophy, heart failure, potassium current, intracellular calcium dynamics, superoxide, nitric oxide, interferon- $\gamma$

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ELETROCARDIOGRAMA NORMAL DE CAMUNDONGO. ....	4
FIGURA 2: PRINCIPAIS COMPONENTES DA MAQUINARIA CONTRÁTIL DA CÉLULA MUSCULAR CARDÍACA. ....	7
FIGURA 3: POTENCIAL DE AÇÃO CARDÍACO TÍPICO E SUAS CORRENTES. ....	9
FIGURA 4: CANAL DE SÓDIO VOLTAGEM-DEPENDENTE. ....	11
FIGURA 5: TRANSPORTE DE CÁLCIO, ATIVAÇÃO DOS MIOFILAMENTOS E MANUSEIO DE $Ca^{2+}$ PELA MITOCÔNDRIA EM MIÓCITO VENTRICULAR. ....	19
FIGURA 6: ESTÍMULOS QUE INDUZEM A HIPERTROFIA EM CÉLULA MUSCULAR CARDÍACA. ....	21
FIGURA 7: CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> . ....	26
FIGURA 8: PRINCIPAIS COMPONENTES DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA. ....	29
FIGURA 9: PONTOS DO ECG PARA DETERMINAÇÃO DOS INTERVALOS. ....	44
FIGURA 10: RESULTADO DA ANÁLISE DA CONTRATILIDADE CELULAR. ....	47
FIGURA 11: PROTOCOLOS PARA ELETROFISIOLOGIA. ....	51
FIGURA 12: RESULTADO DA ANÁLISE DA IMAGEM DO TRANSIENTE DE CÁLCIO. ....	54
FIGURA 13: PARASITEMIA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS AO LONGO DA INFECÇÃO POR <i>T. CRUZI</i> . ....	60
FIGURA 14: TRAÇADOS DO ELETROCARDIOGRAMA. ....	61
FIGURA 15: PARÂMETROS DO ELETROCARDIOGRAMA. ....	62
FIGURA 16: FREQUÊNCIA CARDÍACA. ....	63
FIGURA 17: ALTERNÂNCIA DE ONDA P NOS ANIMAIS AOS 30 DIAS PÓS-INFECÇÃO. ....	64
FIGURA 18: ALTERNÂNCIA DO COMPLEXO QRS NOS ANIMAIS AOS 30 DIAS PÓS-INFECÇÃO. ....	65
FIGURA 19: REPRESENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE ECOCARDIOGRAFIA. ....	66
FIGURA 20: PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS DA CEPA COLOMBIANA. ....	67
FIGURA 21: PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS CEPA COLOMBIANA. ....	68
FIGURA 22: TRAÇADOS REPRESENTATIVOS DA CONTRATILIDADE CELULAR. ....	69
FIGURA 23: PARÂMETROS DA CONTRATILIDADE CELULAR. ....	70
FIGURA 24: POTENCIAL DE AÇÃO (PA) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA COLOMBIANA. ....	72
FIGURA 25: POTENCIAL DE AÇÃO (PA) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO DIREITO - CEPA COLOMBIANA. ....	73
FIGURA 26: CORRENTE DE POTÁSSIO RETIFICADORA DE ENTRADA ( $I_{K1}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA COLOMBIANA. ....	74
FIGURA 27: CORRENTE DE POTÁSSIO RETIFICADORA DE ENTRADA ( $I_{K1}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO DIREITO - CEPA COLOMBIANA. ....	75
FIGURA 28: CORRENTE TRANSIENTE RÁPIDA DE SAÍDA DE POTÁSSIO ( $I_{T0}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA COLOMBIANA. ....	76
FIGURA 29: CORRENTE TRANSIENTE DE SAÍDA DE POTÁSSIO ( $I_{T0}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO DIREITO - CEPA COLOMBIANA. ....	78
FIGURA 30: CORRENTE DE CÁLCIO ( $I_{Ca,L}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA COLOMBIANA. ....	79
FIGURA 31: CORRENTE DE CÁLCIO ( $I_{Ca,L}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO DIREITO - CEPA COLOMBIANA. ....	80
FIGURA 32: FIGURAS REPRESENTATIVAS DO TRANSIENTE GLOBAL DE CÁLCIO. ....	81

FIGURA 33: PARÂMETROS DO TRANSIENTE GLOBAL DE CÁLCIO E ESTOQUE DE CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO. ....	82
FIGURA 34: ÍNDICE DE SINCRONIA DA LIBERAÇÃO DE CÁLCIO PELO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO. ....	84
FIGURA 35: AVALIAÇÃO DAS SPARKS. ....	85
FIGURA 36: PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO. FIGURAS REPRESENTATIVAS DE CARDIOMIÓCITOS CARREGADOS COM A SONDA FLUORESCENTE DAF-2.....	86
FIGURA 37: VIA ÓXIDO NÍTRICO/PI3KINASE NA MODULAÇÃO DA CORRENTE DE CÁLCIO ( $I_{Ca,L}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA COLOMBIANA. ....	87
FIGURA 38: COMPARAÇÃO DA ELETROFISIOLOGIA ENTRE VENTRÍCULO ESQUERDO E DIREITO - CEPA COLOMBIANA. ....	90
FIGURA 39: TRAÇADOS REPRESENTATIVOS DA CONTRATILIDADE CELULAR PARA O ANIMAL $IFN-\gamma^{-/-}$ . ....	91
FIGURA 40: PARÂMETROS DA CONTRATILIDADE CELULAR DO ANIMAL $IFN-\gamma^{-/-}$ . ....	92
FIGURA 41: PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS DA CEPA Y. ....	94
FIGURA 42: PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS DA CEPA Y. ....	95
FIGURA 43: POTENCIAL DE AÇÃO (PA) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA Y.....	97
FIGURA 44: CORRENTE TRANSIENTE DE SAÍDA DE POTÁSSIO ( $I_{to}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA Y.....	98
FIGURA 45: CORRENTE DE CÁLCIO ( $I_{Ca,L}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA Y. ....	99
FIGURA 46: PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPA COLOMBIANA E Y. ....	101
FIGURA 47: PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS COMPARAÇÃO ENTRE CEPA COLOMBIANA E Y. ....	102
FIGURA 48: COMPARAÇÃO DA ELETROFISIOLOGIA ENTRE VENTRÍCULO ESQUERDO DAS CEPAS COLOMBIANA E Y. ....	104
FIGURA 49: POTENCIAL DE AÇÃO (PA) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA Y $NOX2^{-/-}$ .....	106
FIGURA 50: CORRENTE DE POTÁSSIO RETIFICADORA DE ENTRADA ( $I_{K1}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA Y $NOX2^{-/-}$ .....	107
FIGURA 51: CORRENTE TRANSIENTE RÁPIDA SAÍDA DE POTÁSSIO ( $I_{to}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA Y $NOX2^{-/-}$ . ....	108
FIGURA 52: CORRENTE DE CÁLCIO ( $I_{Ca,L}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO - CEPA Y $NOX2^{-/-}$ . ....	109
FIGURA 53: POTENCIAL DE AÇÃO (PA) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO EM $VACHT^{KD}$ .....	111
FIGURA 54: CORRENTE DE CÁLCIO ( $I_{Ca,L}$ ) EM CARDIOMIÓCITOS DO VENTRÍCULO ESQUERDO EM ANIMAIS $VACHT^{KD}$ .....	112
FIGURA 55: VISÃO GERAL DOS RESULTADOS DE ELETROFISIOLOGIA. ....	113
FIGURA 56: MECANISMO GERAL PARA O ESTABELECIMENTO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA. ....	147
FIGURA 57 EVENTOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES ELÉTRICAS E MECÂNICAS DO CORAÇÃO NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	148

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
FISIOLOGIA DO CORAÇÃO .....	2
<i>Aspectos macroscópicos - mecânicos e elétricos</i> .....	2
<i>Aspectos celulares do miócito cardíaco</i> .....	5
<i>Ultraestrutura da célula cardíaca e maquinaria contrátil da célula</i> .....	5
<i>Potencial de ação e Canais iônicos</i> .....	8
<i>Estrutura básica dos canais iônicos dependentes de voltagem</i> .....	10
Canais para Sódio .....	12
Canais para Cálcio .....	13
Canais para Potássio.....	14
Correntes retificadoras de entrada.....	15
Corrente de potássio transiente de saída ( $I_{to}$ ).....	16
<i>Acoplamento excitação-contração e seus componentes</i> .....	16
Principais componentes do retículo sarcoplasmático .....	17
Trocador sódio-cálcio .....	17
<i>O acoplamento excitação-contração</i> .....	18
DOENÇAS CARDÍACAS.....	20
<i>Hipertrofia do miócito cardíaco</i> .....	20
<i>Miocardite</i> .....	22
<i>Insuficiência Cardíaca</i> .....	23
<i>Óxido Nítrico x Insuficiência Cardíaca</i> .....	24
DOENÇA DE CHAGAS .....	25
<i>Agente etiológico da doença de Chagas (Trypanosoma cruzi), seu vetor invetrabrado (Triatoma infestans) e ciclo de vida</i> .....	25
<i>Resposta imune à infecção pelo Trypanosoma cruzi</i> .....	27
<i>Aspectos cardíacos da infecção por T. cruzi: manifestações da fase aguda e crônica e influência da cepa</i> .....	30
Fase aguda.....	31
Fase crônica.....	32
Influência da cepa .....	33
<i>Estresse oxidativo e Infecção por T. cruzi</i> .....	33
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
OBJETIVO GERAL .....	39
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>

GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	42
INFECÇÃO E MANUTENÇÃO DA CEPA COLOMBIANA E Y .....	42
ECOCARDIOGRAFIA .....	43
ELETROCARDIOGRAMA .....	43
MEDIDA DAS CITOCINAS NO SORO.....	44
PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA OBTENÇÃO DO CORAÇÃO ISOLADO.....	45
CÉLULAS MUSCULARES CARDÍACAS ISOLADAS .....	46
CONTRATILIDADE CELULAR .....	46
ELETROFISIOLOGIA CELULAR.....	47
<i>Potencial de ação e corrente retificadora de entrada .....</i>	<i>48</i>
<i>Corrente total de potássio de saída .....</i>	<i>49</i>
<i>Corrente de Cálcio.....</i>	<i>49</i>
<i>Análise biofísica das Correntes Iônicas .....</i>	<i>52</i>
TRANSIENTE INTRACELULAR DE CÁLCIO E ESTOQUE DE CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO .....	53
MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA ASSINCRONIA DE LIBERAÇÃO DE CÁLCIO.....	55
DETECÇÃO E ANÁLISE DOS SPARKS .....	56
MEDIDA INTRACELULAR DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) .....	56
ESTATÍSTICA .....	57
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
RESULTADOS COM A CEPA COLOMBIANA .....	59
<i>Parasitemia, mortalidade e produção de citocinas.....</i>	<i>59</i>
<i>Eletrocardiograma .....</i>	<i>60</i>
<i>Ecocardiografia.....</i>	<i>65</i>
<i>Contratilidade celular.....</i>	<i>69</i>
<i>Propriedades elétricas dos cardiomiócitos - cepa colombiana .....</i>	<i>71</i>
Potencial de ação .....	71
Correntes de potássio .....	73
Corrente de Cálcio do tipo L.....	78
<i>Dinâmica intracelular de cálcio.....</i>	<i>81</i>
Transiente e estoque Intracelular de cálcio .....	81
Assincronia na liberação de cálcio.....	83
Sparks de cálcio .....	84
<i>Produção de óxido nítrico em miócitos cardíacos infectados .....</i>	<i>86</i>
<i>Participação da via NO/PI3Kinase na regulação da I<sub>Ca,L</sub>.....</i>	<i>87</i>
<i>Comparação entre o ventrículo direito e o esquerdo – parâmetros eletrofisiológicos .....</i>	<i>88</i>
<i>Resultados animal interferon-<math>\gamma^{\text{-/-}}</math> (IFN-<math>\gamma^{\text{-/-}}</math>) - cepa colombiana.....</i>	<i>91</i>
RESULTADOS CEPA Y .....	93
<i>Ecocardiografia.....</i>	<i>93</i>

<i>Propriedades elétricas dos cardiomiócitos - cepa Y</i> .....	96
Potencial de ação .....	96
Corrente de potássio de saída.....	97
Corrente de cálcio do tipo L .....	98
RESULTADOS DA COMPARAÇÃO ENTRE CEPA Y E COLOMBIANA.....	100
<i>Ecocardiografia</i> .....	100
<i>Eletrofisiologia</i> .....	103
RESULTADOS CEPA Y - NOX2 <sup>-/-</sup> .....	105
<i>Potencial de ação</i> .....	105
<i>Correntes de potássio</i> .....	106
<i>Corrente de cálcio do tipo L</i> .....	109
RESULTADOS DO ANIMAL <i>KNOCKDOWN</i> PARA O TRANSPORTADOR DE ACETILCOLINA ( <i>VACHT<sup>KD</sup></i> ) .....	110
COMPARAÇÃO GERAL DOS RESULTADOS DE ELETROFISIOLOGIA.....	112
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>114</b>
MODELO EXPERIMENTAL COM A CEPA COLOMBIANA.....	115
MODELO EXPERIMENTAL COM A CEPA COLOMBIANA – PAPEL DO INTERFERON- $\gamma$ E TNF- $\alpha$ NA CARDIOPATIA CHAGÁSICA....	133
<i>IFN-<math>\gamma</math></i> .....	133
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> .....	136
MODELO EXPERIMENTAL – COMPARAÇÃO ENTRE CEPA Y E COLOMBIANA.....	137
ASPECTOS EVOLUTIVOS DA INTERAÇÃO ENTRE <i>T. CRUZI</i> E HOSPEDEIRO VERTEBRADO .....	139
PAPEL DO SUPERÓXIDO NO REMODELAMENTO ELÉTRICO DURANTE A CARDIOPATIA CHAGÁSICA .....	140
DESNERVAÇÃO E PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA DOENÇA DE CHAGAS .....	144
MECANISMO GERAL DO ESTABELECIMENTO DA CARDIOPATIA CHAGÁSICA.....	146
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>149</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>153</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>183</b>
ANEXO 1 - TABELAS .....	184
ANEXO 2 – FIGURAS ADICIONAIS .....	191
ANEXO 3 – PROGRAMA DE ANÁLISE DE CONTRATILIDADE CELULAR .....	204
ANEXO 4 – ARTIGOS PUBLICADOS .....	225

# **INTRODUÇÃO**

## **Fisiologia do Coração**

### *Aspectos macroscópicos - mecânicos e elétricos*

A atividade contrátil do coração impulsiona o sangue através do corpo, proporcionando a distribuição de nutrientes e o endereçamento de resíduos do metabolismo para os sistemas excretores. Estas funções de transporte são possíveis graças à atividade contrátil do coração, órgão que pode ser entendido como uma bomba muscular oca, provida de válvulas dinâmicas, que move o sangue através de um circuito contínuo, denominado circulação sanguínea (Katz, 1992).

O coração é dividido em duas partes: o ápice, que contém as paredes ventriculares; e a base, a qual contém a maioria das artérias e veias que permitem a entrada e saída de sangue. A circulação coronariana, responsável pelo fluxo sanguíneo que irriga as células cardíacas, também é um importante aspecto da fisiologia do órgão, sendo que defeitos associados a esse sistema podem acarretar o desenvolvimento de patologias (Fuster et al., 1998).

A funcionalidade do coração é regulada e mantida graças a um sistema especializado em originar e conduzir o estímulo elétrico, o qual permite regular a força e a frequência dos batimentos cardíacos. Este sistema é composto pelo nodo sino-atrial, pelas vias atriais internodais, pelo nodo átrio-ventricular, pelo feixe de His e suas ramificações, e pelo sistema de Purkinje. Nesse complexo sistema, o nodo sino-atrial é responsável pelo início do sinal elétrico, e os demais componentes são responsáveis por conduzir tal sinal pelo coração. Esse tipo especializado de células possui sua fisiologia adaptada à geração e condução de sinais elétricos, em detrimento da função contrátil (Katz, 1992).

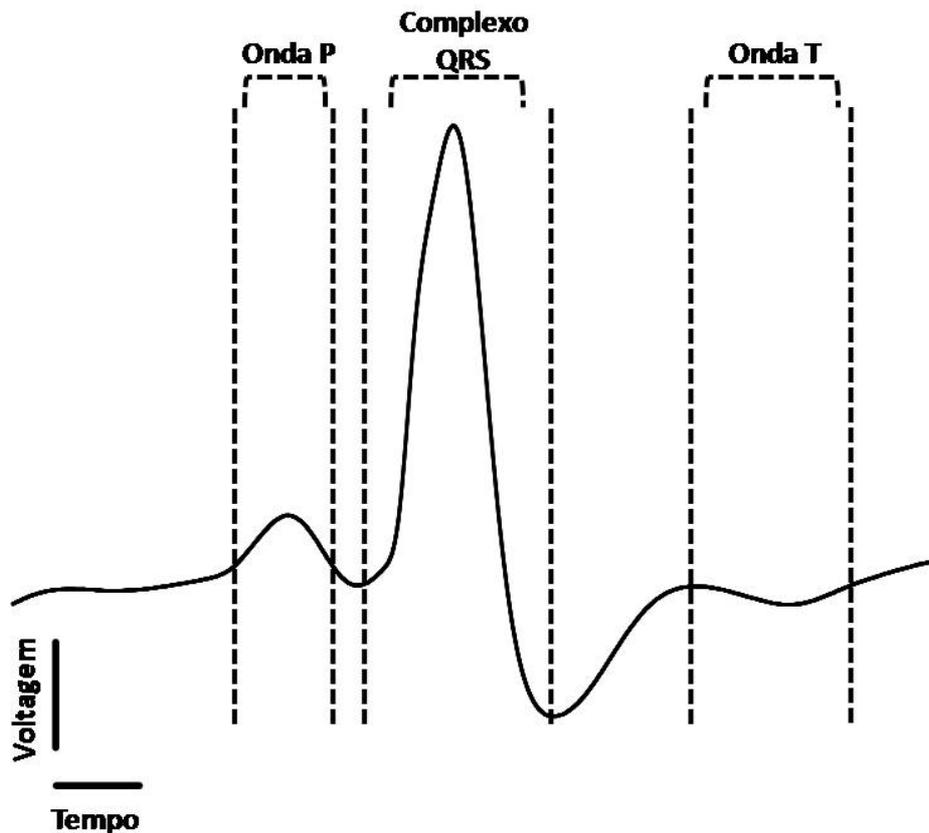
A função de marcapasso cardíaco, provida pelo nodo sino-atrial, permite que o coração funcione de forma cíclica, fenômeno denominado ciclo cardíaco. Este evento é dividido em duas fases. Uma denominada diástole, na qual as câmaras cardíacas são preenchidas com sangue; e a outra, denominada sístole, em que o sangue é ejetado do coração para a circulação sanguínea (Katz, 1992).

O ciclo mecânico do coração está associado ao seu ciclo elétrico, que é regido pela atividade marcapasso do nodo sino-atrial. A onda resultante da atividade elétrica das células excitáveis cardíacas é capaz de gerar um campo elétrico que se propaga

pelas estruturas corpóreas, sendo sua atividade passível de mensuração na superfície corpórea. Essa onda resultante medida na superfície corpórea é conhecida como eletrocardiograma (ECG). O formato do ECG é determinado por eventos elétricos regionais do coração, que proporcionam a funcionalidade cíclica e sincronizada desse órgão. Uma figura representativa de um traçado típico medido em camundongos é apresentada na figura 1, em que os principais fenômenos associados ao ECG estão evidenciados (ECG medido na derivação D2). A seguir é apresentado um resumo de cada uma das fases do ECG.

A onda P está associada à ativação do nodo sino atrial e a despolarização do átrio direito. O segmento PR é a ponte temporal entre a ativação atrial e a ativação ventricular. Durante esse período ocorre a ativação do nodo átrio-ventricular, do feixe de His, dos ramos do feixe e do sistema de condução especializado intraventricular, constituído principalmente pelas células de Purkinje. É importante destacar que nesse intervalo também ocorre a repolarização do átrio esquerdo, onda que fica mascarada pelos demais eventos que ocorrem de forma simultânea. A forma do intervalo PR difere entre humanos e camundongos, provavelmente em função da alta frequência cardíaca observada nos murinos.

O Complexo QRS está intimamente associado à despolarização dos miócitos ventriculares, tanto do ventrículo direito quanto do esquerdo. Já o segmento ST tem íntima relação com a repolarização das células do ventrículo direito e esquerdo. A atividade elétrica é relacionada diretamente com a mecânica, sendo o segmento QT denominado “sístole elétrica”, e o segmento TQ denominado “diástole elétrica” (Zipes *et al.*, 2006).



**Figura 1: Eletrocardiograma normal de camundongo.** Traçado representativo de um eletrocardiograma de camundongo, evidenciando os principais eventos elétricos, como a onda P, complexo QRS e a onda T.

Conforme relatado, a atividade elétrica de diferentes regiões do coração delimita o formato e o tempo de propagação de cada uma das ondas que compõem o ECG. Sendo assim, alterações na forma, mecânica e eletrofisiologia das diferentes células que compõem o coração podem ser observadas no ECG. Por exemplo, a hipertrofia ventricular esquerda está associada a uma maior amplitude do complexo QRS. Além disso, a alternância de amplitude nesse mesmo complexo indica taquicardias supraventriculares ou ventriculares. Por último, distúrbios de repolarização ventricular refletem em um aumento da duração do intervalo QT e QRS (Zipes *et al.*, 2006).

### ***Aspectos celulares do miócito cardíaco***

A fisiologia contrátil da célula cardíaca se deve à movimentação de íons através da membrana plasmática, que permite que ocorram mudanças no potencial de repouso da célula cardíaca, desta forma favorecendo a ocorrência da contração celular, decorrente da geração do potencial de ação (PA).

O fluxo de íons através dos canais permite que estruturas especializadas dentro das células sejam ativadas e ocorra a liberação de cálcio a partir de estoques intracelulares. O cálcio liberado é responsável pela ativação da maquinaria contrátil da célula, que, ao trabalhar de forma cooperativa, permite a deflagração da contração celular. Para a finalização do processo contrátil o cálcio é recapturado e extruído por sistemas especializados, os quais permitem que a contração celular seja encerrada (Bers, 2001).

O fenômeno acima descrito, em que o PA é capaz de induzir a célula a aumentar de modo transiente os valores de cálcio no citoplasma durante o processo de sístole, é denominado de **Acoplamento Excitação Contração (AEC)**. Este acoplamento é um dos principais mecanismos responsáveis pelo funcionamento adequado da contratilidade celular. A fisiologia do sistema AEC pode ser regulada de diversas formas, mas principalmente pela ativação de segundos mensageiros. Esses são produzidos, direta ou indiretamente, pela ativação de receptores presentes na membrana sarcoplasmática. Desordens no AEC, bem como dos componentes celulares e intracelulares que o regulam, podem acarretar diversas doenças, muitas delas letais (Bers, 2001).

### ***Ultraestrutura da célula cardíaca e maquinaria contrátil da célula***

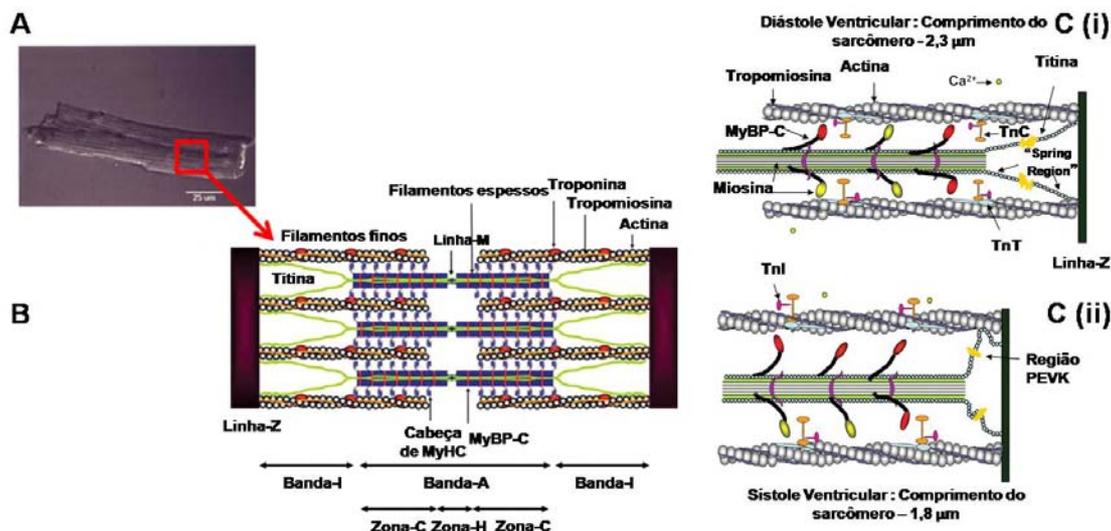
As propriedades mecânicas da célula muscular devem-se a um especializado sistema de membranas e compartimentos intracelulares, organizados de forma a permitir uma comunicação sincronizada entre as partes da célula. A figura 2 ilustra os principais componentes da maquinaria contrátil da célula muscular cardíaca.

A figura 2A representa um cardiomiócito isolado. É possível perceber a presença de estrias espaçadas regularmente ( $\sim 2 \mu\text{m}$ ). Uma ampliação de uma dada região da célula isolada é representada na figura 2B. Na figura 2B percebe-se que a organização

especial das proteínas que constitui o sarcômero favorece a interação entre proteínas específicas. As principais proteínas presentes nesta organização são duas: miosina e actina, que interagem entre si, favorecendo a ocorrência da contração. Os filamentos finos, constituídos por actina, tropomiosina, troponina (do tipo C, I e T), e os filamentos espessos, constituídos pela miosina (corpo e cabeça), e a proteína C ligada à cauda da miosina.

Na figura 2C podemos perceber um detalhe estrutural maior da interação entre as proteínas da maquinaria contrátil, que participam da contração celular. Em (Ci) as proteínas estão no estado de preenchimento ventricular (distensão do miócito cardíaco), e na (Cii) na fase de ejeção ventricular (encurtamento do miócito cardíaco). Estruturalmente, a miosina é composta por duas partes: cauda, que se ancora à proteína C, para formar os filamentos espessos; e a cabeça, que possui o sítio catalítico para ATP, que é capaz de interagir com a actina. A actina, por sua vez, possui uma organização mais complexa com outras proteínas. Os filamentos de actina são ancorados em uma ‘cordão’ de proteínas, que tem como função estruturar e esconder o sítio de interação da actina com a miosina. O ‘cordão’ é composto por tropomiosina. Ancorado em tal cordão, há uma organizada estrutura de diferentes troponinas, as quais possuem funções distintas. A troponina T (TnT) ancora-se na cadeia de tropomiosina. Ancorada na TnT, está a Troponina C e I (TnC, TnI), sendo que a TnC possui um sítio sensível a variações na  $[Ca]_i$  (Morimoto, 2008, Schaub *et al.*, 1998).

Uma importante proteína associada à maquinaria contrátil é a titina. Essa proteína se estende até metade do sarcômero, do disco-Z até a linha-M. A molécula de titina contém regiões que são extensíveis e não extensíveis, sendo que a região não extensível funciona como andaime para proteínas associadas, e serve para ligar o disco-Z à linha-M. A região extensível da titina está principalmente localizada na banda-I, que permite a variação fisiológica no comprimento do sarcômero cardíaco (1,8-2,3  $\mu\text{m}$ ). A região extensível da titina contém a região PEVK (rica em prolina, glutamato, valina e lisina), uma região em *tanden* repetitiva de imunoglobulina (Ig) e uma região ajustável N2B. Essas três regiões formam a região “*spring* - extensível”, contribuindo para o importante papel que a proteína possui para ajustar o comprimento do sarcômero saudável (Hanft *et al.*, 2008).



**Figura 2: Principais componentes da maquinaria contrátil da célula muscular cardíaca.** (A) Cardiomiócito isolado do ventrículo esquerdo de camundongo. (B) Representação esquemática da estrutura do sarcômero. A tropomiosina forma uma  $\alpha$ -hélice em dupla fita espiralada encaixando-se na dupla fita de actina através da polimerização da cabeça-cauda. O complexo troponina se liga a uma região específica de cada tropomiosina e é distribuída a intervalos regulares de 38 nm nos filamentos finos. A cadeia pesada de miosina (MyHC) tem o domínio da cabeça em formato globular contendo os sítios de interação com a actina, com atividade ATPásica. A proteína C ligante a miosina, é uma proteína associada ao filamento espesso, que forma 7-9 tiras transversas a um intervalo regular de 43 nm na zona-C, que é contida pela banda-A. Titina é uma proteína gigante constituída de três miofilamentos distribuída ao longo do sarcômero, do disco-Z até a linha M. (Adaptado de Morimoto, 2008.) (C) Representação em detalhe da interação actina-miosina, durante a diástole (C(i)) e sístole (C(ii)), evidenciando o principal movimento associado a cada proteína motora (Adaptado de Hanft *et al.*, 2008).

No repouso, quando a concentração de cálcio intracelular é baixa ( $\sim 10^{-7}$  M), o sítio da TnC sensível ao cálcio está desocupado. Nesta condição a interação entre TnI e TnC é fraca, favorecendo a interação de TnI com actina. Isto favorece a configuração do complexo troponina-tropomiosina de tal forma a esconder o sítio ativo da actina, que interage com a miosina. Quando a  $[Ca]_i$  aumenta ( $10^{-6} \sim 10^{-5}$  M), o  $Ca^{2+}$  se liga ao seu sítio na TnC. Esse fenômeno favorece a interação da TnC com TnI, a qual desestabiliza a interação da TnI com a actina. A interação TnC-TnI desloca a TnI do sítio ativo da

actina, retirando o impedimento estérico, que ocorre em baixas concentrações de cálcio. Dessa forma, a miosina pode-se ligar a actina, ativando a atividade ATPásica da miosina, sendo dessa forma deflagrada a contração, através do fenômeno da cooperatividade (Bers, 2008).

### ***Potencial de ação e Canais Iônicos***

Os fenômenos mecânicos da célula cardíaca descritos anteriormente, são intimamente dependentes das propriedades elétricas dos cardiomiócitos.

A excitabilidade celular é um fenômeno altamente dependente de estruturas presentes na membrana celular, denominadas canais iônicos. Eles são proteínas integrais de membranas, que possuem como propriedade básica permitir a passagem de íons entre o interior e exterior celular, bem como a transição de íons entre diferentes compartimentos intracelulares (Hille, 2001).

A capacidade dos canais iônicos permitirem o fluxo de íons é modulada de diferentes formas, as quais permitem classificá-los em canais sensíveis a: 1) voltagem, 2) moduladores químicos, 3) estiramento, e não dependente de modulação (Hille, 2001).

Os canais sensíveis a voltagem possuem características biofísicas peculiares, que são os processos cinéticos de ativação e inativação. A ativação pode ser definida como o processo pelo qual o canal sai de um estado não condutor de íons para um estado condutor. Já o processo de inativação é caracterizado pela diminuição da condução do íon pelo canal, mesmo na presença de um estímulo. Diferenças nas cinéticas, tanto de ativação como de inativação, caracterizam os canais, fazendo com que cada um possua uma característica biofísica distinta (Hille, 2001).

O PA cardíaco, em termos de formato, está intimamente relacionado com os comportamentos distintos, dependentes do tempo e da voltagem, de diferentes famílias de canais iônicos. A figura 3 (Nerbonne e Kass, 2005) resume a participação dos diferentes canais nas diferentes fases do PA. Outra característica do PA é que ele não é homogêneo em todas as células cardíacas, sendo que esta heterogeneidade é dependente da expressão diferenciada de canais iônicos nas várias regiões que constituem o coração. Porém, apesar dos diferentes formatos do PA, as fases que o constituem são basicamente as mesmas, conforme indicado pela figura 3. Resumidamente, as fases do PA podem ser assim caracterizadas, de acordo com Nerbonne e Kass (2005):

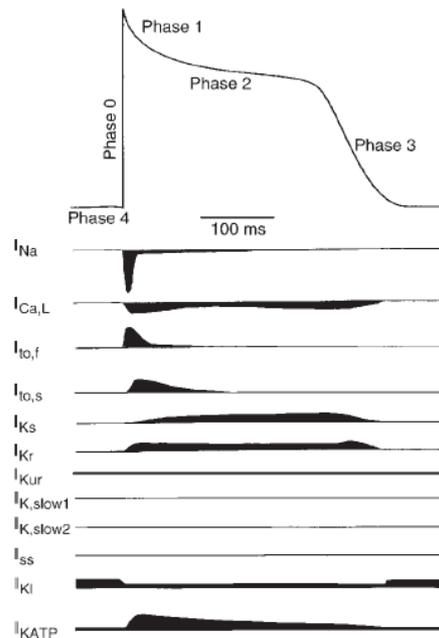
Fase 0: despolarização da célula cardíaca, caracterizada pela abertura dos canais de sódio e início da abertura dos canais de potássio transiente rápidos ( $I_{to,f}$ ) (em nosso estudo chamaremos  $I_{to,f}$  de  $I_{to}$ ). A  $I_{to,f}$  também participa ativamente da fase 1 do PA.

Fase 1: a despolarização causada pela abertura dos canais na fase 0, permite com que os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L ( $I_{Ca,L}$ ), mais freqüentes, e do tipo T ( $I_{Ca,T}$ ), menos freqüentes, sejam ativados. A entrada do cálcio por estes canais é responsável pela ativação da maquinaria contrátil da célula. Nessa fase contribuem de forma mais ativa a  $I_{to,f}$ .

Fase 2: a ativação da corrente de cálcio iniciada na fase 1 é mantida na fase 2, o que caracteriza o platô do PA. Além disso, nesta fase outros canais de potássio dependentes de voltagem, mas com uma cinética de ativação mais lenta, começam a ser ativados, contribuindo para a repolarização.

Fase 3: a corrente de cálcio é inativada e agora, as correntes de potássio restantes contribuem para o final da repolarização do PA. Nesta fase, os canais de potássio do tipo retificadores de entrada ( $I_{K1}$ ) apresentam papel fundamental, já que eles são ativados por hiperpolarização.

Fase 4: esse estágio equivale ao potencial de repouso da célula. Nessa fase, contribuem ativamente os  $I_{K1}$  e os canais de potássio sensíveis a ATP.



**Figura 3: Potencial de ação cardíaco típico e suas correntes.** Principais fases responsáveis pelo formato do potencial de ação no endocárdio de coração de cão. Na

parte inferior, principais correntes envolvidas no formato do potencial de ação cardíaco, bem como a fase do PA em que elas atuam. Extraído de Nerbonne e Kass (2005).

A Tabela 1 resume a participação dos canais iônicos, bem como as suas respectivas cinéticas de ativação e inativação, além do principal local do coração em que são encontrados.

**Tabela 1:** Canais iônicos presentes no coração e algumas propriedades cinéticas

Canal		Ativação	Inativação	Localização
Nav	$I_{Na}^*$	Muito Rápido	Rápido	A, P, V, NSA, NAV
Cav	$I_{Ca(L)}^*$	Rápido		A, P, V, NSA, NAV
	$I_{Ca(T)}$	Rápido		A, P, NSA, NAV
Kv(Ito)	$I_{to,f}^*$	Rápido	Rápido	A, P, V
	$I_{to,s}$	Rápido	Intermediário	V
Kv(Ik)	$I_{kr}^*$	Médio	Muito lento	A, P, V, NSA, NAV
	$I_{ks}$	Muito lento	Lento	A, P, V, NSA
	$I_{k,slow1}^*$	Muito rápido	Lento	A, V
	$I_{k,slow2}^*$	Rápido	Muito lento	A, V
	$I_{ss}^*$	Lento	Não inativa	A, V, NAV
	$I_{k1}^*$	-	-	A, P, V

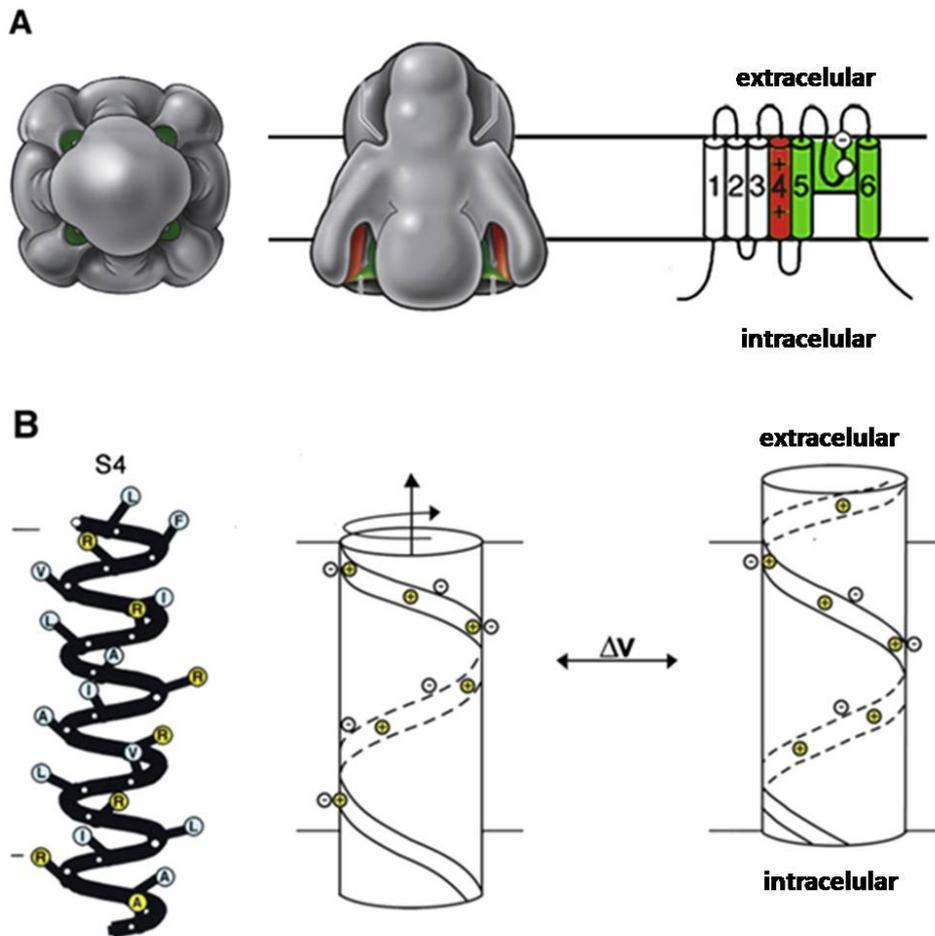
A, atrial; P, purkinge; V, ventricular; NSA, nodo sinoatrial; NAV, nodo atrioventricular;  
\* encontrado em camundongos. Adaptada de Nerbonne e Kass (2005).

### ***Estrutura básica dos canais iônicos dependentes de voltagem***

Como o próprio nome sugere, os canais iônicos dependentes de voltagem possuem regulação de seus processos cinéticos dependente da variação do potencial elétrico da membrana celular. A grande maioria dos canais é constituída por uma

subunidade alfa, unidade formadora do poro e detentora do sensor de voltagem, podendo ou não possuir subunidades auxiliares, que permitem a modulação da atividade do canal (Hille, 2001).

Cada subunidade alfa é constituída por 4 domínios, que são formados por 6 segmentos transmembrana (S1 a S6). O segmento 4 (S4) possui o sensor de voltagem, carregado positivamente. Este segmento é o principal responsável pelo funcionamento dependente de voltagem dessa família de canais iônicos. Entre os segmentos S5 e S6 ocorre à formação de uma alça, sendo que ela é responsável pela formação do poro e do filtro de seletividade, o qual é o principal responsável pela especificidade do canal para um determinado íon, porém outros fatores auxiliam na seletividade do canal, como o íon envolvido no transporte. A figura 4 ilustra a estrutura básica de um canal iônico e suas principais estruturas moleculares.



**Figura 4: Canal de sódio voltagem-dependente.** (A) (esquerda) Desenho representativo de um canal de sódio purificado, como se fosse visto do meio extracelular e do espaço intramembrana, evidenciando seus 4 domínios. (direita) Diagrama dos segmentos transmembrana de um único domínio de um canal voltagem

dependente. A alça entre os segmentos S5-S6 forma o filtro de seletividade do canal. (B) (esquerda) O segmento S4 no domínio IV do canal  $\text{Na}_v$  desenhado como uma  $\alpha$ -hélice. Esse segmento é único, pois possui sete cargas passíveis de sensibilidade à variação de voltagem. (direita) O segmento S4 desenhado como um cilindro com um anel de cargas positivas, graças às cargas do aminoácido arginina, a qual é neutralizada por cargas de aminoácidos dos segmentos transmembrana que a rodeiam. Mudanças no potencial de membrana causam o movimento do segmento S4 para fora, ou ao longo da membrana em movimento espiral. Esse segmento é o responsável pelo sensor de voltagem do canal. (Adaptado de Catterall, 2010).

### *Canais para Sódio*

Existem, até o momento, 10 tipos de canais para sódio, sendo que em cardiomiócitos estão presentes os Nav 1.1, 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6 (Nerbonne e Kass, 2005), sendo o que o mais encontrado no cardiomiócito é o Nav 1.5.

A  $I_{\text{Na}}$  é a responsável pela despolarização rápida da membrana da célula cardíaca. Além disso, ele participa da fase de repolarização do PA, já que alguns canais Nav 1.5 podem reabrir durante a fase de platô, gerando a corrente persistente de sódio (Sakmann et al., 2000). Nav 1.5 é uma proteína de membrana glicosilada, com peso molecular ao redor de ~220 kDa, com 2015 ou 2016 aminoácidos, sendo essa sequência formadora da subunidade principal do canal, a subunidade  $\alpha$ . Alguns dos domínios citoplasmáticos (os *linkers loops* entre as subunidades e o N e C terminal) possuem domínios que interagem com diferentes proteínas como, anquirina-G e calmodulina, dentre outras, sendo que essa interação é capaz de modular a biofísica desses canais. A anquirina é uma proteína importante, envolvida na organização, transporte e ancoramento dos canais iônicos na actina e espectrina, proteínas do citoesqueleto (Cunha e Mohler, 2006), sendo que alterações nessa proteína causam redução na expressão, tráfego anormal para a membrana e reduzida densidade de corrente gerada por Nav 1.5 (Lowe et al., 2008). Além disso, o sensor de cálcio calmodulina pode interagir com o Nav 1.5, o qual contribuiria para uma redução da densidade de corrente (Casini et al., 2009), porém esse é um tópico em aberto da literatura, com alguns dados contraditórios. Além de interagir com essas proteínas, o canal Nav possui também

subunidades  $\beta$  (1-5), sendo que tal interação é capaz de modular a função desses canais, regulando a sua biofísica, presença na membrana e localização (Meadowns e Isom, 2005). Além disso, centenas de variações genéticas têm sido implicadas ao gene do Nav 1.5 (SCN5A) em pacientes com diferentes cardiopatias, o que o torna um importante alvo de estudos (Zimer e Surber, 2008; Keating e Sanguinetti, 2001).

As características que favorecem a participação dos Nav 1.5 na origem do potencial de ação é a magnitude da corrente gerada pela ativação desses canais (>200 nA, quando o usual é algo ao redor de 1 a 10 nA em cardiomiócitos) além de possuírem uma cinética de ativação (ordem de microssegundos) e inativação (ordem de milissegundos) extremamente rápidas (Nerbonne e Kass, 2005).

### *Canais para Cálcio*

Nos cardiomiócitos, a corrente de cálcio do tipo-L proporciona o principal influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo um versátil e universal mensageiro intracelular. O influxo de cálcio por esse canal inicia uma diversidade de processos, desde um importante papel na eletrogênese e na regulação da contração celular, bem como participa da regulação da expressão gênica (Benitah et al., 2010).

O principal tipo de canal de cálcio presente nos cardiomiócitos de roedores de pequeno porte adultos são os canais do Tipo L. Essa família de canais possui diversas subunidades regulatórias/auxiliares, das quais as mais conhecidas são  $\alpha 2\delta$ ,  $\beta 2$  e  $\gamma$ . Existem basicamente 3 subfamílias de canais de cálcio, sendo que as Cav1.x são as responsáveis pelo fenótipo de corrente L e a Cav3.z forma a corrente denominada T. Tal subdivisão é, porém, controversa na literatura. A principal família formadora da corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  no miócito cardíaco corresponde ao fenótipo da Cav1.2  $\tilde{\alpha}1\text{C}$  (Nerbonne e Kass, 2005). O gene que codifica o Cav1.2 é o CACNA1C ou  $\alpha 1\text{C}$ ; (Bodi et al., 2005).

Os aspectos funcionais das subunidades descritas foram principalmente estudados em sistemas de expressão heteróloga. Quando a subunidade principal  $\alpha 1\text{C}$  é expressa juntamente com a  $\alpha 2\delta$  ocorre um aumento de duas vezes na corrente de cálcio, bem como aumento na corrente de ‘gating’. Além disso, essa subunidade auxiliar altera as propriedades de abertura e fechamento do canal. Por esses motivos, sugere-se

que tal subunidade possua papel importante na formação de canais funcionas na membrana plasmática. Já a subunidade beta, quando expressa em conjunto com  $\alpha 1c$ , causa um aumento na corrente, bem como acelera a cinética de ativação e inativação. Além disso, a subunidade beta está envolvida na modulação adrenérgica dos canais de cálcio (Nerbonne e Kass, 2005).

Além das subunidades auxiliares, outras moléculas participam da modulação da subunidade  $\alpha$ -1C. Os domínios EF e IQ, por exemplo, são sítios de interação com os íons cálcio e com o complexo Ca-calmodulina, que participa na modulação do processo de inativação desses canais (Peterson et al., 1999; Peterson et al., 2000).

Em função da importância da  $I_{Ca,L}$  em regular a contração e fisiologia celular do miócito cardíaco, durante o estabelecimento de diferentes doenças cardíacas, ocorre uma alteração dessa corrente. Pensa-se que durante um estado compensando de hipertrofia, ocorre um aumento da  $I_{Ca,L}$ , a qual, quando normalizada pela capacitância celular, é igual à da situação controle (Song et al., 2005; Gomez et al., 1997; McCall et al., 1998), sendo que a transição para insuficiência cardíaca é acompanhada por uma redução na densidade de corrente (Ming et al., 1994). Entretanto, esses dados ainda não são consenso na literatura (Gomez et al., 1997).

Diferentemente da  $I_{Na}$ , a  $I_{Ca,L}$  é responsável pela ativação do processo de contração muscular (Gomez et al., 1997). A cinética de ativação dessa corrente é mais lenta que a das de sódio, sendo que para alcançar o pico, demora-se cerca de 10 a 20 milisegundos. Além disso, o processo de inativação também é mais lento do que o que ocorre com a  $I_{Na}$ , sendo que variações nele, mesmo que sutis, alteram o formato do PA.

### *Canais para Potássio*

Apesar de os canais de sódio e cálcio possuírem uma razoável heterogeneidade, a família de canais de potássio apresenta a maior diversidade molecular até então descrita para os canais iônicos. Existe uma vasta gama dessa família de proteínas sintetizadas no coração, que contribuem para a formação das correntes macroscópicas. Apesar dessa heterogeneidade, existem basicamente 3 tipos de correntes presentes no coração: correntes transientes, que ativam e inativam rapidamente, correntes retificadoras retardadas, com diferentes cinéticas de ativação e inativação, e correntes retificadoras de entrada (Nerbonne e Kass, 2005).

## Correntes retificadoras de entrada

Nas células musculares cardíacas são encontradas principalmente três correntes retificadoras de entrada:  $I_{K1}$  (Kir 2),  $I_{Katp}$  (Kir 6) e  $I_{KACH}$  (Kir 3), sendo que nem todos os subtipos são expressos no tecido cardíaco. Nos últimos tempos, diferentes pesquisas têm demonstrado que os papéis dessas correntes vão além da participação no controle do potencial de membrana, e contribuir para a fase final da repolarização do potencial de ação, sendo suas funções estendidas para um controle geral da estabilidade elétrica da célula muscular cardíaca (Anumonwo e Lopatin, 2010).

Antigamente, o fenômeno de retificação observado era atribuído a um mecanismo intrínseco do canal ou a uma retificação dependente de  $Mg^{2+}$ , entretanto em um elegante trabalho realizado por Lopatin and cols (1994) demonstrou-se que esse mecanismo é um bloqueio dependente de voltagem, sendo o poro do canal bloqueado por diferentes poliaminas, como espermina, espermidina, putrescina e cadaverina. Estruturalmente, os Kir são formados por um tetrâmero, sendo cada um constituído por dois segmentos transmembrana.

Os modelos animais transgênicos permitiram compreender melhor a contribuição do  $I_{K1}$  na fisiologia do cardiomiócito, porém os resultados não são homogêneos, já que diferentes modelos de transgenia são utilizados atualmente. Quando considerado o camundongo, no animal com dominância negativa para  $I_{K1}$ , foi observado um aumento da duração do potencial de ação, bem como do intervalo QT, sem alteração na densidade de corrente das demais correntes de potássio. (McLerie e Lopatin, 2003). Quando foi estudada uma linhagem de camundongo que supreexpressava  $I_{K1}$ , foi observado que esses animais possuíam um encurtamento do potencial de ação, bem como um encurtamento da onda QT. Além disso, apresentaram contrações prematuras, bloqueio atrioventricular e fibrilação atrial (McLerie e Lopatin, 2004). Quando consideradas doenças humanas associadas a alterações na fisiologia desse canal, tem-se tanto doenças associadas a uma perda (síndrome do QT longo (Zhang et al., 2005)) ou ganho (uma das variantes do QT curto (Priori et al. 2005)) de função.

## Corrente de potássio transiente de saída ( $I_{to}$ )

A corrente transiente rápida de potássio possui papel fundamental, principalmente na fase inicial de repolarização, bem como na região de platô do PA cardíaco, importância devida principalmente a sua rápida cinética de ativação, como também elevada densidade de corrente, sendo que em camundongo a sua importância no processo de repolarização do PA ha tempos já é conhecida (Benndorf e Nilius, 1988). Atualmente, são reconhecidas duas formas de corrente transiente de saída, a  $I_{to}$  rápida ( $I_{tof}$ ) e lenta ( $I_{to,s}$ ). Do ponto de vista molecular, a  $I_{to,f}$  é constituída principalmente pelo  $K_v$  4.3 e 4.2 (Brahmajothi et al., 1999), com algumas variantes entre espécies (Rota et al., 2007). Os domínios intracelulares (*loops* entre os segmentos 2-3, 4-5 e o C e N terminal) possuem inúmeros pontos de fosforilação, bem como interação com ERK e CAMKII, sendo importantes moduladores das propriedades biofísicas desse canal (Niwa e Nerbonne, 2010). Diferentes subunidades auxiliares, tais como DDPP6, minK, KCHIP2 e  $Bv\beta x$  também modulam as propriedades da  $I_{to,f}$ . Por exemplo, a deleção da KCHIP2 praticamente elimina o fenótipo da  $I_{to,f}$  em ventrículo de camundongo, gerando inúmeras alterações no ECG desses animais, principalmente processos arrítmicos (Kuo et al., 2001).

## ***Acoplamento excitação-contração e seus componentes***

O trabalho mecânico desempenhado pelo coração é regido por um fino controle da  $[Ca]_i$ , o qual varia espaço-temporalmente de forma regulada ao longo do processo da contração. O mecanismo básico de ativação dessa maquinaria contrátil ocorre, inicialmente, pela ativação dos canais iônicos presentes na membrana, principalmente devido a ativação dos canais sensíveis a voltagem, sendo que a  $I_{Ca,L}$  permite de forma indireta a elevação da concentração citoplasmática de  $Ca^{2+}$ , sendo este o responsável pela ativação da contração celular (Bers, 2001). Existem diversas estruturas presentes em tal processo que permitem com que ele funcione de forma coordenada e regulada, apresentadas a seguir.

### *Principais componentes do retículo sarcoplasmático*

A principal organela que estoca o  $Ca_i$  é o retículo sarcoplasmático (RS). No RS são encontrados importantes receptores, canais e proteínas, que regulam a entrada e a saída de  $Ca^{2+}$  desse compartimento. O efluxo de  $Ca^{2+}$  do RS durante a contração celular ocorre através do canal/receptor de rianodina (RyR), presente na membrana da organela. O RyR é uma proteína (com massa molecular de 565 kDa) e se apresenta como um tetrâmero (~2,2 MDa). Além disso, o RyR serve como ponto de ancoragem para diversas outras proteínas presentes no RS, tornando-o, de certa forma, um complexo macromolecular. Tanto no domínio citosólico quanto no domínio voltado para o lúmen, o complexo macromolecular RyR possui diversos pontos de regulação por: Cálcio-Calmodulina, proteína cinase A (PKA) e Óxido Nítrico (Bers, 2004).

Além do RyR, na membrana do RS é encontrada uma bomba, denominada  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático, do subtipo 2A (denominaremos de SERCA2A). Tal bomba é um dos elementos importantes na homeostase do cálcio intracelular, e à custa de ATP, promove a recaptura deste íon para dentro do RS durante o processo de diástole. A SERCA2A apresenta aproximadamente 100 kDa, possui 10 domínios transmembrana (m1-a-m10) e um sítio que é alvo de uma fosfoproteína denominada fosfolambana (PLB), que regula a sua atividade (Bers, 2004). A PLB é um inibidor endógeno da SERCA2A. Essa fosfoproteína pode ser fosforilada pela PKA ou pela calmodulina cinase II (CaMII). A fosforilação da PLB promove a sua dissociação da SERCA2A, tornando a atividade da bomba e a recaptura de cálcio aceleradas (Haghighi, Gregory e Kranias, 2004).

### *Trocador sódio-cálcio*

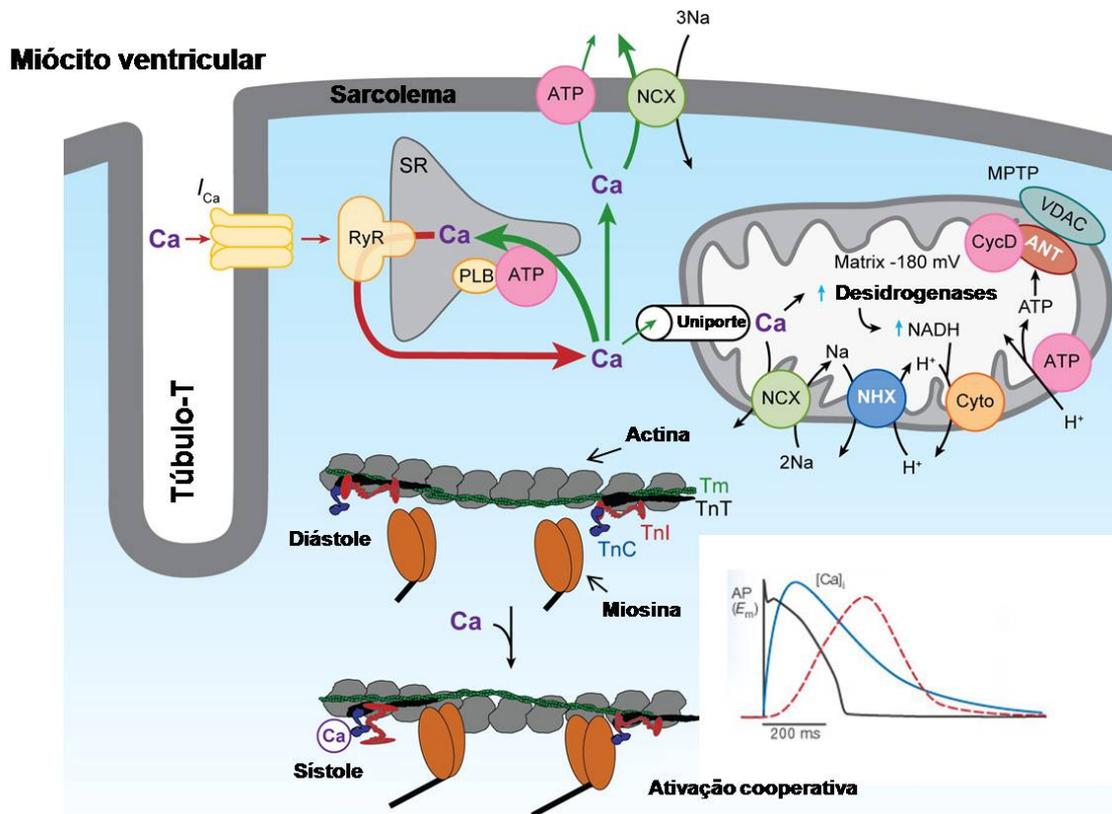
O trocador sódio-cálcio ( $I_{NaXCa}$ ) é um transportador que possui 9 segmentos transmembrana, com um domínio intracelular (Blaustein, Lederer, 1999). Além disso, a estrutura molecular do trocador possui diversos sítios para regulação bioquímica por diferentes vias. O trocador é capaz de ser regulado tanto pela  $[Ca]_i$  quanto pela  $[Na]_i$ , em sítios específicos (Reppel et al., 2007).

### ***O acoplamento excitação-contração***

O AEC é um processo no qual o componente elétrico dispara a maquinaria contrátil. Esse processo é descrito de forma resumida a seguir.

O potencial de ação que é propagado na membrana sarcoplasmática chega até os túbulos T, onde estão presentes os canais de cálcio do tipo L dependentes de voltagem. Esses canais, pela ativação de seus sensores de voltagem, permitem que ocorra um influxo de cálcio do meio extracelular para o intracelular. O cálcio ativa os receptores RyR, que também podem ser vistos como canais iônicos que, quando ativados, permitem que o cálcio estocado no retículo sarcoplasmático seja liberado em favor de seu gradiente eletroquímico. O cálcio liberado irá ativar a maquinaria contrátil, deflagrando a contração celular.

Após o processo de contração, o cálcio precisa ser recapturado para que o ciclo de contração cesse, e possa ser reiniciado posteriormente. Tal função é desempenhada, inicialmente, pela SERCA2A, que às custas de ATP, consegue restabelecer o gradiente eletroquímico para o cálcio, bombeando o íon do citosol para o lúmen do RS. Esta bomba é responsável por cerca de 70 a 90% da recaptura do  $\text{Ca}^{2+}$  liberado no processo de contração, variando de acordo com a espécie. Além disso, o trocador Na/Ca também tem sua atividade estimulada no período de relaxamento (extrusão de cálcio). Ele é responsável por 7-20% da extrusão do íon cálcio, dependendo da espécie. O restante do cálcio é recapturado pelos transportadores mitocondriais, ou é transportado para fora da célula pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da sarcolema. Dessa forma, após o processo de recaptura de cálcio, a célula está novamente apta a realizar a contração celular (Bers, 2008). A figura 5 ilustra o processo descrito.



**Figura 5: Transporte de Cálcio, ativação dos miofilamentos e manuseio de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria em miócito ventricular.** O Fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e o ciclo de  $\text{Ca}^{2+}$ , induzindo liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático (SR) através do canal de rianodina (RyR), ativa os miofilamentos. O  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à troponina C (TnC) e, ao favorecer a interação da TnC com a troponina I (TnI), faz com que a TnI se desloque do sítio ativo da actina, permitindo o deslocamento da tropomiosina (TmT) e da troponina T (TnT), o que permite a interação miosina-actina. Após a ocorrência da contração, o  $\text{Ca}^{2+}$  é recaptado principalmente pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (ATP), a qual tem sua atividade modulada pela fosfolambana (PLB). Adicionalmente, o  $\text{Ca}^{2+}$  pode ser transportado para o interior da mitocôndria via o transportador uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e colocado no citoplasma pelo transportador antiporte Na/Ca (NCX). O sódio é colocado para fora da mitocôndria graças à presença de uma bomba eletroneutra Na/H (NHX), e os  $\text{H}^+$  são exportados pela cadeia transportadora de elétrons, sendo essa extrusão acoplada à geração de ATP. O aumento no  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial ativa desidrogenases que provem espécies reduzidas (NADH) para estimular a síntese de ATP. O gradiente potencial estabelecido pela mitocôndria é mantido graças ao auxílio do poro de permeabilidade transitória mitocondrial, que é composto pelo canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), translocador de nucleotídeo adenina e ciclofilidina D

(Adaptado de Bers, 2008). O *inset* representa o acoplamento eletromecânico existente na célula cardíaca. A onda inicial, o potencial de ação, causa um aumento transitório na  $[Ca^{2+}]_i$ , seguido pela contração celular. Cessado o estímulo elétrico, a liberação de  $Ca^{2+}$  é findada, e a  $[Ca^{2+}]_i$  retorna para os valores basais, graças à atuação das bombas e transportadores de  $Ca^{2+}$ , permitindo assim o relaxamento do miócito ventricular cardíaco. (Adaptado de Bers, 2002).

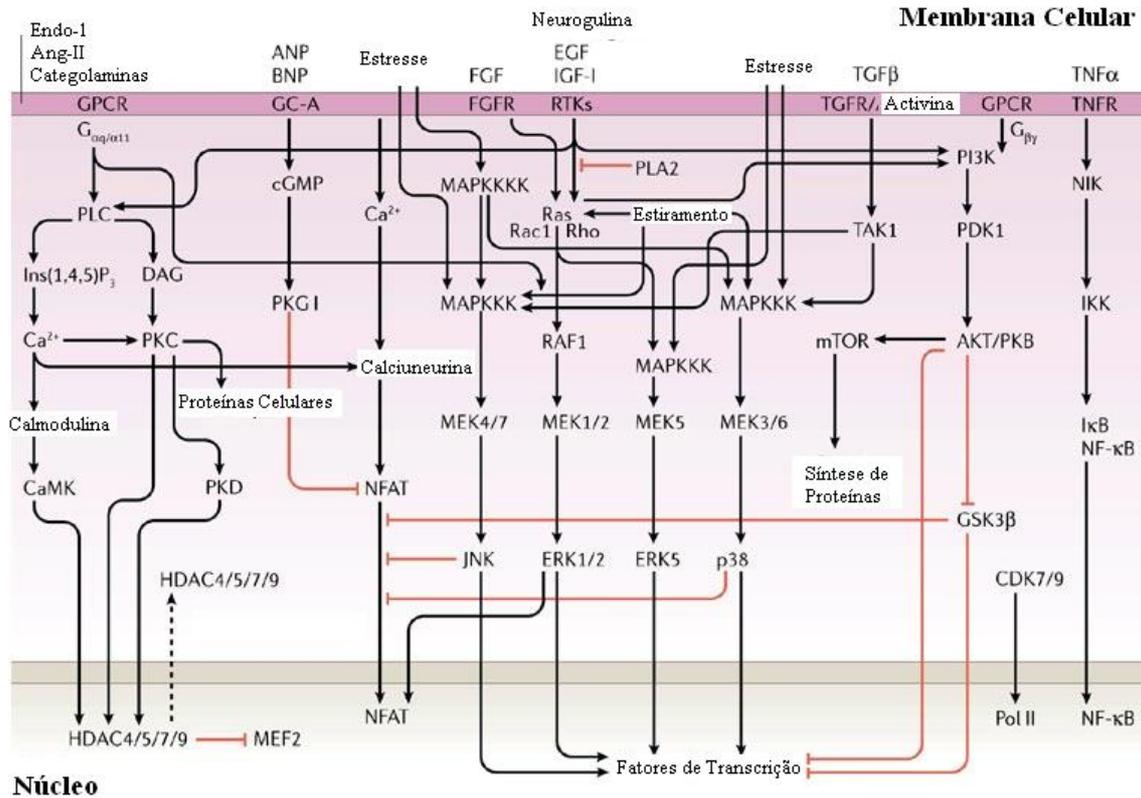
## **Doenças Cardíacas**

As doenças cardiovasculares (DVCs) emergiram como doenças crônicas prevalentes em muitas partes do mundo e agora, ao longo do séc XXI irão se tornar a principal causa de invalidez e morte em todo o globo. Dados epidemiológicos mostram que no começo do séc XX, as DVCs eram responsáveis por menos de 10% de todas as mortes em todo o mundo. Já no começo do século XXI, as DVCs eram responsáveis por pelo menos metade de todas as mortes no mundo desenvolvido e por 25% no mundo em desenvolvimento (OMS, 2002). Além disso, por volta de 2020, as DVCs serão responsáveis por extinguir 25 milhões de vidas a cada ano e que a doença cardíaca coronariana superará as doenças infecciosas como a causa número 1 de morte e de invalidez. Dentre as doenças cardíacas, podemos dizer que a cardiomiopatia hipertrófica, miocardite e a insuficiência miocárdica, são os mais recorrentes na origem de problemas cardiovasculares (Zipes et al., 2006).

### ***Hipertrofia do miócito cardíaco***

Hipertrofia cardíaca é uma resposta do miocárdio aos vários estímulos, patológicos e fisiológicos, mecânicos e hormonais, que causam uma sobrecarga de trabalho ao coração. O mecanismo básico de adaptação do coração, quando sujeito a uma sobrecarga de trabalho, é causar um aumento na sua massa muscular. Cardiomiócitos expandem seu tamanho e aumentam sua síntese de proteínas através da inicialização de uma resposta hipertrófica (Selvetella e Lembo, 2005). O aumento da carga no coração causa a liberação e secreção de mediadores neurohumorais, fatores de crescimento e citocinas, que contribuem para o aumento da massa cardíaca. Diversas

moléculas têm sido descritas como possuidoras de papéis importantes na modulação do remodelamento cardíaco observado no quadro de hipertrofia. Entre essas moléculas, pode-se destacar angiotensina II, endotelina-1, fator básico de crescimento do fibroblasto, interleucina-6, dentre outros (Tarone e Lembo, 2003; Lips, et al., 2003). Existem diferentes vias envolvidas na ativação da resposta hipertrófica, formando uma complexa rede de estímulos, que culminam na resposta final de crescimento da célula cardíaca. Um sumário dessas respostas é apresentado na figura 6.



**Figura 6: Estímulos que induzem a hipertrofia em célula muscular cardíaca.** A sinalização que inicia o processo é mostrada no exterior celular, sendo os intermediários que transduzem esse sinal constituído por varias cinases e fosfatases, que são ilustradas no meio da figura. O núcleo é o efetor final, e está representado na parte inferior. ANP, peptídeo natriurético atrial; Ang II, angiotensina II, BNP, peptídeo natriurético do tipo B; CaMK, cinase dependente de calmodulina; CDK, cinase dependente de ciclina; DAG, diacilglicerol; EGF, fator de crescimento epidermal; Endo-1, endotelina-1; ERK, cinase regulada por sinal extracelular; FGF, fator de crescimento de fibroblasto; FGFR, receptor do FGF; GC-A, guanil ciclase-A; GPCR, receptor acoplado à proteína-G; GSK3β, glicogenio sintase cinase; 3-β HDAC, deacetilase de histona; IκB, inibidor do NF-κB. IGF-I fator-1 de crescimento similar a insulina; IKK, inibidor da NF-κB; IP3,

inositol-1,4,5-trisfosfato; JNK, cinase c-Jun N-terminal; MAPKKK, proteína cinase cinase cinase ativadora de mitógeno; MAPKKKK, MAPKKK cinase; MEF, fator ativador do miócito; MEK, proteína cinase cinase ativadora de mitógeno; mTOR, alvo de mamíferos da rapamicina; NFAT, fator nuclear de células T ativadas; NF- $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ B; NIK, cinase indutora de NF- $\kappa$ B; PDK, cinase dependente de fosfoinosítido; PI3K, cinase-3 fosfatilinositol; PKB, proteína cinase B; proteína cinase C; PKD, proteína cinase D; PLA2, fosfolipase A2; PLC, fosfolipase C; Pol II, polimerase II de RNA, RKT, receptor tirosino-cinase; TAK, TGF- $\beta$ , cinase ativada; TGF-b, fator-b de transformação do crescimento; TGFR, receptor TGF; TNF- $\alpha$ , fator- $\alpha$  de necrose tumoral; TNFR, receptor do TNF- $\alpha$ . Adaptado de Heineke e Molkenin (2006).

### ***Miocardite***

A miocardite é um processo inflamatório, cuja origem pode ser microbiana (por protozoários - como o *Trypanosoma cruzi* -, viral, bacteriana ou fúngica) ou de causa idiopática. De uma forma geral, a entidade inflamatória se aloja no tecido cardíaco, gerando a ativação da resposta humoral e celular do sistema imunológico do hospedeiro. A ativação da imunidade inata, que é uma resposta inicial (melhor discutida posteriormente), ou da imunidade adaptativa, em uma resposta inflamatória crônica, leva a ativação de diferentes tipos celulares, culminando com a produção local de moléculas citotóxicas, que tem como objetivo final, encerrar a infecção localizada. Dentre as moléculas produzidas, temos as citocinas, sendo que muitas delas vêm sendo estudadas por diferentes grupos (Kolattukudy et al., 1998, Goldhaber et al., 1996, Krown et al., 1996). Evidências mostram que essas moléculas são capazes de modular diretamente a função da célula muscular cardíaca, podendo deprimir ou potencializar a função contrátil do cardiomiócito, provavelmente por interferirem na dinâmica intracelular de cálcio (Roman-Campos et al., 2009, Goldhaber et al., 1996, Krown et al., 1996). A miocardite pode induzir diferentes alterações na fisiologia cardíaca, levando a infarto, microaneurismas, taquicardia ventricular, dentre várias outras manifestações.

A manifestação de cada uma dessas características patológicas dependerá do grau da miocardite que pode ser: fulminante, associada a uma disfunção ventricular

grave; subaguda, caracterizada por uma redução moderada da função do miocárdio; crônica persistente, com função ventricular normal e crônica ativa, que se assemelha a subaguda quanto à disfunção ventricular, com a distinção que já está instalada há um longo período, que geralmente culmina com a instalação de uma cardiopatia não dilatada (Zipes et al., 2006). Apesar da importância da miocardite como origem de importantes processos descompensatórios da função ventricular, pouco se conhece sobre a evolução e participação da miocardite no remodelamento celular dos miócitos cardíacos.

### ***Insuficiência Cardíaca***

A insuficiência cardíaca (IC) é o estado fisiopatológico em que o coração é incapaz de bombear sangue em quantidade suficiente para suprir as necessidades metabólicas dos tecidos ou só pode fazê-lo a elevadas pressões de enchimento. Além disso, ela é uma síndrome clínica complexa, que pode decorrer de qualquer transtorno estrutural ou funcional cardíaco que prejudique a capacidade dos ventrículos de se encherem de sangue ou de ejetarem o sangue. A insuficiência é causada frequentemente, porém não em todos os casos, por um defeito na contração do miocárdio; ou seja, por insuficiência miocárdica. A insuficiência cardíaca pode ser causada por morte de miócitos, disfunção dos miócitos, remodelamento ventricular (incluindo remodelamento de matriz), ou a combinação desses fatores. A insuficiência do miocárdio pode estar associada à disfunção sistólica, disfunção diastólica ou, mais comumente, a ambas (Zipes et al., 2006).

O coração é um órgão com uma capacidade finita de manter o desempenho cardíaco na presença de uma sobrecarga hemodinâmica. Quando essa sobrecarga é mantida cronicamente, os mecanismos adaptativos passam a ser não adaptativos, culminando com a instalação da IC.

Apesar de controvérsias existentes acerca da insuficiência miocárdica presente na IC, é consenso que existe uma redução da capacidade contrátil da célula cardíaca. Existem diversos mecanismos propostos para explicar a redução da capacidade contrátil do miocárdio, bem como uma desaceleração do relaxamento. Dentre os diversos estudos, um dos dados menos controversos é que existe uma redução tanto da expressão quanto da atividade da SERCA2A (Vanderheyden et al., 2008; Gwathmey et al., 1987),

o que auxilia a explicar o retardo no processo de relaxamento da célula cardíaca. Além disso, outro achado importante é que existe uma superexpressão da  $I_{NaXCa}$  (Hasenfuss et al., 1999), o que causa um aumento da competição do cálcio liberado no relaxamento entre  $I_{NaXCa}$  e SERCA2A, desta forma contribuindo para uma redução, a longo prazo, do conteúdo do retículo sarcoplasmático de  $Ca^{2+}$ , outro fato bem caracterizado em modelos de IC (Terracciano et al., 2004; Denvir et al., 1995). Além das características alterações na dinâmica de cálcio presentes na IC, existem também alterações, principalmente nas correntes de potássio do tipo  $I_{to}$  e  $I_{K1}$ , as quais estão reduzidas na IC, sendo que elas contribuem para um aumento do tempo para repolarização do PA observado na grande maioria dos modelos de IC (Beuckelmann et al., 1993; Knollmann et al., 2000; Roman-Campos et al., 2010), porém não obrigatoriamente se observa uma alteração na da  $I_{to}$  e do PA em IC (Roman-Campos et al., 2009).

### ***Óxido Nítrico x Insuficiência Cardíaca***

Embora muitos estudos demonstrem uma relação entre uma expressão/atividade alterada da eNOS e disfunção contrátil no coração, uma ligação concreta entre doença e eNOS ainda é controversa (Massion et al., 2003). Isso se deve ao fato de que a deleção do gene da eNOS em modelo murino não produz efeito significativo no remodelamento ventricular após infarto do miocárdio (Scherrer-Crosbie et al., 2001), enquanto que uma superexpressão de eNOS mostrou-se benéfica (Jansses et al., 2004).

Diferentemente do proposto acima, estudos recentes têm demonstrado que inibição de nNOS pode diferir entre corações saudáveis e apresentando quadro de insuficiência cardíaca. Tanto a atividade quando a expressão da nNOS estão aumentadas em diferentes modelos de injúria cardíaca (Dawson et al., 2005), inclusive na IC (Damy et al., 2004).

Já para a forma induzida da NO, a iNOS, os estudos são mais recentes e ainda poucas conclusões podem ser tiradas sobre sua contribuição para o estabelecimento do remodelamento cardíaco na IC. Um dos dados mais consistentes sobre a participação da iNOS é que ela está superexpressa/ativa (Liu et al., 2005; Zhang et al 2007) na doença em questão, e que a inibição específica de sua isoforma por S-metilisotiolureia melhorou a função cardíaca, em um modelo canino de IC (Chen et al., 2002).

## Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é encontrada desde o sul dos Estados Unidos até a província de Chubut, na Patagônia Argentina. Em virtude de sua alta prevalência, morbidade e mortalidade, a DC constitui um dos mais graves problemas médico-sociais das Américas do Sul, Central e do México. Atualmente estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi*, sendo que a sua maioria reside na América Latina, onde é uma doença endêmica. Adicionalmente, mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. Além disso, em 2008 cerca de 10.000 pessoas morreram em decorrência da infecção por *T. cruzi*. (OMS, 2010). Em 1993, foi estimado pelo Banco Mundial, o impacto socioeconômico da DC nas Américas. Ela causa um ônus à vida do trabalhador maior do que todas as outras doenças tropicais em conjunto.

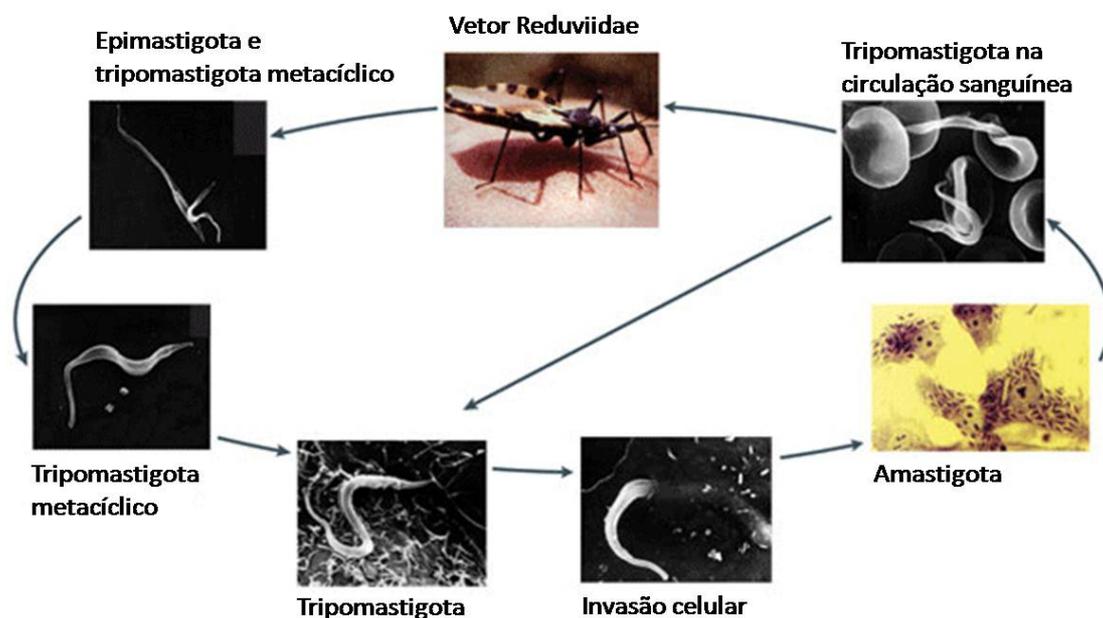
### *Agente etiológico da doença de Chagas (Trypanosoma cruzi), seu vetor invetrabrado (Triatoma infestans) e ciclo de vida*

Do ponto de vista taxonômico, O *T. cruzi* pertence ao reino **Protozoa**, filo **Euglenozoa**, classe **Kinetoplastidea**, ordem **Trypanosomatida**, família **Trypanosomatidae**, genero **Trypanosoma**.

O agente etiológico da DC é transmitido ao homem, principalmente por seu hospedeiro invertebrado hematófago, conhecido popularmente como barbeiro. Ele pertence à classe **Insecta**, ordem **Hemiptera**, família **Reduviidae**, subfamília **Triatominae**, em que estão agrupados os vetores do *Trypanosoma cruzi*, que são separados dos outros reduviídeos por seu hematofagismo. As principais espécies associadas à transmissão de *T. cruzi*, são *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma rubrosfasciata* e *Triatoma sordida*, sendo o primeiro o mais importante (Brener et al., 2000).

O ciclo natural de *T. cruzi*, que envolve o ser humano como hospedeiro, é resumido na figura 7. Um inseto infectado, membro da subfamília **Triatominae**, se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado (no caso, o homem), eliminando durante o repasto fezes próximas ao local. As fezes contêm *T. cruzi*, na forma epimastigota e

tripomastigota metacíclica. Essas entram no hospedeiro vertebrado através da ferida aberta durante a alimentação do inseto. Dentro do hospedeiro, o *T. cruzi* em sua forma tripomastigota é capaz de parasitar diferentes células. No interior das células, se diferenciam em amastigotas, iniciando o processo de replicação. Em seguida, após determinado número de ciclos de crescimento, de forma sincronizada, se transformam em tripomastigotas, causando a lise da célula infectada e liberando no interstício ou na circulação sanguínea *T. cruzi* em sua forma tripomastigota, na sua grande maioria. Esses são capazes de infectar outras células, ou reiniciar o ciclo, quando um Triatominae não infectado pica o hospedeiro vertebrado infectado (Andrade e Andrews, 2005).



**Figura 7: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Adaptado de (Andrade e Andrews, 2005).

Apesar de não existir uma classificação filogenética para a diversidade biológica encontrada em *T. cruzi*, existe a tentativa de agrupá-los de acordo com a evolução de seu ciclo e suas características no seu hospedeiro vertebrado, bem como o seu padrão isoenzimático. Essas atribuições permitiram a criação de três grupos, ou zimodemas 1, 2 e 3. Em função da falta de reprodução sexuada nesse grupo, que se faz principalmente por divisão binária, a diversidade biológica de seus grupos pode ser atribuída principalmente pela evolução independente de múltiplas linhas clonais, gerando assim distintas cepas de *T. cruzi* (Brener et al., 2000).

## ***Resposta imune à infecção pelo Trypanosoma cruzi***

A maioria do conhecimento básico sobre a interação do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro vertebrado deve-se a diversos modelos murinos, que até certo ponto apresentam um paralelismo com o sistema imune de humanos. De forma semelhante a outras infecções, o *T. cruzi* leva à ativação de distintos componentes do sistema imune, com ativação seqüenciada da resposta imune inata e adaptativa, em seus componentes humoral e celular.

A resposta imune inata humoral iniciada por *T. cruzi* deve-se principalmente à ativação da via alternativa do complemento. Entretanto, a forma infectiva do parasito (a tripomastigota) é capaz de evadir-se dessa resposta, sendo imune a ela. Essa habilidade está associada à expressão de diferentes proteínas na superfície do parasita, com propriedades de desestabilizar a C3-convertase depositada, inativando dessa forma a via alternativa do complemento. Esta tal habilidade proporciona ao parasita a capacidade de infectar com sucesso diferentes células do hospedeiro (Rimoldi et al., 1988).

O controle do crescimento do parasita no hospedeiro vertebrado deve-se principalmente à ativação de diferentes células do sistema imune, que são capazes de sintetizar diferentes moléculas com habilidade de controlar a reprodução do parasito no hospedeiro. Quando o *T. cruzi* infecta os macrófagos do hospedeiro, esse secreta a interleucina-12, que é capaz de ativar células NK (*natural killer*) a produzirem a citocina IFN- $\gamma$  (Aliberti et al., 1996). Esta age potencializando a resposta antimicrobica de macrófagos, contribuindo para a eliminação do parasita. Além disso, o TNF- $\alpha$  produzido pelos macrófagos atua sinergicamente à atividade da IL-12 e IFN- $\gamma$ . A principal função do IFN- $\gamma$  na fisiologia do macrófago durante a infecção deve-se à sua habilidade em estimular essa célula a produzir óxido nítrico (Gazzinelli et al., 1992), o qual é um importante microbicida, com atividade tóxica sobre o *T. cruzi*. Nesse caso, essas moléculas são produzidas no sitio da infecção. Entretanto, a produção crônica e exacerbada de NO pode gerar dano tecidual não específico (Fukai, 2009), constituindo-se um importante mecanismo envolvido no desenvolvimento da cardiopatia observada na fase crônica da doença de Chagas. Adicionalmente, a produção de diferentes atratores moleculares (as adressinas - moléculas de adesão como ELAM, VCAM e ICAM, dentre outras), favorece a migração dessas células para diferentes sítios de

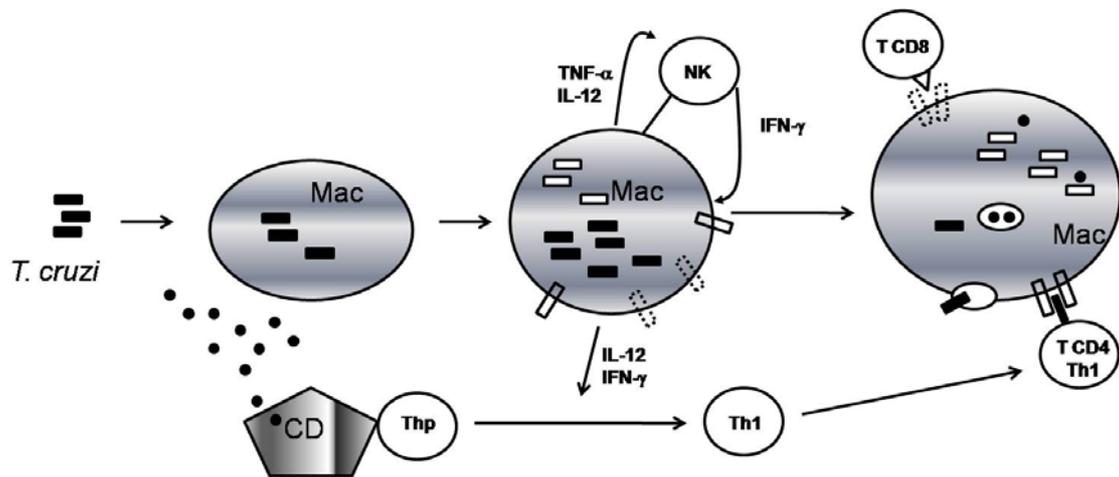
infecção, desenvolvendo assim uma resposta inflamatória em diferentes órgãos do hospedeiro (Laucella et al., 1996; Souto et al., 2010).

Após a ativação da imunidade inata, é necessário que ocorra uma redução da resposta inflamatória do hospedeiro ao parasito, para que os danos inespecíficos causados pela resposta ao parasito sejam reduzidos. Essa resposta é regulada pela produção de diferentes citocinas antiinflamatórias, como a IL-10 e TGF- $\beta$  (Howard et al., 1993). Elas, são capazes de reduzir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, modulando dessa forma a resposta imune celular inata (Gazzinelli et al., 1992). Importante de ser mencionado que o TGF- $\beta$ , por ser produzido por uma gama de células não linfóides, constituindo-se um importante mecanismo para o controle da replicação de *T. cruzi* em células que não linfóides.

A resposta imune adaptativa é uma resposta complexa originada no hospedeiro, que, associada à apresentação de antígeno, tenta propiciar uma resposta mais específica ao patógeno em questão, com a produção de anticorpos pelos linfócitos B ( no caso da infecção pro *T. cruzi* anticorpos líticos) e a diferenciação de células T CD 4 e T CD 8 para o reconhecimento de células infectadas do hospedeiro que precisam ser eliminadas. A resposta imune adaptativa celular, resumidamente, ocorre quando células dendríticas estimulam células T *naive* a se diferenciarem em células T CD4 Th1 e Th2, que possuem perfil específico de produção de citocinas. No curso da doença de Chagas, ocorre uma resposta do Tipo Th1, com produção principalmente de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Além disso, ocorre a diferenciação de células T *naive* em células T CD8 com sua ativação principalmente pela IL-2, que é produzida majoritariamente por linfócito T ativado por macrófagos. Cada uma das células está envolvida em processos celulares distintos. As células T CD4 estão envolvidas no reconhecimento de células do sistema linfóide infectadas pelo *T. cruzi*, devido ao reconhecimento do MHC-II. Já as células T CD8 estão envolvidas no reconhecimento de células não-linfóides, devido à apresentação pelo MHC-I. As células T CD8 são fundamentais, pois permitem ao sistema imune reconhecer células que não do sistema linfóide e que foram infectadas por *T. cruzi*. Isso é de suma importância, tendo em vista a capacidade infectiva do parasito ser estendida a basicamente todas as células do hospedeiro vertebrado (Brener et al., 2000; para uma revisão mais atual e completa ver Guitierrez et al., 2009). Cada uma das células mencionadas produz mediadores químicos específicos, tais como diferentes citocinas e quimiocinas, que permitem a modulação do sistema imune para

eliminar o parasito. A necessidade de ativação da resposta imune adaptativa é de extrema importância, tendo em vista o caráter crônico da infecção por *T. cruzi*. Inicialmente, pensava-se que na fase crônica da infecção existisse uma completa eliminação do parasito pelo sistema imune do hospedeiro, sendo que a inflamação crônica observada em diferentes modelos era atribuída, principalmente, a um caráter auto-imune da doença de Chagas (Egman e Leon, 2002).

O caráter auto-imune da DC foi atribuído, principalmente, à detecção de diferentes auto-anticorpos detectados durante o curso temporal da DC (Borba e Sterin-Borba, 1996, Cunha-Neto et al., 1995). Contudo, essa hipótese vem sendo colocada a prova, já que técnicas modernas de biologia molecular permitem, atualmente, através do PCR, detectar-se a presença do parasito no sangue, bem como em diferentes órgãos, p. ex., o coração (Anez et al., 1999). Tal apresentação contínua de antígenos observada na DC pode explicar a inflamação crônica observada na doença, que em associação com outros fatores, contribui para o estabelecimento da cardiopatia dilatada observada no estágio final da doença. Um resumo simplificado da ativação da resposta imune inata e o sua conexão com a ativação da resposta imune adaptativa é apresentado na figura 8.



**Figura 8: Principais componentes da resposta imune inata e adaptativa.** O *T. cruzi* (retângulos pretos), quando parasita seu hospedeiro, infecta os macrófagos (Mac), recrutando células *natural killer* (NK), sendo que outras células não ilustradas também são recrutadas. Esse processo de interação Mac-NK envolve a produção/secreção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e outras moléculas. O IFN- $\gamma$  produzido pelas NK potencializa a resposta microbicida do Mac, levando a uma elevada produção de óxido nítrico, induzindo a morte de alguns *T. cruzi* que parasitam os Mac (retângulos brancos). Esses estímulos levam a uma resposta do Mac, que começa a produzir em grande quantidade

moléculas MHC da classe II (retângulos contínuos na membrana do Mac) e I (retângulos pontilhados na membrana do Mac). Assim o Mac pode interagir com TCD8 e TCD4, com uma resposta do tipo Th1. A origem das células TCD4 e TCD8 são distintas. Essa interação potencializa ainda mais a resposta do Mac contra o *T. cruzi*. Os componentes ilustrados nesta figura representam a resposta inflamatória básica envolvidas na ativação da resposta imune inata e adaptativa durante a infecção por *T. cruzi*. Os componentes envolvidos no controle da inflamação, como IL-10 e TFG- $\beta$ , não são apresentados neste esquema. Adaptado de (Brenner et al., 2000).

Um detalhe importante envolvendo os diferentes modelos de camundongo utilizados no estudo da DC está no caráter específico de diferentes linhagens. Está bem demonstrado que, dependendo da linhagem utilizada, um determinado fenótipo será observado. Isso se deve principalmente à habilidade de uma determinada linhagem produzir uma resposta imune diferencial em relação a outra. Por exemplo, camundongos C57BL6 possuem uma produção inicial maior de IL-2 quando comparados ao camundongo C3H, o que confere ao primeiro uma maior resistência a infecção (Zhang e Tarleton, 1996).

### ***Aspectos cardíacos da infecção por T. cruzi: manifestações da fase aguda e crônica e influência da cepa***

A doença de Chagas pode ser dividida basicamente em duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda da DC ocorre uma grande expansão do número de parasitos na circulação sanguínea, bem como o número de ninhos observado no tecido cardíaco. Após o controle da parasitemia, realizada graças a um processo sinérgico entre imunidade inata e adaptativa, ocorre uma redução significativa do número de parasitos circulantes, sendo difícil sua detecção por métodos clássicos. Para a detecção de parasitos nessa fase da infecção, geralmente é necessário a utilização de técnicas de biologia molecular.

## *Fase aguda*

A mortalidade associada à fase aguda é reduzida. Considerando os aspectos cardiopatológicos da fase aguda, ocorrem diversos processos que podem originar um remodelamento eletromecânico no coração. Nessa fase é possível se detectar um infiltrado inflamatório mononuclear, congestão aguda e edema (dos Santos et al., 2001). A principal consequência do intenso infiltrado inflamatório observado na fase aguda é sua capacidade em originar uma intensa miocardite difusa, que pode originar dano ao miócito cardíaco, bem como ao sistema de vasos e inervação do coração. Apesar da associação entre n.º parasitos e miocardite parecer óbvia, diferentes dados da literatura demonstram que não existe uma relação clara nesse aspecto, sendo que alguns pontos atribuídos a essa falta de correlação sejam a resposta imune diferencial associada às diferentes cepas de *T. cruzi*, bem como ao tropismo preferencial apresentado pelas diferentes cepas por tecidos específicos (Souza et al., 1996). Além disso, na fase aguda é observada uma desnervação do sistema autonômico do coração, principalmente relacionada a uma destruição dos neurônios parassimpáticos e simpáticos (Machado e Ribeiro, 1989;). As manifestações clínicas características da DC na fase aguda são a taquicardia, a ligeira hipertrofia ventricular, e as alterações marcantes no ECG, como alternância de onda P (dissociação átrio-ventricular), distúrbios de repolarização, arritmias diversas, dentre outras (Brener et al., 2000).

Do ponto de vista celular, pouco se sabe sobre as possíveis alterações eletromecânicas que possivelmente ocorrem na DC na fase aguda. Considerando as alterações mecânicas do miócito ventricular, alguns trabalhos já demonstram uma redução na capacidade contrátil do miócito de animais infectados (Roman-Campos et al., 2009; Fernandez-Culasso et al., 1991), porém os mecanismos celulares associados à reduzida função da célula muscular cardíaca ainda não são conhecidos. Do ponto de vista das alterações da atividade elétrica dos miócitos cardíacos na fase aguda, pouco é conhecido. Um dos poucos relatos da literatura indica que ocorre um remodelamento elétrico da célula muscular cardíaca, com alterações marcantes na condutância ao potássio, que resultam em alterações no potencial de ação cardíaco (Paciorretty et al., 1995). Em um outro modelo de estudo, células musculares cardíacas agudamente infectadas em cultura com *Trypanosoma cruzi* demonstraram um aumento no automatismo da célula (Aprigliano et al., 1993). Interessantemente, em outro estudo foi

observada uma redução na conexão célula-célula (principalmente redução de conexina) de animais infectados com *T. cruzi*, sendo que esse poderia ser um dos substratos para os problemas de condução ventricular encontrados recorrentemente na doença de Chagas (de Carvalho et al., 1992). Além disso, é suposto um importante papel no remodelamento da dinâmica de cálcio intracelular de células do hospedeiro, dentre elas, o miócito ventricular (Tardieux et al., 1994, Barr et al., 1996 ). Porém, dados diretos, até o momento, não são encontrados na literatura, no que se refere a modelos de infectados.

### *Fase crônica*

A manifestação cardíaca observada na fase crônica da DC é um dos principais problemas decorrentes da infecção por *T. cruzi*. Ao redor de 30-40% das pessoas infectadas irão desenvolver, ao longo dos anos, o quadro sintomático e fisiopatológico da fase crônica da DC (OMS, 2010). Nessa fase da doença, a detecção do parasito no hospedeiro se torna difícil. Entretanto, é possível a detecção de uma inflamação crônica no tecido cardíaco, a despeito de um baixo número de *T. cruzi* no órgão em questão. As alterações marcantes observadas nessa fase da doença são o aspecto volumoso do coração, em função da dilatação de ambas as câmaras cardíacas, com eventual prevalência do ventrículo direito, com hipertrofia do músculo cardíaco (Brener et al., 2000; Andrade et al., 1978). O infiltrado inflamatório observado é predominantemente mononuclear difuso, sendo observado em conjunto uma fibrose profunda, tanto nas células ventriculares como no sistema condutor (Postan et al., 1986; Andrade et al., 1978). Além disso, é observado na interface fibrose infiltrado inflamatório/célula muscular cardíaca um comprometimento das células musculares, com alteração de sua forma. Além de o infiltrado inflamatório ser recorrente na vizinhança das células musculares, é possível encontrar o mesmo infiltrado ao longo de todo o tecido excitocondutor do coração, o que pode contribuir para as constantes alterações elétricas encontradas nessa fase da patologia, como bloqueio total/parcial de ramo direito e parcial de ramo esquerdo, bem como atrofia do nodo sinusal e destruição difusa do nodo átrio-ventricular (Brener et al., 2000). Uma outra característica importante dessa fase da DC é que em muitos modelos ocorre recobro da neurogeneração observada na fase aguda (Machado e Ribeiro, 1989; Machado et al., 1987). As alterações no sistema condutor do coração na fase crônica, bem como possíveis alterações das propriedades

elétricas do miócito cardíaco, contribuem de forma conjunta para a taquicardia ventricular sustentada, causada principalmente pelo fenômeno de reentrada (Scanavacca e Sosa, 1994). Apesar da importância desse fenômeno para as mortes associadas a essa fase da doença, pouco se sabe sobre as bases celulares de sua gênese.

### *Influência da cepa*

Em função das características genéticas e biológicas (p. ex. tropismo preferencial por determinado tecido) que constituem as diferentes cepas de *T. cruzi*, os resultados obtidos em modelos utilizando camundongos podem ser bem distintos. Considerando as 3 zimodemas, quanto ao curso temporal da infecção a I apresenta o pico da parasitemia ao redor do 10º dia pós-infecção, a II ao redor de 20 dias, e a III ao redor de 30-40 dias pós infecção (Brener et al., 2000). Como exemplo da zimodema I tem-se a cepa Y, da II a 21 SF e da III a cepa colombiana.

Como característica da zimodema I tem-se lesões miocárdicas inflamatórias na fase aguda, com tropismo dessa cepa para células do tecido cardíaco e nervoso, principalmente. Nos modelos utilizando essa cepa, foi observada intensa degeneração do sistema nervoso autonômico, principalmente do componente parassimpático. Já para as cepas da zimodema III, tem-se nítido miotropismo na fase aguda, com lesões miocárdicas proeminentes (Brener et al., 2000).

Uma característica importante de um estudo realizado com a cepa colombiana foi que esse modelo desenvolveu progressiva hipertrofia, com dilatação da câmara ventricular direita, similar ao que ocorre no homem (Kumar et al., 1969). Essa característica não foi observada em outras cepas de *T. cruzi*.

### ***Estresse oxidativo e Infecção por T. cruzi***

A produção de espécies reativas de oxigênio em condições não estressantes ocorre, normalmente, na grande maioria das células do hospedeiro vertebrado, principalmente devida ao escape de ânio superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) principalmente da cadeia transportadora de elétrons e enzimas microsossomais com atividade redox (Fisher, 2009).

O  $O_2^{*-}$  possui um importante papel no controle da homeostase celular, promovendo alteração no estado redox de diferentes proteínas, podendo modular a sua fosforilação, culminando assim no controle da proliferação e sobrevivência celular (Forman et al., 2004). Porém, durante infecção por algum agente microbiano, como por exemplo durante a infecção por *T. cruzi*, ocorre um aumento generalizado em diferentes células do hospedeiro vertebrado, com o objetivo de eliminar o parasito (Alvarez et al., 2004), sendo que esse aumento exagerado pode desempenhar um efeito deletério nas células do próprio hospedeiro (Bendall et al., 2002).

Devida à importância da sinalização por  $O_2^{*-}$ , ocorre uma compartimentalização da sua produção, na tentativa de delimitar a ação dessa substância (Fisher, 2009). A geração de superóxido pelas diferentes células do hospedeiro diferencia-se quanto ao tipo celular. Em células fagocíticas, a produção de superóxido tem como função primária eliminar o parasito, já nas demais células tem como principal objetivo ativar diferentes rotas de sinalização (Fisher, 2009). Alguns dos principais componentes envolvidos na produção de superóxido são as proteínas do complexo NADPH-oxidase, sendo formado por NOX1-5, e duas adicionais DUOX (para oxidase dual, que não possui evidência de importante papel no sistema cardiovascular). As NOX são expressas em diferentes células, sendo sua expressão regulada por distintas rotas de sinalização. Basicamente, as NOX são constituídas por um núcleo presente na membrana dos diferentes compartimentos celulares, formado por uma glicoproteína (gp) e uma outra proteína (p) (ausente em NOX-5). Além disso, diferentes componentes do meio intracelular são recrutados durante a ativação da atividade da NADPH-oxidase, sendo esse estímulo variado, como bactérias opsonizadas, diferentes citocinas ou lipopolissacárides de bactérias, sendo essas subunidades auxiliares necessárias para atividade da NOX1-3 (Akki et al., 2009). Em células cardíacas, até o momento foram detectadas NOX-2 e 4, sendo a localização da NOX-2 predominante na membrana celular e em algumas organelas membranosas. Já a NOX-4 é localizada principalmente na mitocôndria, sendo constitutivamente ativa. A ação do superóxido (produção direta) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (produção indireta) por NOX-2 envolve participação de canais de cloreto do tipo 3 (CIC-3) (Hawkins et al., 2007) e aquaporinas, respectivamente (Fisher, 2009). A difusão peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), porém, pode ocorrer livremente pela membrana. A atuação, tanto de  $O_2^{*-}$  quanto de  $H_2O_2$ , é

modulada pela presença de diferentes proteínas com papel antioxidante, como superóxido dismutase, catalase e glutathione oxidase.

Apesar da importância das NOX na geração de  $O_2^{*-}$  durante a infecção por *T. cruzi*, a maioria dos trabalhos estudou o papel do desacoplamento da cadeia respiratória de oxigênio na geração de  $O_2^{*-}$ . Esses estudos foram realizados por que ocorre um remodelamento na matriz mitocondrial com a evolução da infecção. Há uma redução na quantidade dos níveis de ATP, atribuída principalmente a um escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons, que são transferidos para o  $O_2$  molecular, contribuindo para uma produção constante de  $O_2^{*-}$  (Vyatkina et al., 2004). Além de ser observado um aumento na produção de  $O_2^{*-}$  na infecção por *T. cruzi*, tem-se que o sistema natural antioxidante está reduzido em modelo murino, como GSH e MnSOD, indicando que há um desbalanço entre produção e neutralização das espécies reativas de oxigênio (Gupta et al., 2009). A importância do estresse oxidativo pôde ser avaliada em modelo murino. Em um modelo de infecção por *T. cruzi*, quando os camundongos foram tratados com uma substância anti-oxidante (Fenil-N-tert-butilnitrona - PBN), foi observada uma melhora na atividade da cadeia respiratória, contribuindo para melhora dos danos cardíacos observados na fase aguda (Wen et al., 2006). Adicionalmente, em um modelo de rato, foi demonstrado que a privação de vitamina-E agravou o dano cardíaco e a inervação cardíaca durante a fase aguda da doença, o qual se correlacionou com um aumento do parasitismo tecidual (Carvalho et al., 2006). Além disso, em humanos infectados com *T. cruzi*, foi observada uma redução no estresse oxidativo de indivíduos tratados com vitamina-A (Macao et al., 2007)

Como mencionado anteriormente, sabe-se que durante a infecção por *T. cruzi*, ocorre um aumento generalizado na produção de  $O_2^{*-}$ , sendo o papel principal dessa molécula eliminar o patógeno. Apesar da importância do  $O_2^{*-}$  durante a infecção, o papel que as diferentes fontes de  $O_2^{*-}$  possuem na patogênese da doença de Chagas ainda permanece desconhecido.

## **JUSTIFICATIVA**

A doença de Chagas é uma morbidade que ainda aflige mais de 10 milhões de pessoas. Adicionalmente, mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. Além disso, em 2008, cerca de 10.000 pessoas morreram em decorrência da infecção por *T. cruzi*. A resposta imune decorrente da infecção por *T. cruzi* é um processo que ainda merece estudos, porém os mecanismos básicos envolvidos na eliminação do parasito pelo hospedeiro vertebrado já foram elucidados.

Desde o início das pesquisas sobre a doença de Chagas, sabe-se que o envolvimento do coração na fisiopatologia é um dos principais responsáveis pelas mortes observadas, tanto na fase aguda quanto na crônica. Apesar de ser a piora da função cardíaca ao longo da infecção, pouco se sabe sobre a gênese da cardiomiopatia. Poucos estudos até o momento foram realizados, avaliando a função da célula cardíaca em modelos animais infectados. Esse tipo de abordagem experimental permite avaliar de fato, o que ocorre com as propriedades eletromecânicas da célula cardíaca ao longo da infecção.

Adicionalmente, uma correlação entre a origem dos problemas cardíacos e a resposta imunológica pode ser uma importante informação sobre a habilidade do sistema imune em modular a fisiologia do tecido cardíaco, sendo que resultados nesse campo podem ser extrapolados para outras miocardites.

## **OBJETIVOS**

## **Objetivo geral**

Determinar as alterações eletromecânicas no miócito cardíaco na fase aguda da doença de Chagas e avaliar a influência de diferentes cepas (colombiana e Y) no estabelecimento da cardiomiopatia Chagásica.

## **Objetivos específicos**

Avaliar diferentes aspectos da função cardíaca e do miócito cardíaco durante a infecção de camundongos por *T. cruzi*, a saber:

- O curso temporal e a taxa de mortalidade ao longo da infecção com a cepa colombiana.
- O curso temporal da produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e MCP-1 ao longo da infecção com a cepa colombiana.
- As alterações eletrocardiográficas dos animais infectados com a cepa colombiana com 30 dias pós-infecção.
- A função e hipertrofia cardíacas de animais infectados com a cepa colombiana e com a cepa Y de *T. cruzi*, com 15, 30 e 45 dias pós-infecção.
- O perfil de contratilidade de células do ventrículo direito e esquerdo com 15, 30 e 45 dias pós-infecção, de animais infectados com a cepa colombiana.
- O potencial de ação, a corrente de potássio retificadora de entrada, a corrente de potássio transiente de saída e a corrente de cálcio do tipo L, em células musculares do ventrículo direito e esquerdo de animais infectados com a cepa colombiana, com 15 e 30 dias pós-infecção. Avaliar os mesmos parâmetros em animais infectados com a cepa Y, porém apenas em células do ventrículo esquerdo aos 15, 30 e 45 dias pós-infecção.
- A dinâmica de cálcio intracelular em células do ventrículo esquerdo de animais infectados com a cepa colombiana com 30 dias pós-infecção, determinando o transiente, a sincronia na liberação e os estoques intracelulares de cálcio
- Comparação entre os resultados de eletrofisiologia celular do ventrículo direito e esquerdo, dos animais infectados com a cepa colombiana.
- Comparação entre os resultados de ecocardiografia e eletrofisiologia celular dos animais infectados com a cepa Y e colombiana.

- O papel do IFN- $\gamma$  na disfunção contrátil de células do ventrículo direito e esquerdo de animais infectados com a cepa colombiana com 15 e 30 dias pós-infecção.
- A produção basal de óxido nítrico, em células do ventrículo esquerdo de animais infectados com a cepa colombiana com 30 dias pós-infecção.
- O papel da via PI3Kinase/Óxido Nítrico na modulação da corrente de cálcio do tipo L em células do ventrículo esquerdo de animais infectados com a cepa colombiana com 30 dias pós-infecção.
- O papel da produção de superóxido na modulação da eletrofisiologia celular (potencial de ação, a corrente de potássio retificadora de entrada, a corrente de potássio transiente de saída e a corrente de cálcio do tipo L) de células musculares do ventrículo esquerdo de animais infectados com a cepa Y com 15 dias pós-infecção.
- A influência da redução da expressão da acetilcolinesterase na modulação do potencial de ação cardíaco e da corrente de cálcio do tipo L, bem como a resposta  $\beta$ -adrenérgica da corrente de cálcio do tipo L.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **Grupos Experimentais**

Para os experimentos envolvendo a cepa colombiana de *T. cruzi* foram utilizados camundongos machos C57BL6 oriundos do biotério de experimentação animal da FIOCRUZ/BH-MG. Para os experimentos envolvendo a cepa Y de *T. Cruzi* foram utilizados camundongos machos C57BL6 cedidos pela professora Fabiana Simão Machado, do Depto. de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Para os experimentos envolvendo os camundongos machos C57BL6 knockdown (KD) para o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT<sup>KD</sup>) (Prado et al., 2006) e seus respectivos controles, os animais foram cedidos pela professora Silvia Guatimosim do Depto. de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais. Para os experimentos envolvendo a cepa Y de *T. Cruzi* e os camundongos machos knockout (KO) para gp91phox<sup>-/-</sup> (Nox-2<sup>-/-</sup>) (Pollock et al., 1995) e seus controles, os animais foram fornecidos pela professora Leda Quércia do Depto. de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Dalton et al., 1993) foram mantidos e cedidos pelo professor Ricardo Tostes Gazzinelli, do Depto. de Bioquímica e Imunologia da UFMG. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a guia para utilização de animais de laboratório e aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFMG, número 31/08.

## **Infecção e manutenção da cepa colombiana e Y**

Animais C57BL/6 com 8 semanas de idade foram infectados intraperitonealmente com 50 tripomastigotas da forma sanguínea da cepa Colombiana (Frederici et al., 1964), uma cepa miotrópica de *T. cruzi*. A parasitemia foi medida através do sangue da calda em diferentes dias pós-infecção (dpi) pelo método de Brener (Brener Z et al., 1962). Para a cepa colombiana foi realizada uma análise da curva cumulativa de mortalidade. A cepa colombiana de *T. cruzi* usada nesse estudo foi mantida por passagens seriadas no centro de pesquisas Rene Rachou/FIOCRUZ (Belo Horizonte, MG)

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foi mantida *in vivo* por passagens sucessivas em camundongos Swiss. Para a realização dos experimentos, os camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 1000 formas tripomastigotas sanguícolas da cepa acima citada, diluída em PBS. A parasitemia foi determinada em diferentes dias após a infecção. Esse processo foi realizado pela professora Fabiana Simão Machado, do Depto. de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

## **Ecocardiografia**

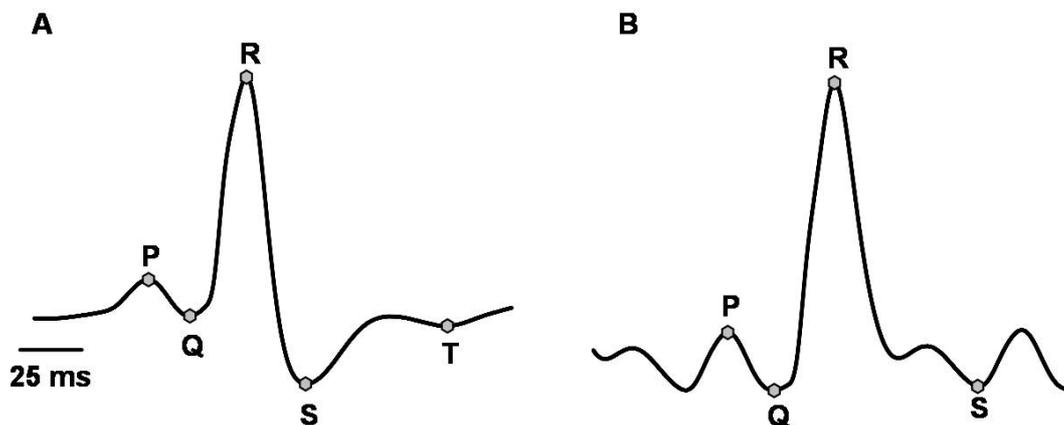
Com intuito de avaliar a função cardíaca, foi utilizado um aparelho de ecocardiograma, Vevo 770, específico para animais de pequeno porte (Visual Sonics, Toronto, Canadá), equipado com transdutor de 30MHz, colocado em interface de gel (carbogel) sobre o tórax do animal previamente tricotomizado. Os registros foram obtidos com monitorização contínua, eletrocardiográfica e respiratória, sob efeito do anestésico inalatório isoflurano 1,5% (Cristália, Brasil).

Os seguintes parâmetros foram avaliados por meio do método unidimensional (modo M): a dimensão do átrio esquerdo (AE), as espessuras da parede posterior (PP) do VE e da espessura do septo interventricular diástole (S) e a massa do VE. As medidas de volumes de fração de ejeção (FE%) foram realizadas pelo modo bidimensional por meio do método de Simpson's. Todos os parâmetros seguiram as normas da Sociedade Americana de Ecocardiografia (LANG et al., 2006). Um único operador realizou os exames de todos os grupos, desconhecendo a procedência dos animais quanto aos grupos experimentais a que pertenciam.

## **Eletrocardiograma**

Camundongos controle e infectado foram anestesiados com xilazina 2% (1 uL/g de peso) e cetamina (3,5 ug/uL/por grama de animal) por injeção intraperitoneal, e em seguida foi realizada tricotomia da região torácica e dorsal para implantação de eletrodos para a captação do sinal eletrocardiográfico. Os eletrodos da região torácica foram posicionados na derivação DII e o da região dorsal utilizado como terra. Depois de fixados, os fios foram exteriorizados subcutaneamente no dorso do animal. As

incisões foram então suturadas e os animais colocados em caixas individuais, com livre acesso a água e ração. As medidas foram realizadas 24 horas após a cirurgia, com animais acordados, não anestesiados. Para cada animal, foi realizada uma média de 30-50 traçados, contendo todas as ondas compreendidas entre o intervalo PT. Os traçados (entre 4-5) foram retirados em média a cada 5 minutos de registros, ao longo do arquivo contendo uma hora de aquisição de dados. Na figura 9 está mostrado um traçado médio para o animal controle (A) e infectado (B), evidenciando os pontos que foram considerados, em cada curva, para a delimitação dos intervalos do ECG, apresentados na *Introdução*. Pelo fato dos experimentos terem sido realizados com animais acordados, a linha de base do sinal era oscilante, por esse motivo os dados foram todos normalizados no eixo voltagem, sendo todos os traçados médios variantes entre 0-1.



**Figura 9: Pontos do ECG para determinação dos intervalos.** Traçado médio de um animal controle (A) e infectado (B).

### Medida das citocinas no soro

Um kit de quantificação de citocinas murinas (Cytometric Bead Array – CBA da BD Biosciences) foi utilizado para quantificar as citocinas MCP-1/CCL2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no sangue de camundongos infectados com a cepa colombiana de *T. cruzi* (50 parasitas/ camundongo). O ensaio foi utilizado de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante, com pequenas modificações. A quantidade de soro foi reduzida para 25  $\mu$ L/amostra. Anticorpos de captura específicos para as citocinas citadas (“beads”) foram

adicionados a uma placa de ELISA de 96 poços juntamente com 25 µL de cada amostra ou com 25 µL de padrão de citocina (5000 pg/mL a 20,57 pg/mL) para a construção de uma curva-padrão. A seguir, foram adicionados 25 µL/poço de reagente de detecção conjugado com PE e a placa foi levada à incubação, por duas horas à temperatura ambiente, protegida da luz. Decorrido esse tempo, foram adicionados 150 µL/poço de tampão de lavagem e a placa centrifugada a 200 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado contendo os “beads” foi ressuspensão em 200 µL de tampão de lavagem. A fluorescência produzida pelas “beads” era mensurada em citômetro de fluxo (Becton Dickinson) e analisada com o software que acompanha o equipamento.

### **Procedimento cirúrgico para obtenção do coração isolado**

Os animais receberam injeção intraperitoneal de 100 UI de heparina diluída em 100 µl de solução salina. Após 10-15 minutos, os camundongos foram sacrificados por decapitação e em seguida foi realizada toracotomia. As cartilagens condrocostais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido cranialmente, expondo dessa forma a cavidade torácica. Posteriormente, seccionava-se a veia cava superior e inferior, e as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago, juntamente com parte dos pulmões, sendo dessa forma o coração retirado em bloco. Em seguida, o coração era colocado em uma placa de petri que continha 100 ml de solução tampão (ST) a aproximadamente 4°C (em mM: NaCl 130, ácido láctico 1, ácido pirúvico 3, HEPES 25, MgCl<sub>2</sub> 0.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33, D-glicose 22, e 5 µl de solução estoque de insulina a 100 u/ml , com pH em 7.4, ajustado com NaOH), que tinha como objetivo diminuir o metabolismo do tecido cardíaco. Na placa de petri, todos os tecidos, exceto o do coração, eram removidos, deixando à mostra o coto da aorta. O coração era canulado pelo coto da aorta com o auxílio de duas pinças, e fixado à cânula por uma linha. O coração canulado era então posto no sistema de Langendorff para o início da perfusão retrógrada.

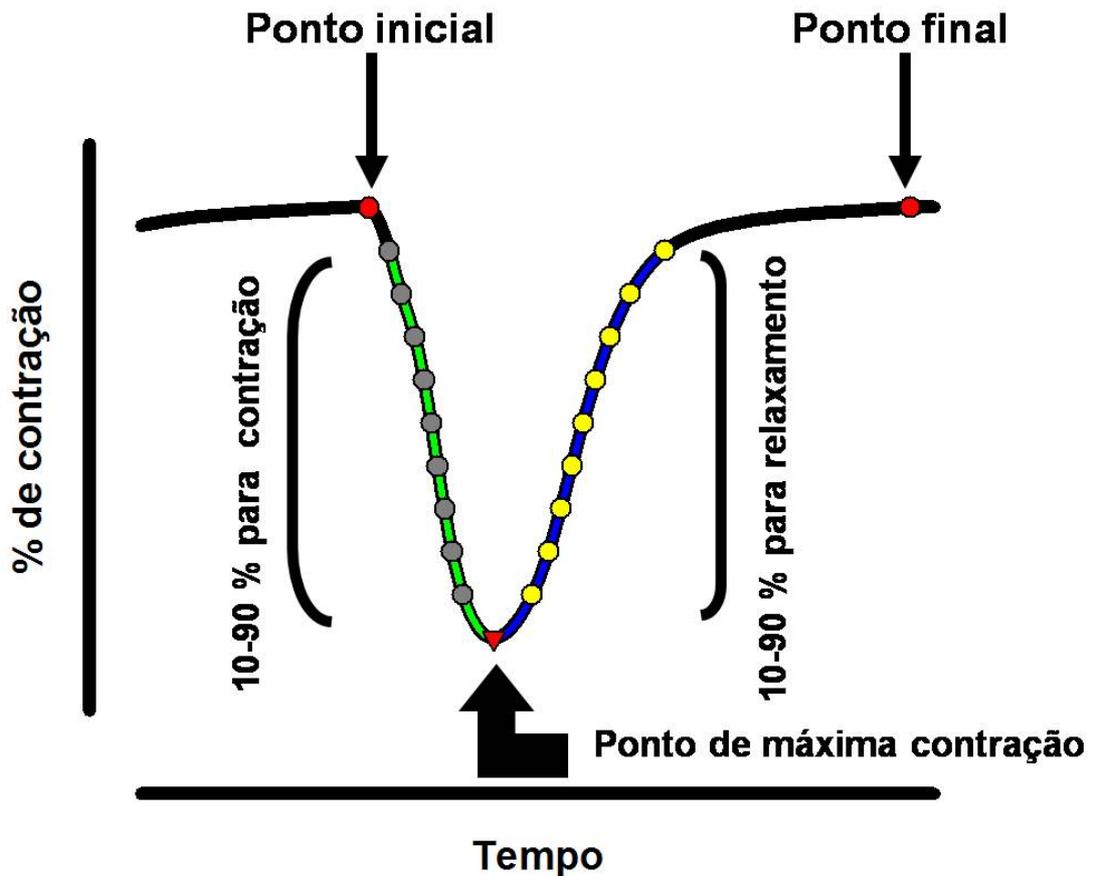
## **Células musculares cardíacas isoladas**

Os corações isolados foram colocados em um Sistema de Langendorff, sendo as células obtidas enzimaticamente conforme descrito previamente (Roman-Campos et al., 2009). Resumidamente, os corações, no Sistema de Langendorff, foram perfundidos por 5-10 minutos com ST. Posteriormente, os corações eram perfundidos com solução ST contendo 1mg/ml de colagenase. O coração digerido era removido da cânula e os ventrículos direito e esquerdo eram separados e cortados em pequenos pedaços. Células isoladas foram obtidas por isolamento mecânico e mantidas em DMEM. Apenas células tolerantes ao cálcio, quiescentes e com estrias bem definidas foram utilizadas. Os cardiomiócitos isolados foram utilizados entre 2-6 horas após o final da preparação.

## **Contratilidade celular**

A contratilidade celular foi avaliada conforme descrito anteriormente (Roman-Campos et al., 2009). Brevemente, as células foram plaqueadas em uma câmara e montadas em um microscópio invertido (Eclipse - TS 100 - Nikon, Japan). A câmara foi perfundida com solução Tyrode contendo: (em mM) 140 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5.4 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 10 Glucose, ajustada para pH 7.4, com NaOH. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25-30 °C). Os cardiomiócitos foram estimulados via eletrodo de platina presente no banho, com pulsos de voltagem de 5 ms de duração e intensidade de 20 V. A frequência de estimulação foi ajustada a 1 Hz. As células foram visualizadas em um computador com uma câmera NTSC (MyoCamCCD100V, Ionoptix, Milton, MA, USA), em um modo de escaneamento parcial. Esta imagem foi utilizada para mensurar o encurtamento celular (nosso índice de contratilidade) em resposta a um estímulo elétrico, usando um sistema de vídeo detector de bordas (Ionoptix, Milton, MA, USA). A imagem foi adquirida a uma frequência de 240 Hz. O encurtamento celular foi calculado baseando-se na saída obtida no sistema de detecção de bordas do conversor IonWizard A/D (Ionoptix, Milton, MA, USA). Entre 8-16 contrações consecutivas foram utilizadas para realizar a média de contração de uma determinada célula. Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de encurtamento da célula cardíaca, máxima velocidade de contração e relaxamento e

tempo para 50% da contração e relaxamento. Esses parâmetros foram obtidos utilizando um software desenvolvido pelo aluno de mestrado Danilo Roman Campos, em uma plataforma MatLab<sup>®</sup>. Uma descrição detalhada da interface gráfica desenvolvida para o programa de contratilidade celular é apresentada no Anexo 3. Os principais parâmetros avaliados são demonstrados na figura 10.



**Figura 10: Resultado da análise da contratilidade celular.** Figura representando os principais parâmetros avaliados pelo software.

### **Eletrofisiologia celular**

Um amplificador EPC 9.2 (HEKA Instruments, Germany) foi utilizado para estudar os parâmetros eletrofisiológicos de células ventriculares cardíacas isoladas. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se as configurações ‘*whole-cell voltage-clamp*’, para medir as correntes totais de membrana, ou ‘*whole-cell current-clamp*’ para

medir potenciais de ação, de acordo com Hamil et al. (1981). Para todos os experimentos com eletrofisiologia, após a obtenção da configuração *whole-cell*, foram esperados cerca de 3-5 minutos para permitir o equilíbrio entre solução de pipeta e citoplasma. As pipetas utilizadas nos experimentos possuíam resistência entre 1-3 M $\Omega$ . Todas as correntes foram filtradas passa-baixa com frequência de corte de 2.9 kHz. A capacitância celular foi obtida com compensação eletrônica e o transiente capacitivo compensado eletronicamente.

### ***Potencial de ação e corrente retificadora de entrada***

Para aquisição do potencial de ação (PA) e a corrente retificadora de entrada ( $I_{K1}$ ) foi utilizada a mesma solução intra (em mM: 130 K-aspartato, 20 KCl, 10 HEPES, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 NaCl, 5 EGTA, ajustado para pH 7.2 com KOH) e extracelular (Tyrode).

Os PAs foram obtidos a partir de um potencial de membrana de -80 mV, sendo este potencial obtido pela injeção de corrente nos cardiomiócitos da ordem de -100 a -600 pA. O pulso para obtenção do PA era uma onda quadrada de intensidade de 1 nA e duração entre 3-5 ms (figura 11A). A frequência de aquisição foi de 10 kHz e de estímulo de 1 Hz. Foram adquiridos entre 30-50 PAs para cada célula, sendo o último utilizado para análise. O *overshoot*, a máxima taxa de despolarização, a amplitude e a duração (a 10, 30, 50, 70 e 90% da repolarização) foram calculados através de um software desenvolvido pelo aluno.

A  $I_{K1}$  foi obtida com um protocolo partindo de um potencial de membrana de -40 mV, com pulso até -130 mV, com subseqüentes acréscimos de 10 mV, até -40 mV. O pulso tinha duração de 1500 ms, com intervalo entre pulsos de 15 segundos (figura 11B). A frequência de aquisição foi de 10 kHz. Devido a solução intracelular apresentar um potencial de junção calculado elevado (10 mV) em relação ao Tyrode, para todas as medidas envolvendo potencial de ação e  $I_{K1}$  do VE, deve ser aplicado uma correção do potencial de junção de 10 mV.

Para os experimentos com a cepa Y e o ventrículo direito da cepa colombiana foi utilizada a mesma solução de pipeta para avaliar PA,  $I_{K1}$  e  $I_K$ .

### ***Corrente total de potássio de saída***

Para aquisição da corrente total de potássio de saída foi utilizado solução intra (em mM: 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES, 5 Glicose, pH ajustado para 7.2 com KOH) e extracelular, sendo esta Tyrode acrescido de 100  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> para bloquear a corrente de Ca<sup>2+</sup>. A corrente foi obtida por pulsos despolarizantes, com potenciais entre -40 e 70 mV, partindo de um potencial de membrana de -80 mV com incrementos de 10 mV e 3000 ms de duração (figura 11C). Um pré-pulso de 50 ms de duração até -40 mV foi utilizado para inativar as correntes de sódio (I<sub>Na</sub>). O intervalo entre pulsos foi de 15 segundos, com aquisição de dados a 5 kHz.

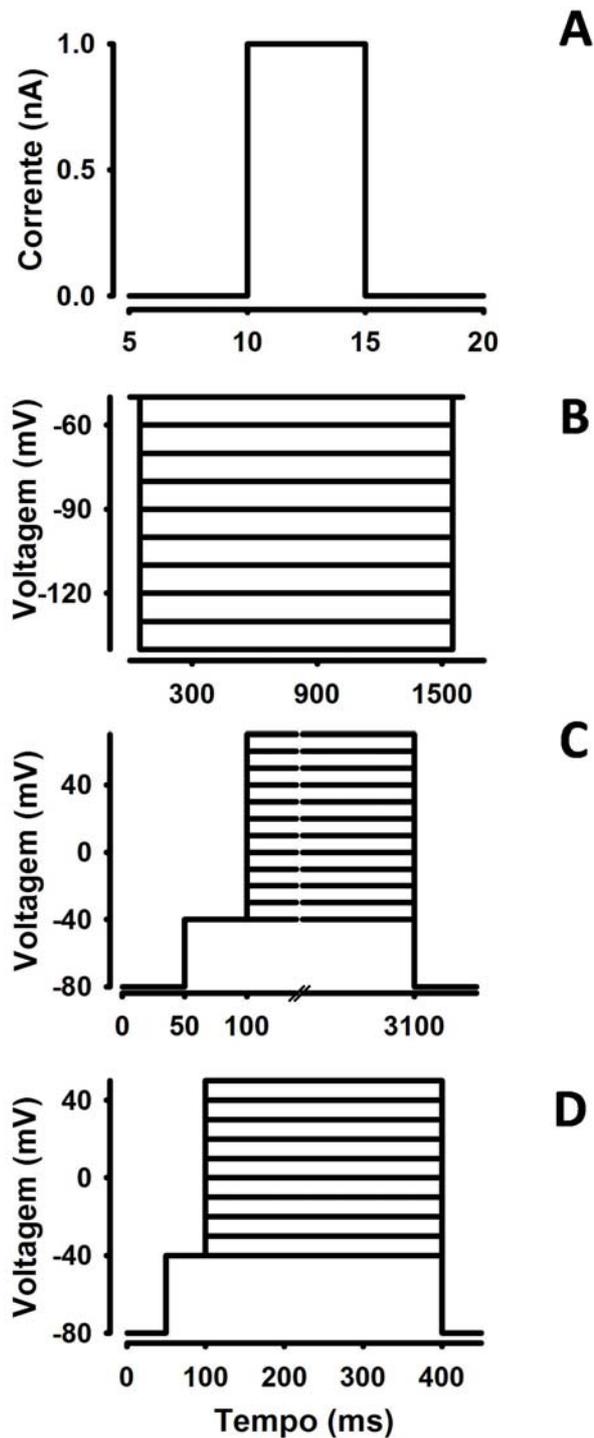
### ***Corrente de Cálcio***

Para medir a corrente de cálcio do tipo L (I<sub>Ca,L</sub>) foi utilizada solução interna (mM): 120 CsCl, 20 TEA-Cl, 5 NaCl, 10 Hepes, 5 EGTA, pH 7.2, ajustado com CsOH, sendo a solução externa Tyrode. I<sub>Ca</sub> foi medida entre os potenciais de -40 a 50 mV, com duração de 300 ms, com incrementos de 10 mV, 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 I<sub>Na</sub> (figura 11D). A aquisição dos dados foi realizada com frequência entre pulsos de 0.1 Hz, e frequência de aquisição a 10 kHz.

Para os experimentos em que foram avaliados os efeitos da inibição das óxido nítrico sintases e das PI3Kinases sobre a I<sub>Ca,L</sub>, as células cardíacas foram incubadas durante pelo menos 30 minutos com o inibidor inespecífico das 3 óxido nítrico sintases existentes, L-NMMA, em uma concentração de 6  $\mu$ M. Para avaliar a participação da via da PI3Kinase, as células cardíacas foram incubadas por pelo menos 30 minutos com 20  $\mu$ M de LY204002, um inibidor não específico para as isoformas da PI3Kinase existentes. A solução externa que banhava as células foi suplementada com L-arginina a 100  $\mu$ M.

Para determinar a resposta do cardiomiócito dos animais controles e VACHT<sup>KD</sup> ao isoproterenol, todos os dias foi preparada uma solução estoque contendo 1 mM de isoproterenol, sendo essa solução utilizada para fazer uma solução de banho final

contendo 100 nM de isoproterenol. Animais controles e *KD* foram avaliados no mesmo dia com isoproterenol para evitar diferenças entre possíveis erros associados à preparação da solução estoque. Para avaliar o efeito do isoproterenol sobre a relação da densidade de corrente x voltagem (IV) primeiramente foi perfundido isoproterenol durante 3-4 minutos até alcançar o estado de máxima ativação do sistema, para posteriormente averiguar a curva IV sob exposição do isoproterenol.



**Figura 11: Protocolos para eletrofisiologia.** (A) Protocolo para obtenção do potencial de ação. Pulso curto de 5 ms de duração com intensidade de 1 nA de corrente. (B) Protocolo para obtenção de  $I_{K1}$ . Partindo-se de um potencial de membrana de -40 mV a célula é hiperpolarizada até -130 mV, com incrementos de 10 mV até -40 mV. A duração do pulso é de 1,5 s. (C) Protocolo para medir a corrente total de potássio. Partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV, é aplicado um pré-pulso a -40

mV, de 50 ms de duração. Posteriormente são realizados incrementos de 10 mV até 70 mV com duração de 3 s. (D) Protocolo para obtenção das  $I_{Ca,L}$ . Partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV, é aplicado um pré-pulso a -40 mV, de 50 ms de duração, com posterior incrementos de 10 mV até 50 mV, com pulso de duração de 300 ms. Em todos os protocolos de *whole cell voltage clamp*, ao final do pulso o potencial retorna para o seu respectivo potencial de repouso.

### **Análise biofísica das Correntes Iônicas**

As correntes foram analisadas quantificando o valor máximo das correntes de entrada ou saída, normalizando os valores pelo valor de capacitância da célula.

As correntes foram registradas e analisadas usando softwares desenvolvidos pelo aluno, bem como os programas Origin 8.0 e Sigmaplot 10.0. A constante de tempo do decaimento foi ajustada por uma ou a soma de duas funções exponenciais, segundo as equações 1-2.

$$f(t) = A_0 + [A \cdot \exp(\frac{-t}{\tau})] \quad \text{equação (1)}$$

$$f(t) = A_0 + [A_{rápido} \cdot \exp(\frac{-t}{\tau_{rápido}})] + [A_{lento} \cdot \exp(\frac{-t}{\tau_{lento}})] \quad \text{equação (2)}$$

Sendo  $A_0$ , corrente que não sofre inativação ao final do pulso;  $A_{rápido}$ , contribuição do componente rápido para o decaimento da corrente;  $A_{lento}$ , contribuição do componente lento para o decaimento da corrente;  $t$ , tempo;  $\tau$ , constante de tempo para o decaimento da corrente;  $\tau_{rápido}$ , constante de tempo para o componente rápido da corrente;  $\tau_{lento}$ , constante de tempo para o componente lento da corrente.

A relação da densidade de corrente por voltagem foi ajustada de acordo com a função não-linear (3).

$$I_V = G_{max} * \frac{(V_m - E_k)}{1 + (\exp(V_a - V_m)) / S} \quad \text{equação (3)}$$

Em que,  $G_{max}$ , condutância máxima;  $V_m$ , potencial de membrana;  $E_k$ , potencial de equilíbrio eletroquímico do íon;  $V_a$ , voltagem que ativa 50% dos canais;  $S$ , *slope*.

Através dos valores obtidos do pico das correntes avaliadas foi calculada a condutância, bem como a dependência de voltagem para ativação, de acordo com as equações abaixo.

$$g = I_{pico} / (V_m - E_k) \quad \text{equação (4)}$$

$$g / g_{max} = (G - G_{max}) / (1 + \exp((V_m - V_{0.5}) / S)) + G_{max} \quad \text{equação (5)}$$

Em que,  $I_{pico}$ , corrente máxima;  $V_m$ , potencial de membrana,  $E_k$ , potencial de equilíbrio eletroquímico do íon;  $g$ , condutância em um dado potencial;  $g_{max}$ , condutância máxima;  $V_{0.5}$ , potencial para ativar 50% dos canais;  $S$ , *slope*.

Para análise de regressão linear, foi utilizada a seguinte equação:

$$f(x) = a(x) + b \quad \text{equação (6)}$$

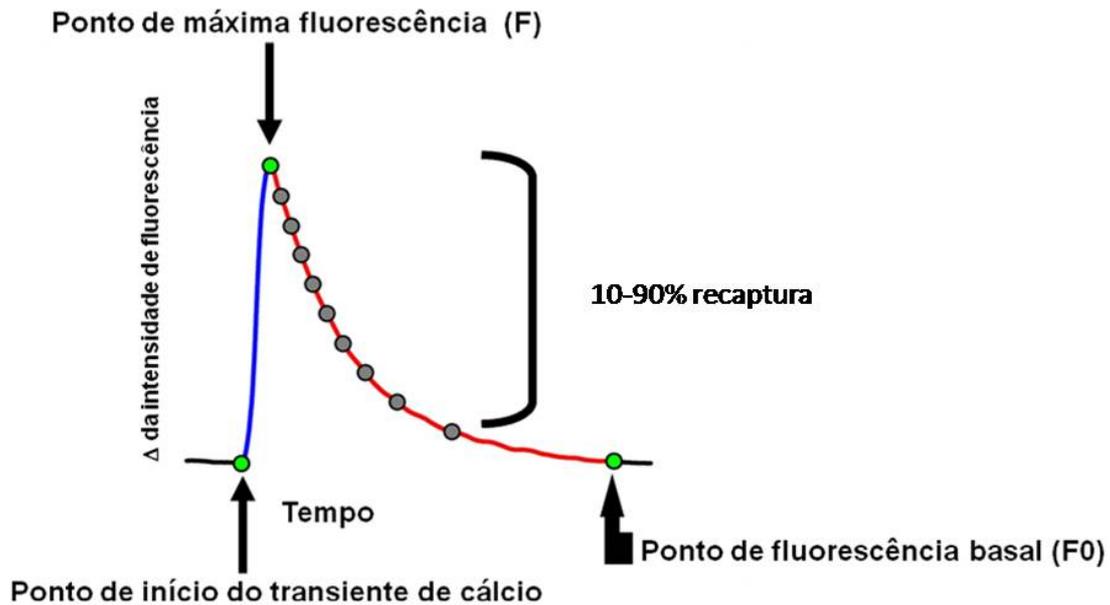
Onde  $f(x)$  é a função de interesse,  $a$ , o coeficiente angular e  $b$  o termo independente

### **Transiente intracelular de cálcio e estoque de cálcio do retículo sarcoplasmático**

O transiente intracelular de  $Ca^{2+}$  foi obtido através de imagens realizadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) (Cemel/ICB-UFMG). Os cardiomiócitos isolados foram previamente incubados com sonda fluorescente sensível ao  $Ca^{2+}$  (fluo4-AM 10  $\mu$ M) durante 30 minutos em temperatura ambiente (25-30°C). Após a marcação o excesso da sonda foi removido e adicionado novamente DMEM para realização dos experimentos. As células foram plaqueadas e visualizadas no microscópio confocal, e no momento do experimento estimuladas a 1 Hz. Para o registro do transiente de  $Ca^{2+}$ , foram realizadas varreduras ao longo de uma linha (512 x 3000 pixels), com laser de argônio (488 nm) e frequência de aquisição de 1,54 ms.

Previamente à aquisição das imagens, 8 pulsos foram aplicados para padronizar os experimentos. Os pulsos de voltagem utilizados para aquisição das imagens tinham 5 ms de duração com voltagem supra-máxima. Os parâmetros avaliados foram: relação (máxima fluorescência) / (fluorescência basal); tempo para o pico da máxima fluorescência e  $\tau$  de decaimento da fluorescência. As análises foram realizadas utilizando um *software* desenvolvido pelo estudante de mestrado Danilo Roman Campos em plataforma MatLab<sup>®</sup>.

Os principais parâmetros avaliados são demonstrados na figura representativa 12.



**Figura 12: Resultado da análise da imagem do transiente de cálcio.** Figura representando os principais parâmetros avaliados pelo software.

A figura 12 representa a análise final para uma imagem de variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo. O ponto de início representa o instante de tempo em que é considerado o início da variação de fluorescência. O ponto de máxima fluorescência é o instante de tempo no qual é considerado o ponto de máxima intensidade de fluorescência. O ponto de fluorescência basal é considerado o *background* de fluorescência, sendo a relação entre ponto de máxima fluorescência e fluorescência basal o representante de variação global de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os pontos em cinza representam de 10-90% da recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$ . A curva em vermelho representa o melhor ajuste monoexponencial encontrado para o decaimento da recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$ , realizado de acordo com a equação 1.

Para determinação do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático os cardiomiócitos carregados com Fluo4-AM foram estimulados eletricamente, por 5-6 s, a 1 Hz, utilizando uma onda quadrada de 5 ms com voltagem supra-máxima. Em seguida, a estimulação elétrica era cessada e perfundida uma solução contendo (em mM): 140 LiCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 10 Glicose, 5 KCl, 1 EGTA e 10 Cafeína, pH=7,4, ajustado

com LiOH. Dessa imagem, era extraída a relação da variação da intensidade de fluorescência pela fluorescência basal, sendo esse índice um indicador do estoque intracelular de cálcio do retículo sarcoplasmático.

### **Método de determinação da assincronia de liberação de cálcio**

Foi realizada uma adaptação do método de (Louch et al., 2006) para determinação da assincronia na liberação de cálcio. As imagens utilizadas para avaliação do transiente intracelular de cálcio foram utilizadas neste estudo. As imagens do transiente de cálcio sempre possuíam uma seqüência de 4 ondas transientes de liberação de cálcio, sendo escolhida sempre a segunda. As imagens para avaliar a sincronicidade possuíam três eixos: (x, y, z), sendo x = tempo, y = distância e z = intensidade. Cada uma das imagens do transiente de cálcio continha 146  $\mu\text{m}$  de tamanho, sendo cada uma das linhas de varredura do confocal da ordem de 0.18  $\mu\text{m}$ , sendo que o tamanho final da imagem, em número de linhas, era de 512. Para cada uma das linhas foi determinado o tempo para 50% do decaimento da fluorescência partindo-se do pico da fluorescência daquela linha. Previamente ao cálculo do tempo para 50% do decaimento, era realizada uma suavização da curva para eliminar possíveis pontos fora do comportamento padrão de decaimento. O método empregado considera peso 0 para valores que eram seis vezes acima do valor do desvio padrão da curva. Além disso, para cálculo da suavização foi utilizado um polinômio de grau 2, baseando-se no método dos erros quadrados. Posteriormente a esse passo, a análise era aplicada para cada linha individualmente, gerando-se um tempo para 50% do decaimento indexado a cada uma das linhas de varredura da imagem, obtendo-se assim uma curva final expressa como índice de tempo para 50% da fluorescência x distância. Posteriormente foi realizada uma análise de variância da curva tempo x distância, e o desvio padrão dessa curva foi utilizado como índice de sincronia para a célula. Esse método foi implementado em plataforma MatLab.

## **Detecção e análise dos Sparks**

Para análise das imagens das *sparks* foi utilizado o programa *Sparkmaster*, utilizando a plataforma ImageJ. O método utilizado pelo programa encontra-se descrito detalhadamente em (Picht et al., 2007). Brevemente, o algoritmo que identifica os *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  baseando-se no desvio da intensidade de fluorescência em relação à fluorescência basal. Previamente à análise da imagem é realizada uma filtragem. A imagem filtrada é utilizada para análise das *sparks*. Áreas potenciais para conter um *spark* são determinadas como regiões possuindo duas vezes o desvio padrão acima da média. Os *sparks* são detectados e computados se a intensidade detectada for o dobro do desvio padrão multiplicado por um fator utilizado pelo usuário (no nosso estudo variou entre 6-10, dependendo do background da imagem) . Além da utilização do *software*, foi realizada uma inspeção visual para averiguar se o software foi capaz de detectar todos os *sparks* na imagem e se ele identificou unicamente *sparks*.

## **Medida intracelular dos níveis de óxido nítrico (NO)**

Para detecção dos níveis intracelulares de NO cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais controle e infectados com *T. cruzi* da cepa colombiana foram carregados com 5  $\mu\text{M}$  de DAF-2 FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato, Molecular Probe, Eugene, OR, USA) em tampão Tyrode-HEPES (TTH) contendo (em mM): 140 NaCl, 5 KCl, 0.5  $\text{MgCl}_2$ , 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 5 HEPES e 5 glicose (pH ajustado para 7.4) por 30 min a 37 °C e lavados com (TTH) para remover excesso da sonda. Imediatamente após esse procedimento as células foram analisadas em um microscópio confocal LSM 510META (Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) com uma objetiva de imersão de 63x. O *software* Image J foi usado para processar e analisar as imagens.

## **Estatística**

Em todos os experimentos utilizando cardiomiócitos isolados, utilizamos entre 3-8 corações. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  Erro Padrão Médio (EPM) , e o número de células é mostrado como n. Diferença significativa entre os grupos foi determinada com o teste *t* de *Student* ou *one-way* ANOVA seguido de teste de Bonferroni, ou *two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Valores de probabilidade de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para análise do decaimento exponencial nós utilizamos um método baseado na redução do chi-quadrado, usando  $r\text{-quadrado} > 0.99$ . Os Dados foram analisados através de *softwares* próprios, desenvolvidos em MatLab, ou em Origin 8.0, Prima 4.0 e Sigmaplot 10.0.

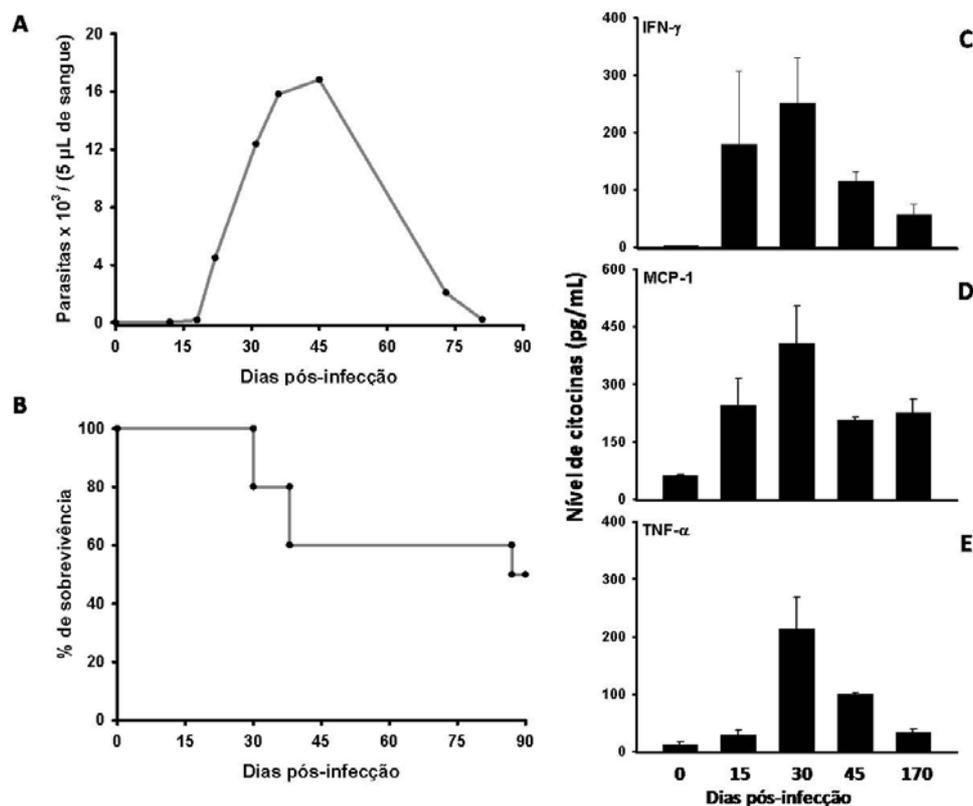
## **RESULTADOS**

## **Resultados com a cepa colombiana**

### ***Parasitemia, mortalidade e produção de citocinas***

Como é de conhecimento, a doença de Chagas apresenta tanto um curso temporal para replicação do parasito, bem como para ativação do sistema imune do hospedeiro vertebrado. Por esse motivo, iniciamos os experimentos caracterizando a curva de parasitemia, a taxa de mortalidade e a produção de alguns marcadores inflamatórios ao longo da infecção. Como pode ser observado na figura 13A, o número de parasitas no sangue entre 0-15 dias pós-infecção (dpi) é baixo, sendo que após 15 dpi, a curva de crescimento do parasito entra em uma fase de rápida expansão, atingindo o pico da parasitemia com 45 dpi. Em seguida, ocorre um declínio da parasitemia, sendo que após 81 dpi não mais são detectados parasitos no sangue dos animais. Nota-se, na figura 13B, que na fase aguda de nosso modelo ocorre uma acentuada mortalidade, principalmente entre 30 e 40 dpi, sendo que posteriormente a mortalidade é praticamente nula até 90 dpi.

Nas figuras 13 C, D e E são apresentadas as produções de IFN- $\gamma$ , MCP-1 e TNF- $\alpha$  respectivamente, sendo as medidas realizadas em amostras de soro. A produção de IFN- $\gamma$  e MCP-1 começa a aumentar aos 15 dpi, enquanto a produção de TNF- $\alpha$  começa a apresentar níveis mais elevados aos 30 dpi. Porém, para as três moléculas em questão, o pico da produção se encontra ao redor dos 30 dpi, sendo que posteriormente ocorre uma redução nos níveis plasmáticos do IFN- $\gamma$ , MCP-1 e TNF- $\alpha$ . Entretanto, mesmo aos 170 dpi, os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$ , MCP-1 e TNF- $\alpha$  não retornam aos valores basais.



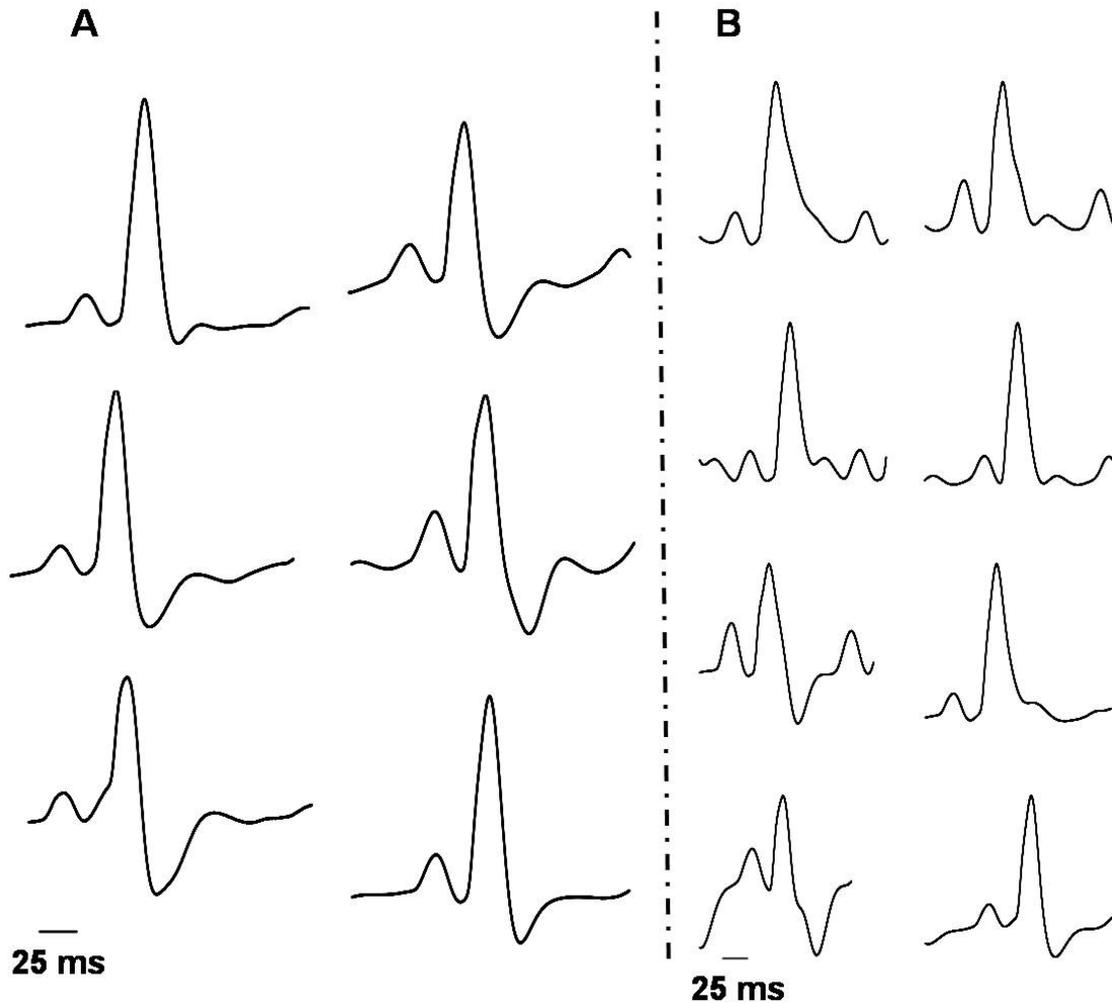
**Figura 13: Parasitemia e produção de citocinas ao longo da infecção por *T. cruzi*.** (A) Curva de parasitemia ao longo da infecção por *T. cruzi*. (B) Curva de mortalidade dos animais ao longo da infecção por *T. cruzi*. (C, D, E) Nível das citocinas IFN- $\gamma$ , MCP-1 e TNF- $\alpha$ , respectivamente, no soro (pg/mL) ao longo da infecção por *T. cruzi* em 0, 15, 30, 45 e 170 dias pós-infecção.

### ***Eletrocardiograma***

Após a caracterização inicial de nosso modelo, iniciamos os estudos relativos às alterações da fisiologia cardíaca. As propriedades elétricas macroscópicas do coração são importantes parâmetros que permitem avaliar a (dis)função cardíaca em uma análise inicial. Na doença de Chagas, mesmo na fase aguda, ocorrem distúrbios elétricos. Por esse motivo, decidimos caracterizar o eletrocardiograma (ECG) dos animais após 30 dias de infecção com a cepa colombiana de *T. cruzi*, para averiguar se, de fato, o nosso modelo apresenta alterações nas propriedades elétricas.

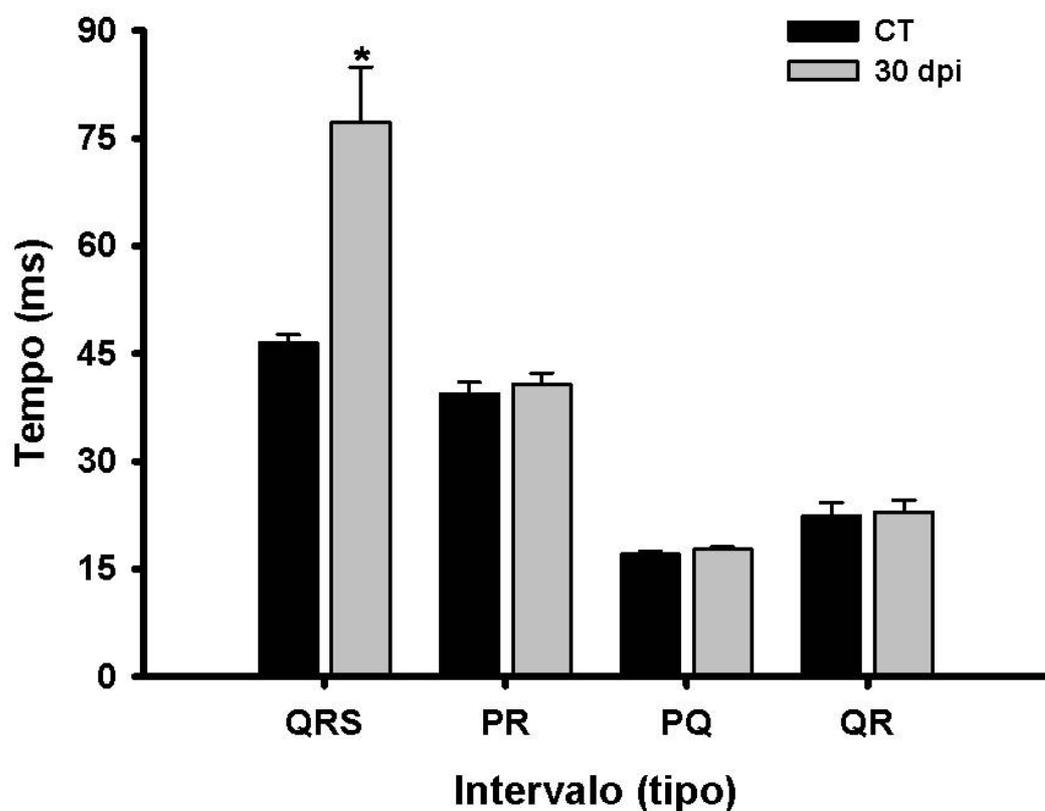
Os traçados representativos para cada um dos animais estudados são apresentados na figura 14A, para os animais controles, e na figura 14B para os animais

infectados. Os traçados apresentados são a média de 30 a 50 curvas do ECG para cada animal, conforme explicado em *Matérias e métodos*.



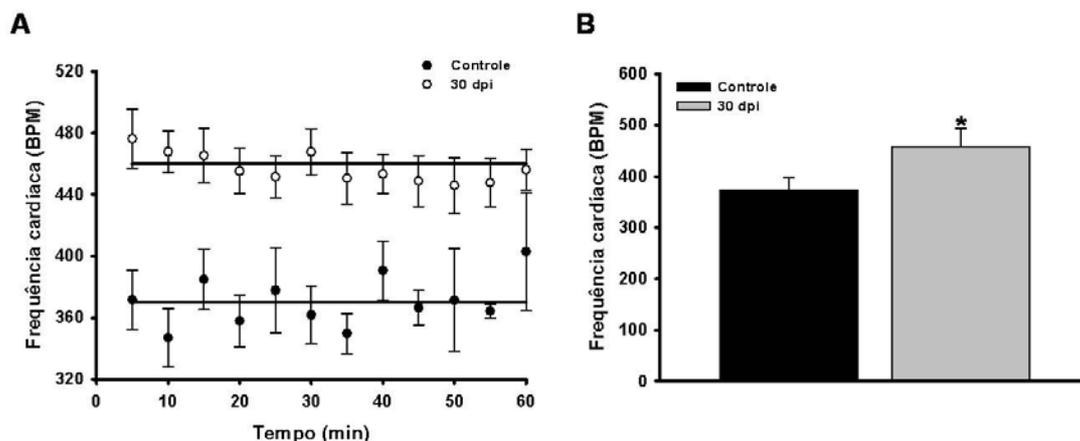
**Figura 14: Traçados do eletrocardiograma.** (A) Traçados médios para cada um dos animais controles, e (B) 30 dias pós-infecção.

Os resultados obtidos da análise dos traçados, realizada conforme proposto em *Materiais e métodos*, são apresentados na figura 15. O complexo QRS foi o que apresentou marcado aumento. Os animais controles apresentaram valores de QRS de  $46,4 \pm 1,22$  ms e os animais infectados de  $77,2 \pm 7,7$  ms. Os demais intervalos, PR, PQ e QR não apresentaram alteração.



**Figura 15: Parâmetros do eletrocardiograma.** Duração do intervalo entre as fases do eletrocardiograma, conforme ilustrado na figura 9, em *Materiais e métodos*. CT, controle (n=6). 30 dpi, 30 dias pós-infecção (n=8). As barras representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , teste *t* de *student*.

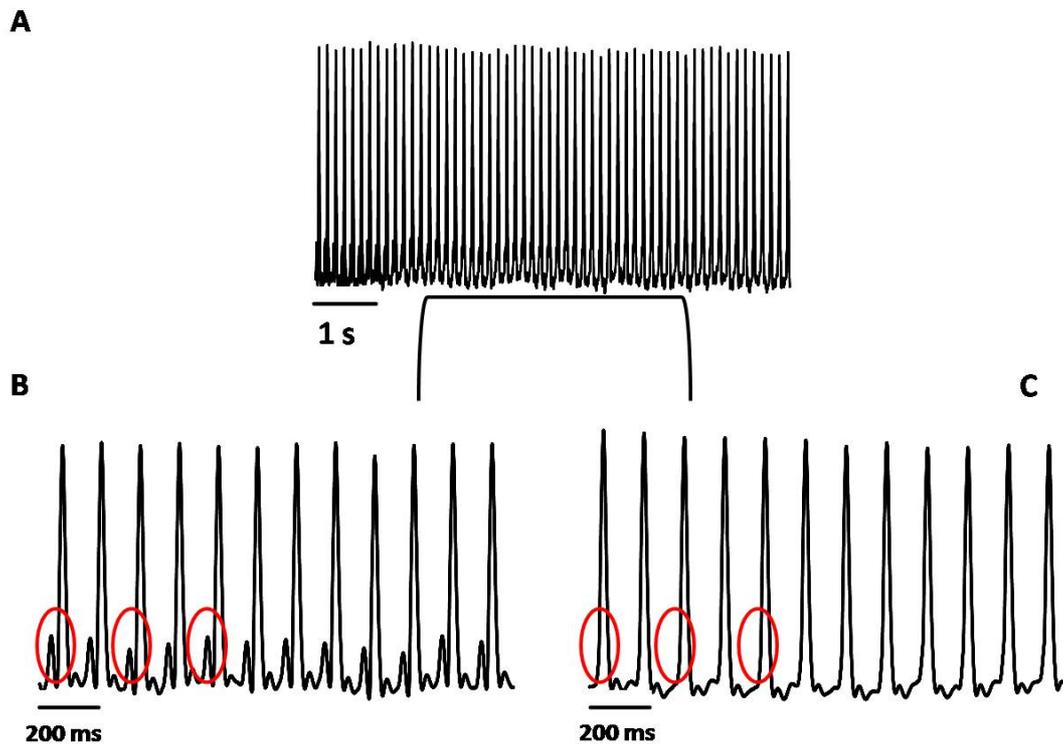
Também foi determinada a frequência cardíaca dos animais, e conforme demonstrado na figura 16, os animais chagásicos apresentam um aumento na frequência de batimentos. A figura 16A apresenta a variação da frequência ao longo de uma hora de registro, e a figura 16B representa a média para uma hora de aquisição do sinal. A frequência média passou de  $373,5 \pm 23,4$  para  $457,6 \pm 36,5$  batimentos/minuto, nos animais controle e infectado respectivamente.



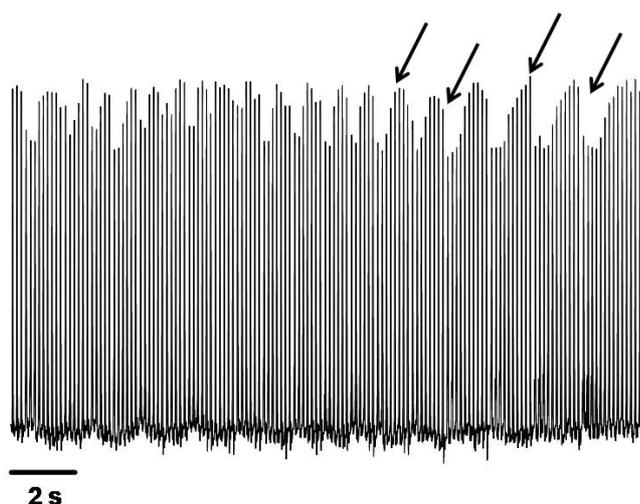
**Figura 16: Frequência cardíaca.** (A) Variação temporal da frequência cardíaca durante uma hora de aquisição de sinais, para os animais controles (n=6), círculos pretos, e para os animais aos 30 dias pós-infecção (30 dpi) (n=8), círculos brancos. (B) Média da frequência cardíaca em animais controles e 30 dpi. As barras e os círculos representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , teste *t* de *student*. BPM: batimentos por minuto.

Além dos parâmetros clássicos avaliados, também observamos fenômenos pontuais em alguns animais infectados. Na figura 17A, está representado um trecho contínuo de um registro de um animal que demonstrou alternância de onda P. Na figura 17B e C, são demonstrados trechos do registro em A, expandindo a escala temporal para evidenciar que no mesmo registro ocorreu a alternância de onda P. Esse fenômeno é evidenciado pelos círculos vermelhos nas figuras 17B e C.

Já na figura 18, estão ilustrados registros de outro animal, que apresentou alternância cíclica da amplitude do complexo QRS. Esse fenômeno pode ser nitidamente observado pelas setas pretas, evidenciando a alternância de amplitude do complexo QRS.



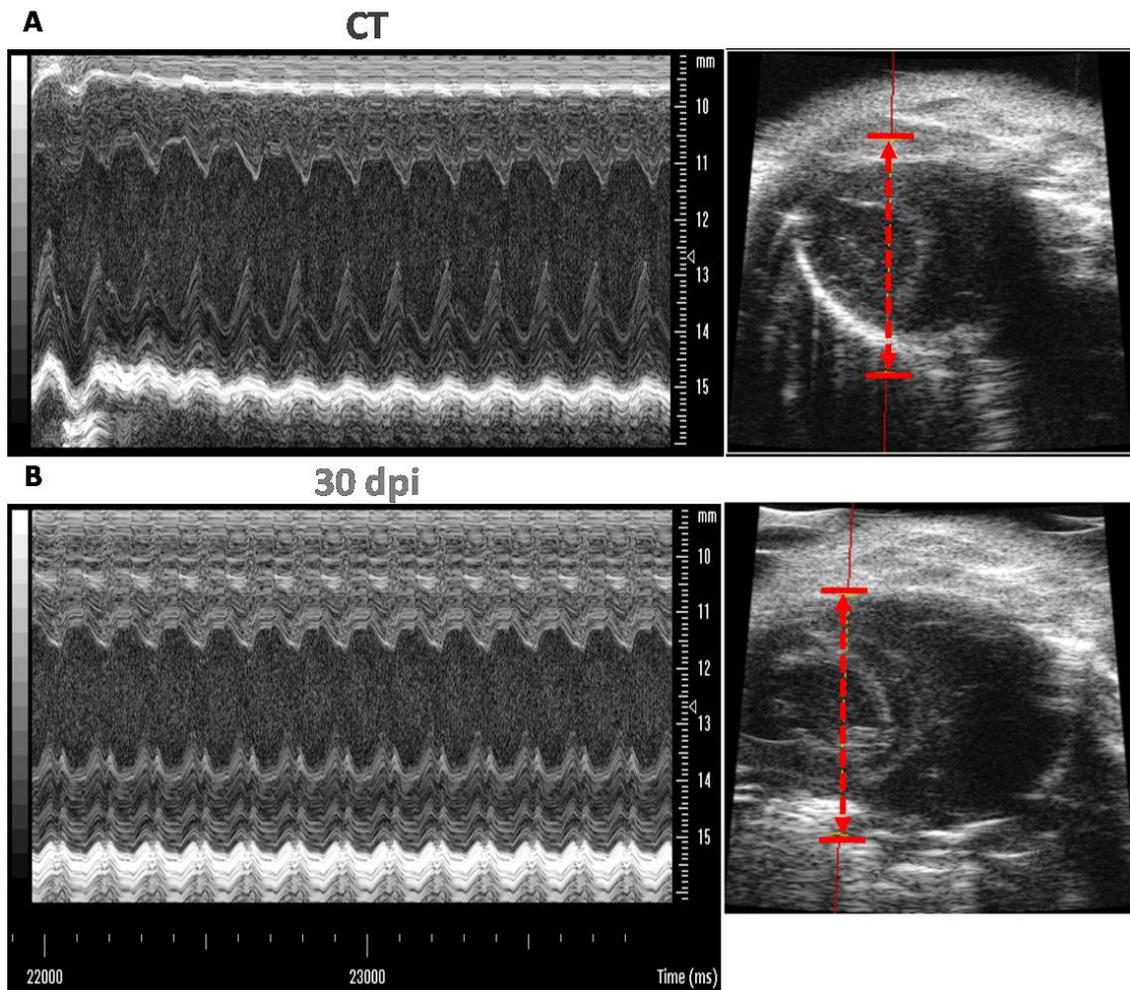
**Figura 17: Alternância de onda P nos animais aos 30 dias pós-infecção.** (A) Registro contínuo de um animal aos 30 dias pós-infecção, demonstrando a alternância de onda P. (B) e (C) mostram um trecho do registro para demonstrar a presença (B) e ausência (C) de onda P. Os círculos vermelhos evidenciam esse fenômeno.



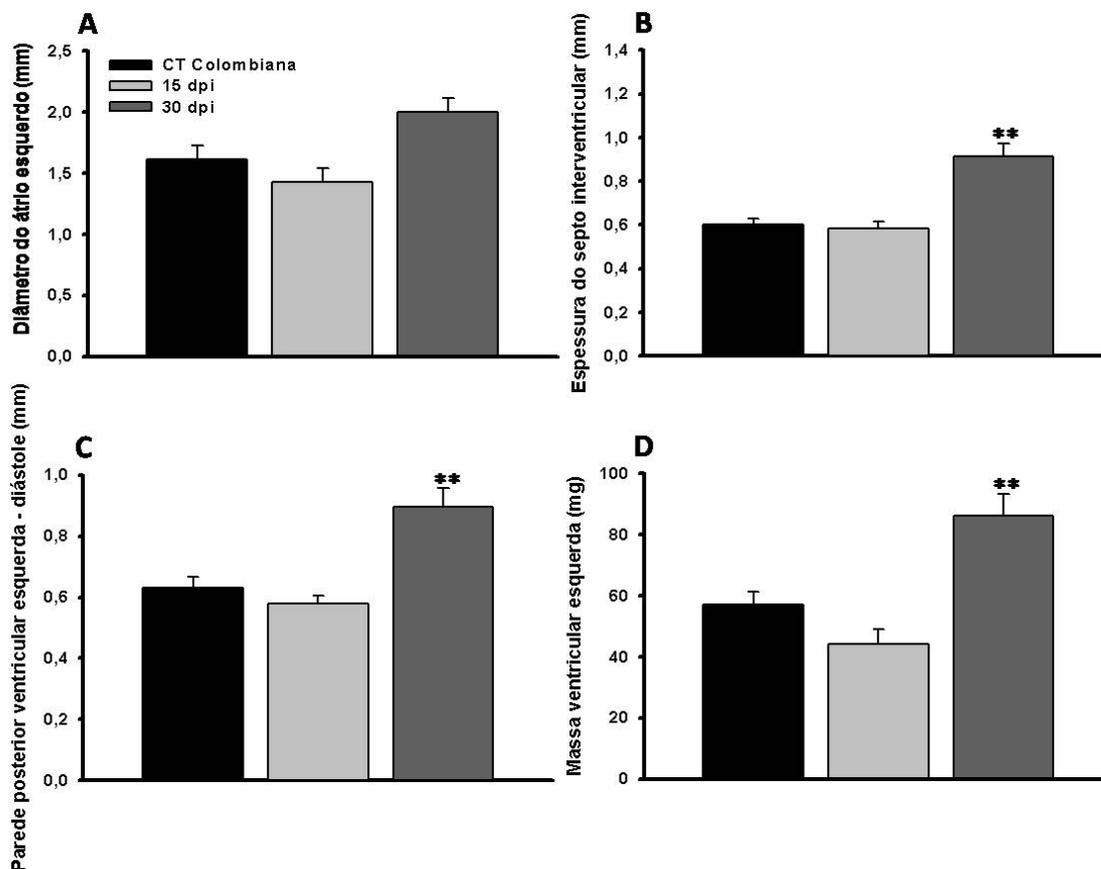
**Figura 18: Alternância do complexo QRS nos animais aos 30 dias pós-infecção.** Registro contínuo de um animal aos 30 dias pós-infecção, ilustrando a alternância na amplitude do complexo QRS. As setas evidenciam esse fenômeno.

### ***Ecocardiografia***

O coração possui um estreito acoplamento entre sua função elétrica e mecânica. Por esse motivo, para fazer um correlato entre as alterações elétricas encontradas *in vivo*, decidimos avaliar a funcionalidade do coração pela técnica de ecocardiografia. A figura 19 ilustra uma imagem representativa da ecocardiografia realizada no animal controle (figura 19A) e no animal com 30 dias pós-infecção (figura 19B). Quando se compara animal controle com infectado, pode-se perceber um espessamento da parede ventricular, conforme observado na parte esquerda da figura. Os parâmetros morfológicos da ecocardiografia estão sumarizados na figura 20.

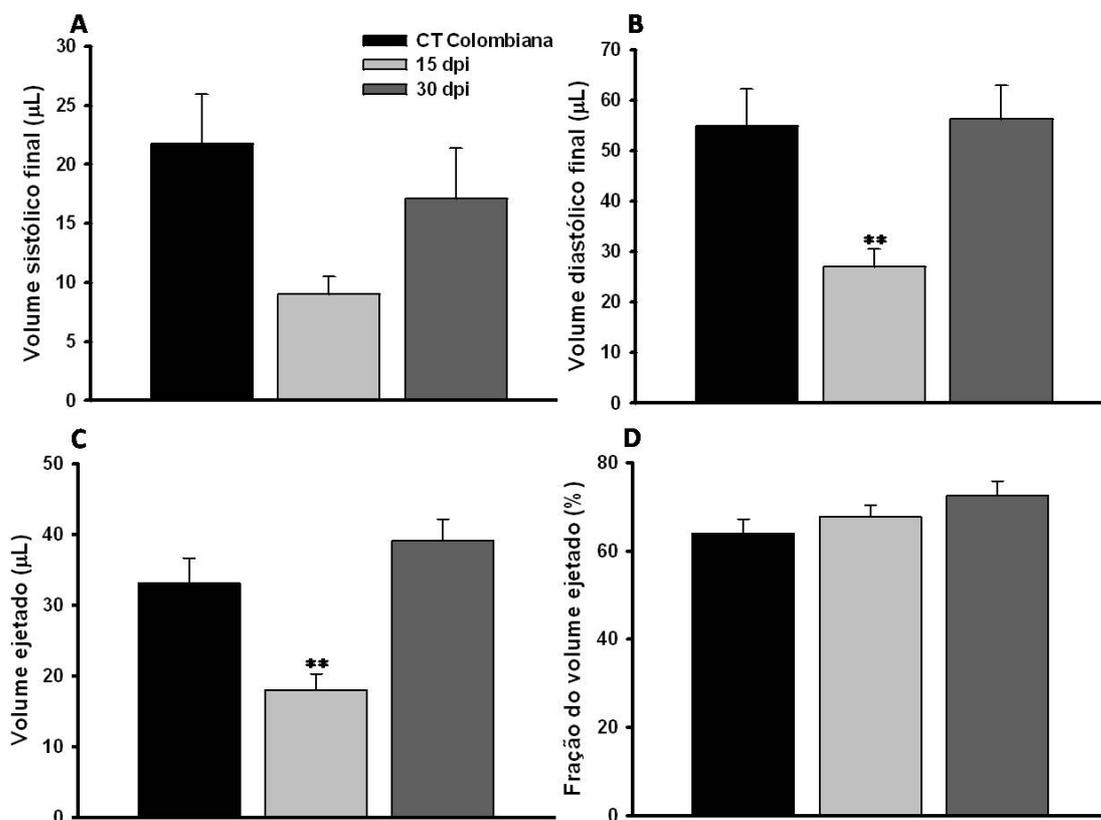


**Figura 19: Registro típico dos experimentos de ecocardiografia.** O painel à direita representa um corte transversal paralelo à base do coração. A linha vermelha representa a leitura da imagem, que é dada na figura à esquerda, a qual ilustra a profundidade da medida, a partir de um ponto de referência. (A) animal controle e (B) animal aos 30 dias pós-infecção.



**Figura 20: Parâmetros ecocardiográficos da cepa colombiana.** (A) Diâmetro do átrio esquerdo (mm). (B) Espessura do septo interventricular (mm). (C) Espessura da parede posterior ventricular esquerda (mm). (D) Massa ventricular esquerda (mg). CT Colombiana: Controle dos experimentos com a cepa colombiana (n=11); 15 dpi: 15 dias pós-infecção (n=7); 30 dpi: 30 dias pós-infecção (n=10). \*\*comparação entre CT e 30 dpi. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM, \*\*  $p < 0,05$ , *one-way anova*.

Conforme pode ser notado na figura 20, praticamente todos os parâmetros avaliados apresentam uma tendência à redução da massa cardíaca aos 15 dpi, com posterior aumento do tamanho dessas mesmas áreas aos 30 dpi: diâmetro atrial (A), espessura do septo interventricular (B), parede posterior ventricular esquerda (C) e massa ventricular esquerda (D). Por exemplo, a massa ventricular esquerda (em mg) foi de  $57,1 \pm 4,2$ ;  $44,2 \pm 4,9$ ; e  $86,1 \pm 7,3$  nos animais controle, 15 e 30 dpi respectivamente. Além dos parâmetros morfológicos, a ecocardiografia permite avaliar parâmetros funcionais do coração, dados sumarizados na figura 21.



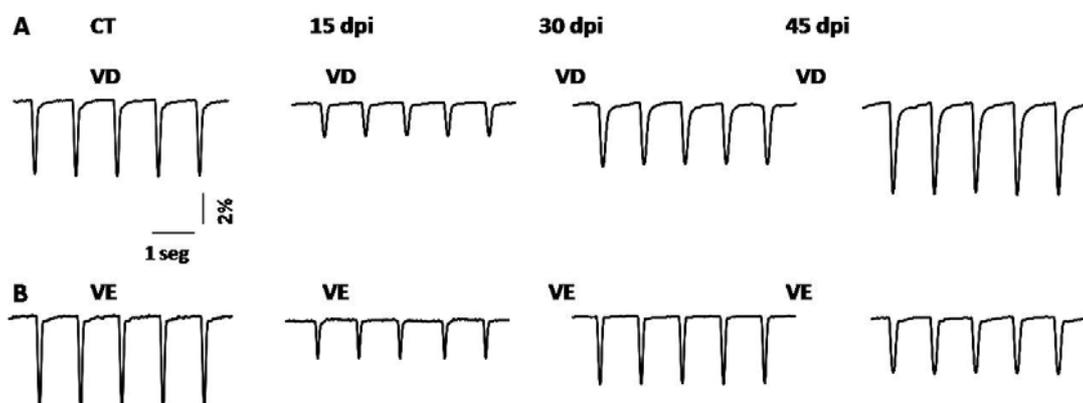
**Figura 21: Parâmetros ecocardiográficos cepa colombiana.** (A) Volume sistólico (µL). (B) Volume diastólico (µL). (C) Volume ejetado (µL). (D) Fração do volume ejetado (%). CT Colombiana: Controle dos experimentos com a cepa colombiana (n=11); 15 dpi: 15 dias pós-infecção (n=7); 30 dpi: 30 dias pós-infecção (n=10). \* comparação entre CT e 15 dpi. Os dados são expressos como média ± EPM, \* p<0,05, *one-way anova*.

Para os parâmetros hemodinâmicos avaliados, a figura 21 mostra que aos 15 dpi ocorre um agravamento da função cardíaca devido à redução do volume sistólico e diastólico, acompanhada de uma recuperação praticamente total de todos os parâmetros estudados: tanto volume sistólico (A), diastólico (B), e ejetado (C), aos 30 dpi. A fração de ejeção (D) permaneceu constante. O volume ejetado foi de (em µL)  $33,1 \pm 3,5$ ;  $18,1 \pm 2,2$ ; e  $39,12 \pm 2,9$  nos animais controle, 15 e 30 dpi, respectivamente.

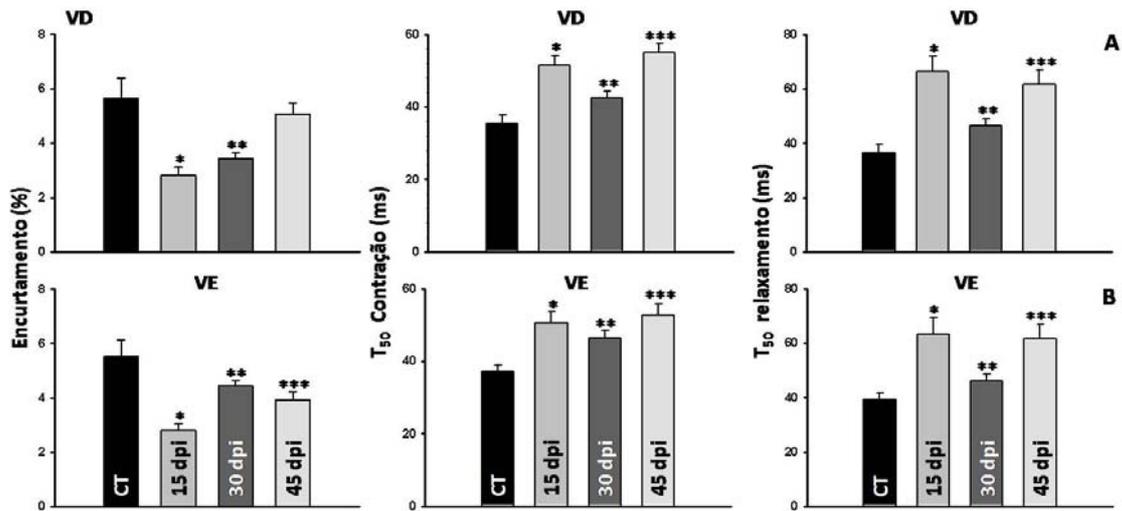
### ***Contratilidade celular***

Como ficou demonstrado nos experimentos de ecocardiografia, o coração dos animais chagásicos apresenta, na fase aguda, uma alteração na sua funcionalidade. Para melhor averiguar as alterações celulares que ocorrem nos cardiomiócitos dos animais, decidimos estudar a capacidade contrátil dos cardiomiócitos isolados aos 15, 30 e 45 dpi, tanto do ventrículo esquerdo quanto do direito, para averiguar se os cardiomiócitos de ambas as câmaras cardíacas são igualmente afetados pela infecção por *T. cruzi*.

A figura 22 representa traçados para as diferentes câmaras cardíacas estudadas, em diferentes dias pós-infecção. Como pode ser notado nessa figura, ocorre uma redução da capacidade contrátil das células dos ventrículos esquerdo e direito, bem como uma alteração na cinética até o pico da contração, bem como para o completo relaxamento. A figura 22A representa os traçados para as células do ventrículo direito, e a figura 22B, os traçados para as células do ventrículo esquerdo. Os resultados ilustrados na figura 22 estão sumarizados na figura 23 e nas tabelas 1-2 (anexo 1).



**Figura 22: Traçados representativos da contratilidade celular.** Da esquerda para a direita, traçados representativos das células controle, 15, 30 e 45 dias pós-infecção (15, 30 e 45 dpi). (A) Traçados de células do ventrículo direito (VD). (B) Traçados de células do ventrículo esquerdo.



**Figura 23: Parâmetros da contratilidade celular.** Da esquerda para a direita: Porcentagem de encurtamento da célula cardíaca; Tempo para 50% da contração (ms); Tempo para 50% do relaxamento (ms). (A) Resultados para o ventrículo direito (VD). (B) Resultados para o ventrículo esquerdo (VE). CT VE (n=28) controle ventrículo esquerdo; CT VD (n=23) controle ventrículo direito; 15 (n=32), 30 (n=50) e 45 (n=41) dias pós-infecção (15, 30 e 45 dpi) ventrículo esquerdo e 15 (n=30), 30 (n=47) e 45 (n=31) dias pós-infecção ventrículo direito. \*comparação entre CT e 15 dpi; \*\*comparação entre CT e 30 dpi; \*\*\*comparação entre CT e 45 dpi. Os dados são expressos como média ± EPM, \*, \*\*, \*\*\* p<0,05, *one-way anova*.

Como pode se notar na figura 23, basicamente todos os parâmetros de funcionalidade dos miócitos dos ventrículos direito e esquerdo apresentaram piora de função nos períodos avaliados. Por exemplo, o encurtamento celular (em %) foi de  $5,7 \pm 0,7$  e  $5,5 \pm 0,6$  para controle do ventrículo direito e esquerdo e de  $3,5 \pm 0,2$  e  $4,4 \pm 0,2$  para células isoladas de animais infectados com 30 dpi, no ventrículo direito e esquerdo respectivamente. Além disso, o tempo para 50% da contração (em ms) foi de  $35,4 \pm 2,3$  e  $37,4 \pm 1,61$  para controle do ventrículo direito e esquerdo e de  $42,5 \pm 1,7$  e  $46,5 \pm 1,93$  para células isoladas de animais infectados com 30 dpi, nos ventrículos direito e esquerdo, respectivamente. Já considerando o tempo para 50% do relaxamento, obtivemos valores (em ms) de  $36,5 \pm 3,1$  e  $39,3 \pm 2,52$  para controle do ventrículo direito e esquerdo, e de  $46,2 \pm 2,5$  e  $46,5 \pm 2,54$  para células isoladas de animais infectados com 30 dpi, no ventrículo direito e esquerdo, respectivamente. Além dos parâmetros apresentados na figura 23, a máxima taxa de contração e relaxamento

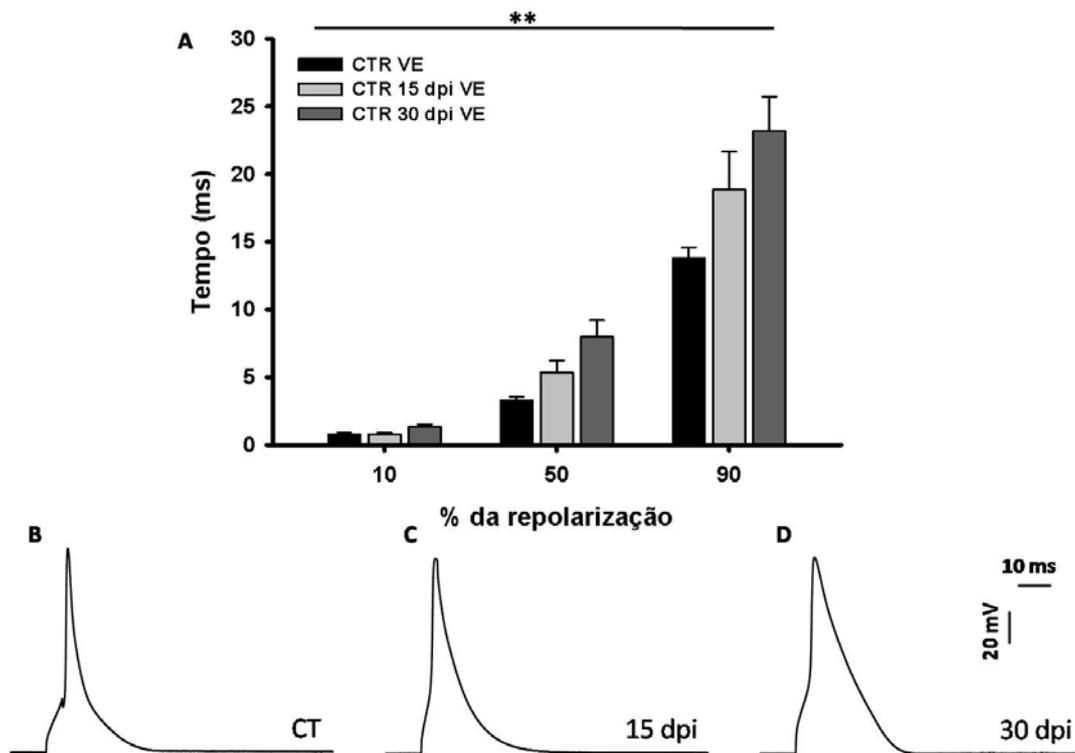
também se apresentou atenuada nos grupos de animais infectados, conforme demonstrado nas tabelas 1 e 2 (anexo 1).

### ***Propriedades elétricas dos cardiomiócitos - cepa colombiana***

Da mesma forma que estudamos as propriedades mecânicas dos miócitos isolados, decidimos avaliar as propriedades elétricas dos miócitos ventriculares isolados, já que o coração é um órgão que apresenta um profundo acoplamento eletromecânico.

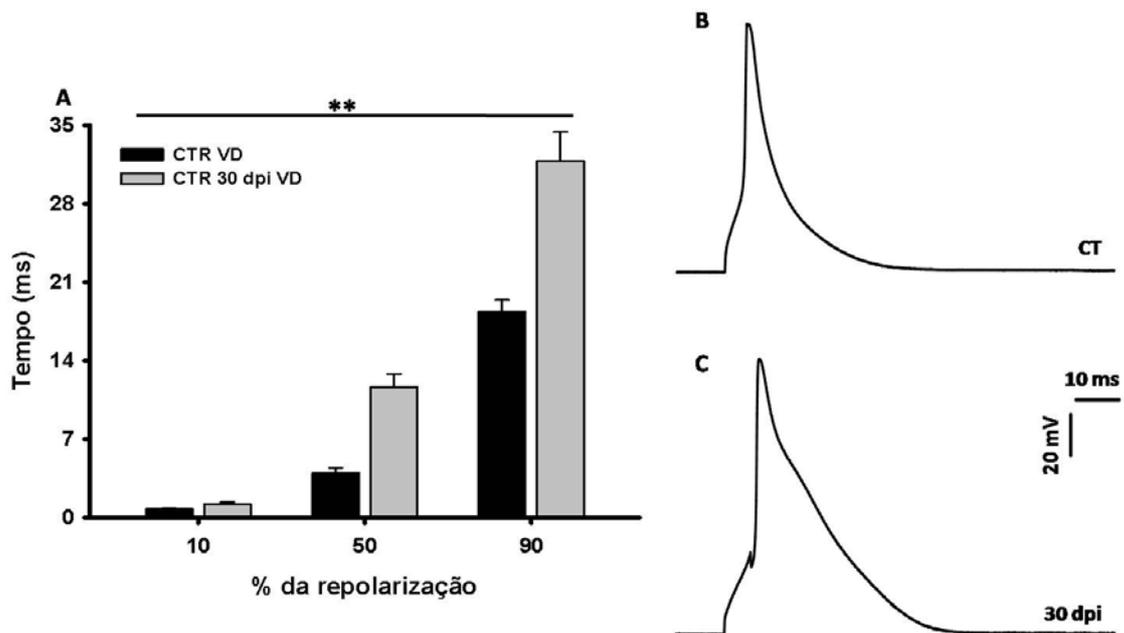
#### *Potencial de ação*

Para iniciar a caracterização elétrica dos cardiomiócitos infectados com *T. cruzi*, avaliamos primeiramente o potencial de ação (PA) de cardiomiócitos do ventrículo direito e esquerdo, isolados de animais infectados com *T. cruzi* aos 15 e/ou 30 dpi, já que ele representa o somatório dos componentes iônicos responsáveis pelo controle da excitabilidade do cardiomiócito. Primeiramente avaliamos o PA de células ventriculares esquerda. Como podemos perceber pela figura 24, os cardiomiócitos dos animais infectados por *T. cruzi*, apresentam alterações na repolarização do PA. Em A está representada a duração para diferentes porcentagens da repolarização do PA, e em B, C e D estão representados os traçados representativos para células controle, 15 e 30 dpi. Como podemos observar na figura 24, a infecção causou um aumento gradual na duração do PA, indicando uma progressão na disfunção celular. Por exemplo, a 90% da repolarização, o ventrículo esquerdo apresentou valores (em ms) de  $13,8 \pm 0,8$ ,  $18,8 \pm 2,9$  e  $23,2 \pm 2,5$  para os animais controle, 15 e 30 dpi respectivamente. Além disso, outros parâmetros do potencial de ação foram alterados, como a máxima taxa de despolarização (tabela 3, anexo 1).



**Figura 24: Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - cepa colombiana.** (A) Tempo para repolarização do potencial de ação a 10, 50 e 90%. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR VE n=14), e para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 (n=10) e 30 (n=11) dpi VE). As barras representam média  $\pm$  EPM. \*\* comparando CT com 30 dpi. \*\*  $p < 0,05$ , *one-way anova*.

Da mesma forma, avaliamos o PA de células do ventrículo direito, e observamos resultados parecidos, conforme ilustrado na figura 25. Na 25A está representada a média para diferentes porcentagens da repolarização do PA, e em B e C são apresentados os traçados representativos para as células controle e 30 dpi, respectivamente. A 90% da repolarização os valores (em ms) foram de  $18,3 \pm 1,1$  e  $31,8$  para as células controle e para as células isoladas dos animais aos 30 dpi. Considerando os demais parâmetros, as células do VD apresentaram um aumento do *overshoot*, como demonstrado na tabela 4 (anexo 1).



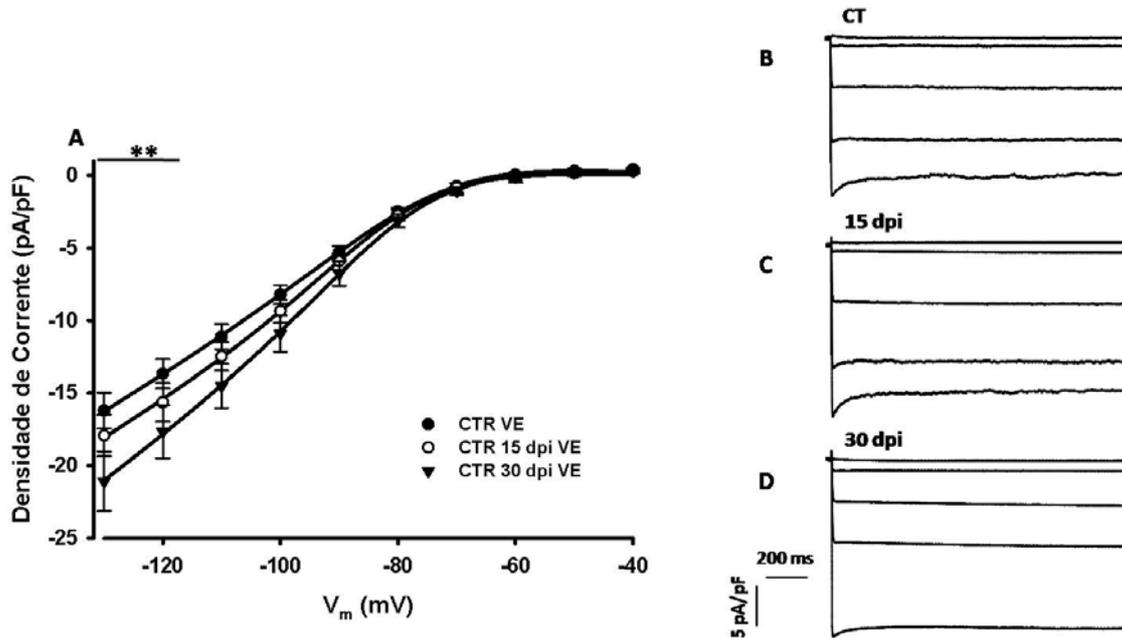
**Figura 25: Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos do ventrículo direito - cepa colombiana.** (A) Tempo para a repolarização do potencial de ação a 10, 50 e 90%. (B, C, D) Traçados representativos para cardiomiócitos controles do ventrículo direito (CTR VD n=22), e para cardiomiócitos infectados do ventrículo direito a 30 dias pós-infecção (CTR 30 dpi VD n=20). As barras representam média  $\pm$  EPM. \* comparando CT com 30 dpi. \*\*  $p < 0,05$ , *one-way anova*.

### *Correntes de potássio*

As correntes de potássio em cardiomiócitos apresentam um papel fundamental no processo de repolarização das células musculares cardíacas. Assim sendo, decidimos estudar maiores detalhes das correntes de influxo e efluxo de potássio. Da mesma forma que para os experimentos de contratilidade celular e PA, estudamos as correntes de potássio das células musculares do ventrículo direito e esquerdo.

Inicialmente, avaliamos a corrente de potássio de entrada, denominada retificadora de entrada ( $I_{K1}$ ). Primeiramente avaliamos a  $I_{K1}$  em células do VE. Como pode ser visualizado na figura 26, ocorre um ligeiro aumento na densidade de corrente ao longo da infecção. Na figura 26A é apresentada a relação da densidade de corrente

em função da voltagem, e em B, C e D os traçados representativos para as células controle, 15 e 30 dpi.



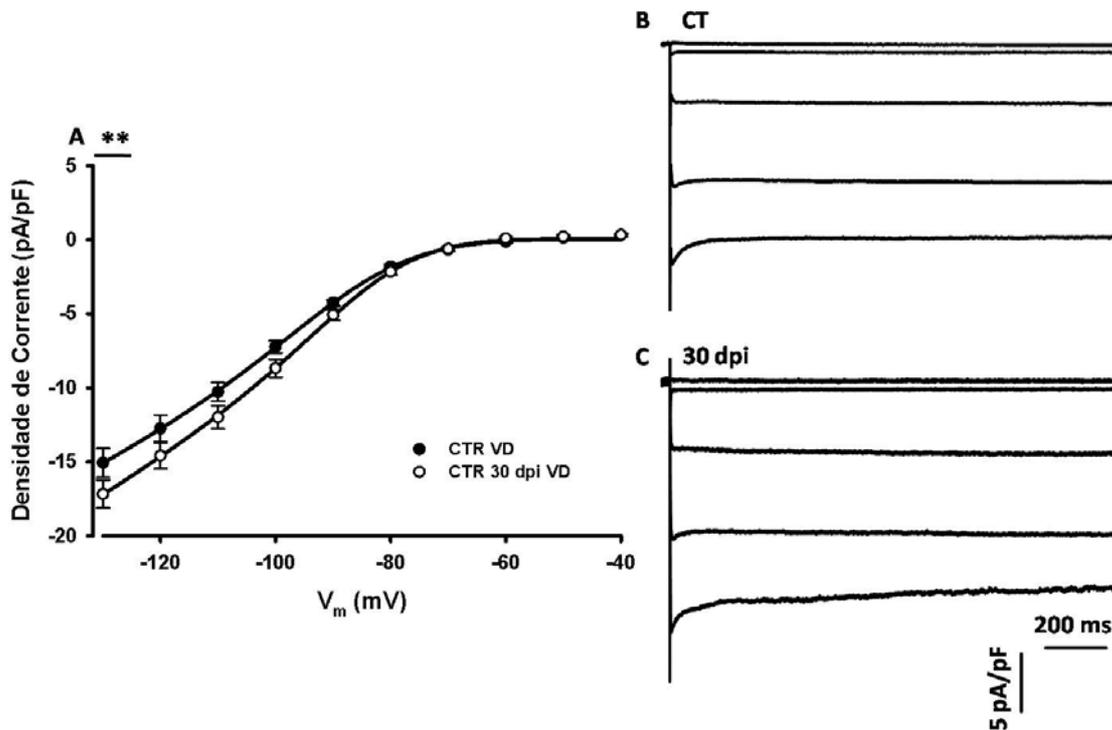
**Figura 26: Corrente de Potássio Retificadora de Entrada ( $I_{K1}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - cepa colombiana.** (A) Relação da corrente sustentada, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR VE n=12), e para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 (n=8) e 30 (n=15) dpi VE).. \*\* comparação entre CT e 30 dpi. \*\*  $p < 0,05$ , *two-way anova*.

Conforme observado na figura 26A, ocorre um aumento progressivo na densidade de corrente de potássio ao longo do tempo de infecção (entre -130 e -90 mV). Por exemplo, em -130 mV obtivemos valores de densidade de corrente (pA/pF) de  $-16,2 \pm 1,2$ ,  $-17,9 \pm 1,7$  e  $-21,1 \pm 2,1$  para células controle, aos 15 e 30 dpi respectivamente. Além disso, quando avaliamos a condutância para a  $I_{K1}$ , não foi observado aumento nos seus valores (figura 1, anexo 2).

Na figura 27 são sumarizados os principais achados para a  $I_{K1}$  em células do ventrículo direito. Na figura 27A é apresentada a relação da densidade de corrente em

função da voltagem, e em B e C os traçados representativos para as células controle e 30 dpi.

Considerando as células do VD, quando avaliamos a  $I_{K1}$ , observamos apenas uma tendência de aumento na densidade de corrente (figura 27A), e em sua condutância (figura 1, anexo 2). Por exemplo, em -130 mV obtivemos valores de densidade de corrente (pA/pF) de  $-15,1 \pm 0,9$  e  $-17,1 \pm 0,9$  nas células controle e com 30 dpi. Da mesma forma que para as células do VE, as células do VD apenas apresentam uma tendência de aumento do valor de condutância (figura 1, anexo 2).

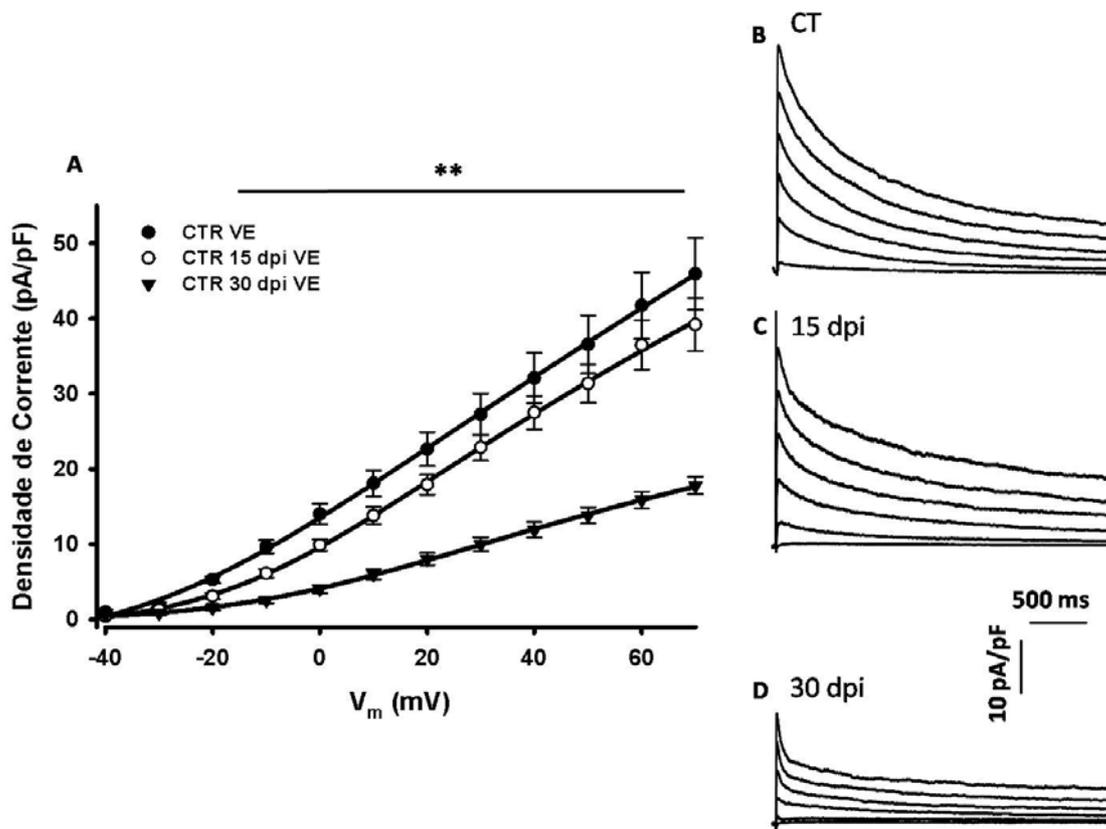


**Figura 27: Corrente de potássio retificadora de entrada ( $I_{K1}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo direito - cepa colombiana.** (A) Relação da corrente sustentada, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo direito (CTR VD n=17), e para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo a 30 dias pós-infecção (CTR 30 dpi VD n=15). Apenas os pulsos ímpares estão representados.

Dando continuidade à caracterização das correntes de potássio em nosso modelo, decidimos avaliar a corrente total de potássio de saída, utilizando um protocolo capaz de

separar a corrente transiente de saída de potássio ( $I_{to}$ ) da corrente de potássio retificadora retardada ( $I_K$ ) (protocolos página 52).

Os resultados para as células do ventrículo esquerdo são apresentados na figura 28. Na figura 28A está representada a relação da densidade de corrente por voltagem, e em B, C e D os traçados representativos para as células controle, 15 e 30 dpi. Como pode se notar, ocorre uma profunda alteração nessa família de correntes a 30 dpi. Em relação à  $I_{to}$ , valor máximo de corrente do início do pulso, por exemplo, a 70 mV obtivemos valores de densidade de corrente (pA/pF) de  $45,9 \pm 7,8$ ,  $39,2 \pm 3,4$  e  $17,8 \pm 1,1$  para as células controle, 15 e 30 dpi respectivamente.

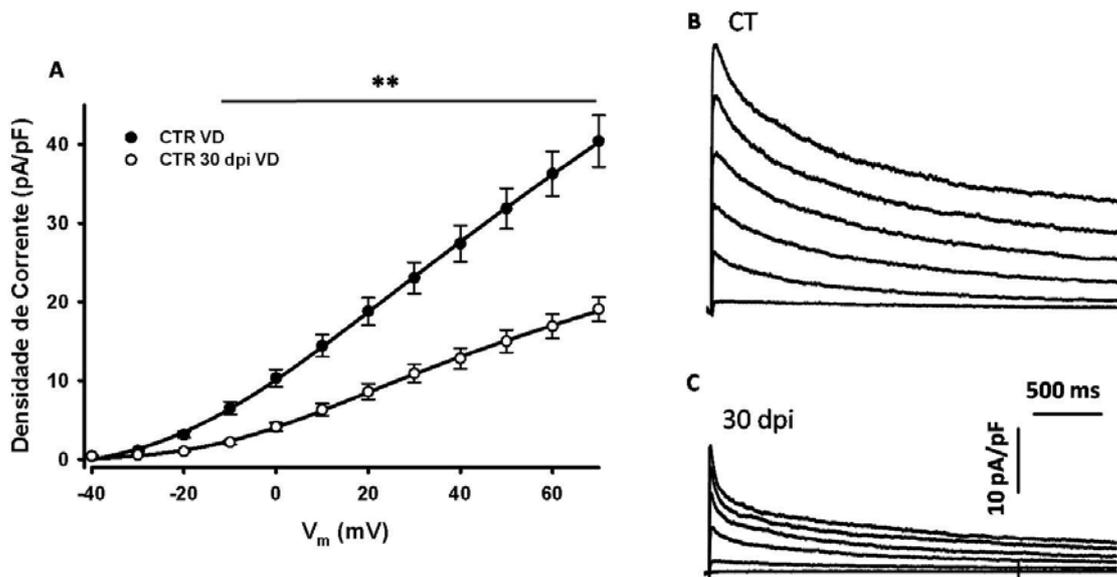


**Figura 28: Corrente transiente rápida de saída de potássio ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - cepa colombiana.** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR VE n=15), e para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 (n=10) e 30 (n=13) dpi VE). \*\* comparação entre CT e 30 dpi. \*\*  $p < 0,05$ , two-way anova.

Considerando o componente sustentado da corrente de potássio, que é composto principalmente pela  $I_K$ , observamos resultados parecidos de redução da densidade de corrente, porém a amplitude da redução foi menor do que aquela apresentada pela  $I_{to}$  (dado não mostrado). Além disso, ao longo da infecção, ocorreu um ligeiro aumento para a direita na curva de condutância, indicando alterações no controle de *gating* do canal, conforme demonstrado na figura 2 (anexo 2) e tabela 5 (anexo 1).

Quando avaliamos os cardiomiócitos do ventrículo direito, obtivemos resultados parecidos aos encontrados no ventrículo esquerdo. A figura 29 sumariza tais resultados. A figura 29A apresenta a relação da densidade de corrente por voltagem, e em B, C e D os traçados representativos para as células controle e 30 dpi.

Como pode ser observado, no VD também ocorre uma forte atenuação da densidade de corrente a 30 dpi. Por exemplo, a  $I_{to}$  apresentou valores de densidade de corrente (pA/pF) a 70 mV de  $40,4 \pm 3,3$  e 19,1 para as células controles e isoladas de animais a 30 dpi. Da mesma forma, o componente sustentado da corrente de potássio ( $I_K$ ) foi atenuado no VD (dado não demonstrado). Além disso, da mesma forma que o VE, o VD apresentou um deslocamento da curva de condutância para a direita, indicando que os processos envolvidos no remodelamento elétrico do ventrículo direito e esquerdo, considerando as correntes de potássio e o PA, são similares. Os dados de condutância para o VD podem ser visualizados na figura 3 (anexo 2) e tabela 6 (anexo 1).



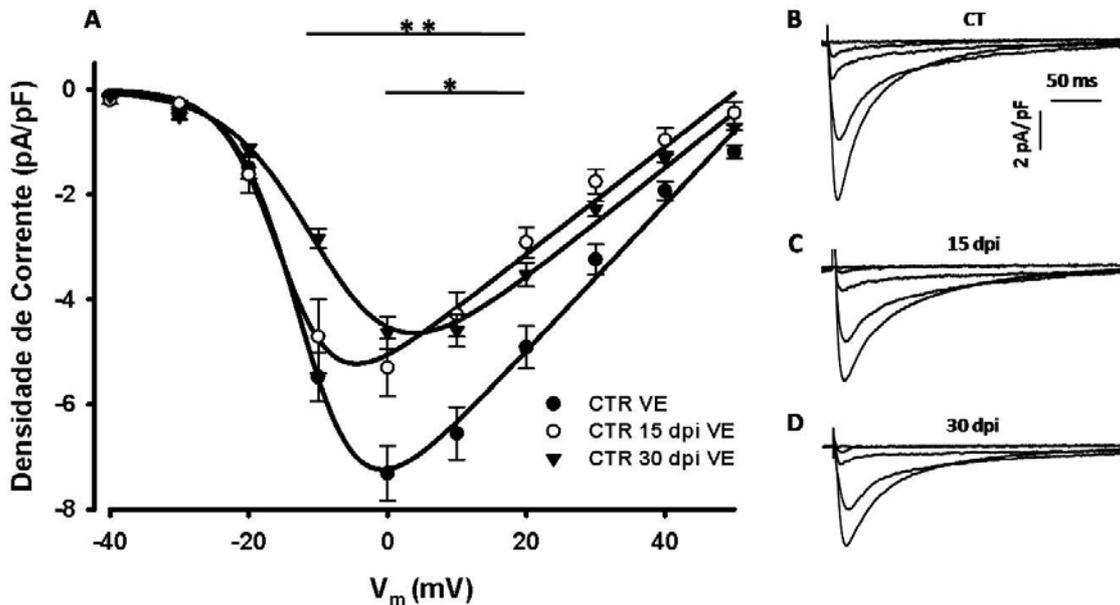
**Figura 29: Corrente transiente de saída de potássio ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo direito - cepa colombiana.** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo direito (CTR VD n=17), e para os cardiomiócitos do ventrículo direito aos 30 dias pós-infecção (CTR 30 dpi VD n=15). \*\* comparação entre CT e 30 dpi. \*\*  $p < 0,05$ , *two-way anova*.

### Corrente de Cálcio do tipo L

Além das correntes de potássio, a corrente de cálcio ( $I_{Ca,L}$ ) apresenta um importante papel na repolarização do PA em cardiomiócitos, bem como um importante papel na regulação da capacidade contrátil das células musculares cardíacas. Por esses motivos, decidimos avaliar a funcionalidade dos canais para  $Ca^{2+}$ .

Quando avaliamos a  $I_{Ca,L}$ , no ventrículo esquerdo, podemos observar que ocorre uma acentuada redução na densidade de corrente tanto para as células aos 15 como aos 30 dpi, como mostrado na figura 30. Na figura 30A está representada a relação da densidade de corrente em função da voltagem, e em B, C e D, os traçados representativos para as células controle, 15 e 30 dpi. Por exemplo, a 0 mV a densidade de corrente (pA/pF) foi de  $-7,3 \pm 0,5$ ,  $-5,3 \pm 0,6$  e  $-4,6 \pm 0,3$  para as células controle, aos 15 e 30 dpi. Além disso, a curva de condutância, o tempo para o pico da  $I_{Ca,L}$  e a

constante de tempo para inativação apresentaram alterações, indicando que o funcionamento do canal, de uma forma geral, encontra-se alterado. Esses resultados podem ser visualizados na figura 4 (anexo 2) e tabela 7 (anexo 1).

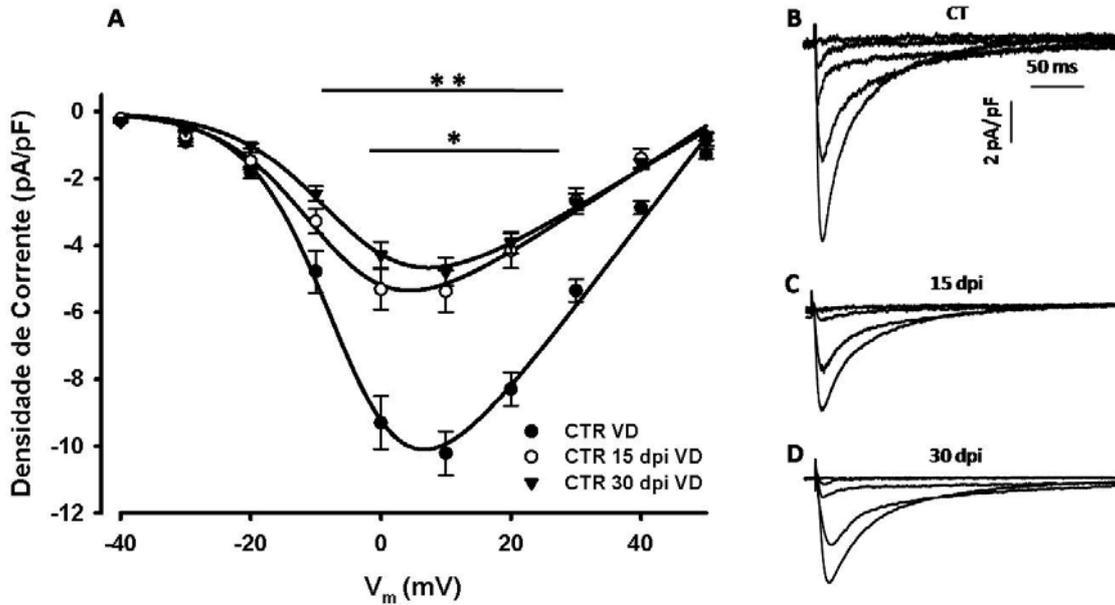


**Figura 30: Corrente de Cálcio ( $I_{Ca,L}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - cepa colombiana.** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR VE n=17), cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 (n=8) e 30 (n=25) dpi VE). \* comparação entre CT e 15 dpi; \*\* comparação entre CT e 30 dpi. \*, \*\*  $p < 0,05$ , *two-way anova*.

Da mesma forma que avaliamos a  $I_{Ca,L}$  para o ventrículo esquerdo, o fizemos para o VD. Como os demais resultados, obtivemos um perfil semelhante, porém não totalmente igual ao VE. Um sumário dos resultados é apresentado na figura 31. Na figura 31A está representada a relação da densidade de corrente por voltagem, e em B, C e D, os traçados representativos para as células controle, 15 e 30 dpi. Por exemplo, a 0 mV, obtivemos valores de densidade de corrente (pA/pF) de  $-10,2 \pm 0,7$ ,  $-5,3 \pm 0,6$  e  $-4,3 \pm 0,4$  para as células controle, 15 e 30 dpi, respectivamente.

Diferentemente do VE, o VD não apresentou alteração na curva de condutância, apenas apresentando mudança no tempo para o pico da corrente e as constantes de

tempo para inativação. Isso indica que os VE e VD são modulados de forma diferente quanto à regulação da  $I_{Ca,L}$ . Outros dados serão apresentados posteriormente, para reforçar essa idéia. Esses resultados podem ser visualizados na figura 5 (anexo 2) e tabela 8 (anexo 1).

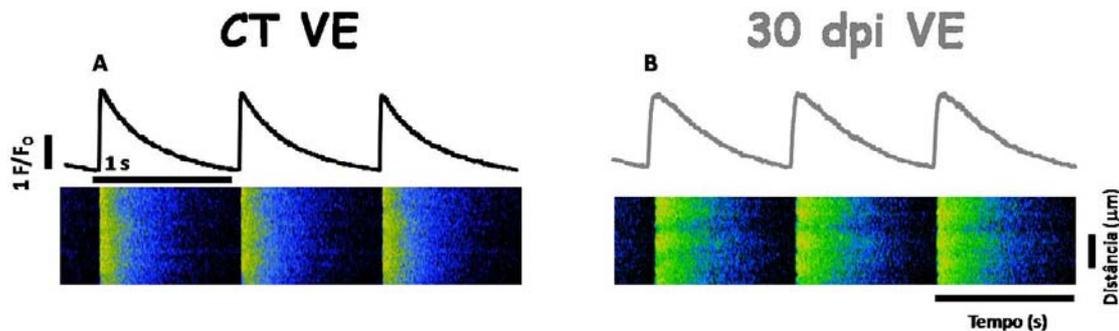


**Figura 31: Corrente de Cálcio ( $I_{Ca,L}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo direito - cepa colombiana.** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo direito (CT VD n=12), e para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 (n=10) e 30 (n=16) dpi VD). \* comparação entre CT e 15 dpi; \*\* comparação entre CT e 30 dpi. \*, \*\*  $p < 0,05$ , two-way anova.

## Dinâmica intracelular de cálcio

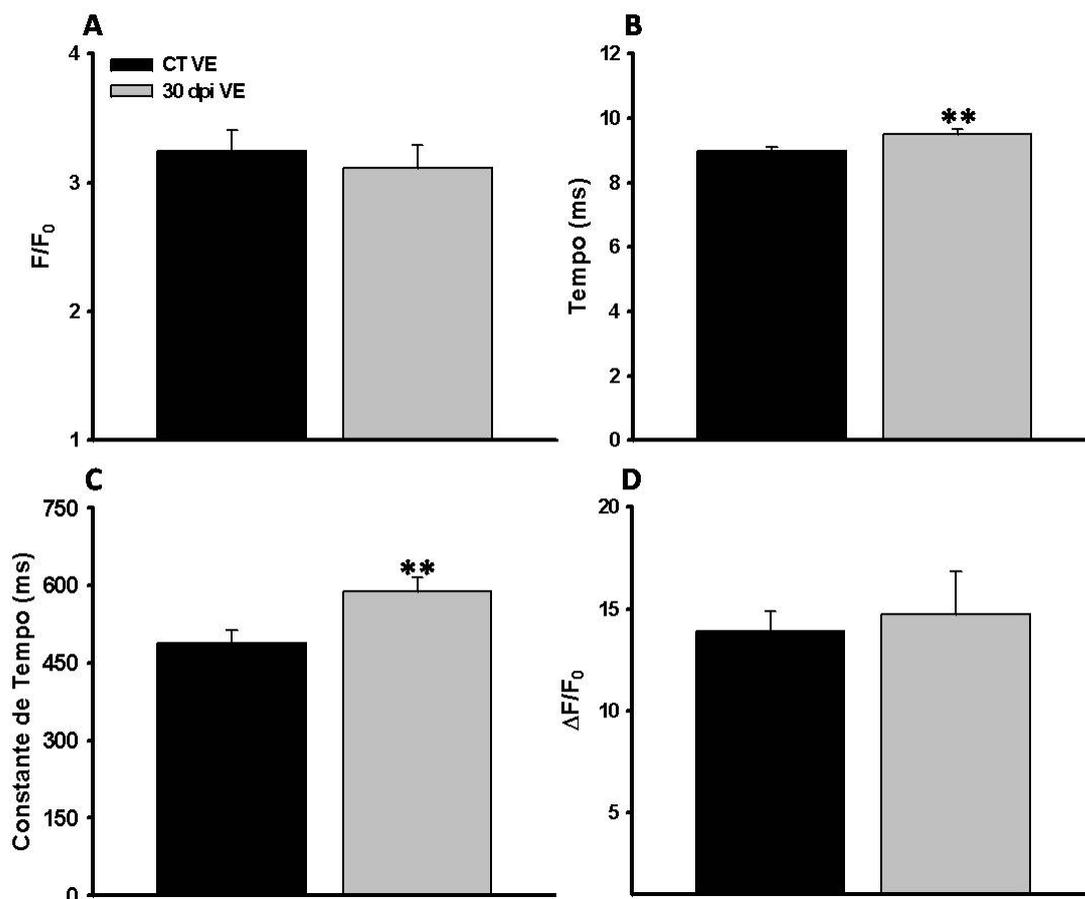
### Transiente e estoque Intracelular de cálcio

Sabendo-se que a  $I_{Ca,L}$  tem como principal função ativar a liberação dos estoques intracelulares de  $Ca^{2+}$ , nós também avaliamos a liberação desse íon pelo retículo sarcoplasmático. Porém, esses estudos foram conduzidos apenas em células do ventrículo esquerdo. Na figura 32 são apresentadas as imagens (parte inferior) e traçados representativos (parte superior) para os resultados encontrados. Na figura 32A são ilustrados os resultados para células controles e, na figura 32B, para as células de animais com 30 dpi.



**Figura 32: Figuras representativas do transiente de cálcio.** Parte superior: curva média da intensidade de fluorescência ao longo do tempo; parte inferior: imagens representativas. (A) CT VE: imagem representativa de um experimento controle de células do ventrículo esquerdo. (B) 30 dpi VE: imagem representativa de um experimento de células do ventrículo esquerdo isoladas de animais infectados com *T. cruzi* aos 30 dias pós-infecção (30dpi).

Como podemos notar na figura 32, aparentemente não ocorre uma redução da intensidade de fluorescência, porém ocorre uma alteração na cinética, tanto de ativação quanto de recaptura de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (figura 33). Nessa figura, são apresentados os dados da relação da intensidade de fluorescência máxima pela basal (A), o tempo para o pico do transiente (B), e a constante de tempo para recaptura de cálcio (C). Além disso, na mesma figura está representado o resultado de um experimento adicional, para avaliar os estoques intracelulares de cálcio do retículo sarcoplasmático (D).



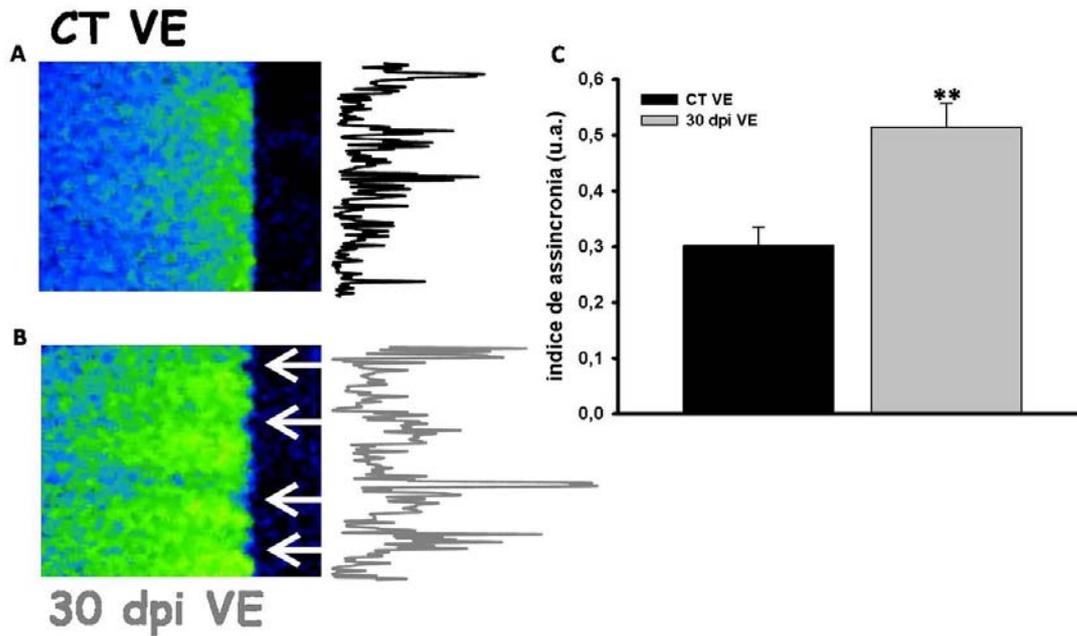
**Figura 33: Parâmetros do transiente global de cálcio e estoque de cálcio do retículo sarcoplasmático.** (A) Relação da fluorescência máxima pela basal. (B) Tempo para o pico do transiente (ms) (CT n=34, 30 dpi VE n=35). (C) Constante de tempo para recaptura de cálcio (ms). (D) Estoque de cálcio do retículo sarcoplasmático, medido pela relação da variação de fluorescência pela fluorescência basal (CT n=24, 30 dpi VE n=26). CT VE: cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais controle; 30 dpi VE: cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais infectados com *T. cruzi* após 30 dias de infecção. \*\* comparação entre CT e 30 dpi. Os dados são expressos como média ± EPM, \*\* p<0,05, teste *t* de *student*.

De fato, a relação da intensidade de fluorescência máxima pela basal não se encontra alterada nos animais infectados. Os valores são (F/F<sub>0</sub>) 3,2 ± 0,2 e 3,1 ± 0,2, para os animais controle e com 30 dpi respectivamente, figura 33A. Apesar dos valores da relação não se apresentarem diferentes, o valor da fluorescência basal foi diferente entre os grupos, sendo de 37,2 ± 2,4 e 50,1 ± 3,1 (unidade arbitrária) para os animais controle e 30 dpi, respectivamente. Apesar dos valores da relação de fluorescência não

serem diferentes, os valores cinéticos associados à liberação de cálcio foram atenuados nos animais infectados. O tempo para o pico foi maior nos animais infectados (figura 33B), sendo de (em ms)  $8,9 \pm 0,1$  e  $9,6 \pm 0,1$ , para os animais controle e com 30 dpi. Adicionalmente, a constante de tempo para recaptura de cálcio (figura 33C) foi aumentada nos animais infectados, sendo (em ms) de  $487,4 \pm 26,6$  e  $588,6 \pm 26,9$  para as células controle e com 30 dpi. Também avaliamos o estoque intracelular de cálcio do retículo sarcoplasmático, sendo que esses valores também não foram alterados nos animais infectados. A variação da intensidade de fluorescência pela fluorescência basal ( $\Delta F/F_0$ ) foi de  $13,8 \pm 1,1$  e  $14,8 \pm 2,1$ , nas células controle e com 30 dpi, figura 33D.

#### *Assincronia na liberação de cálcio*

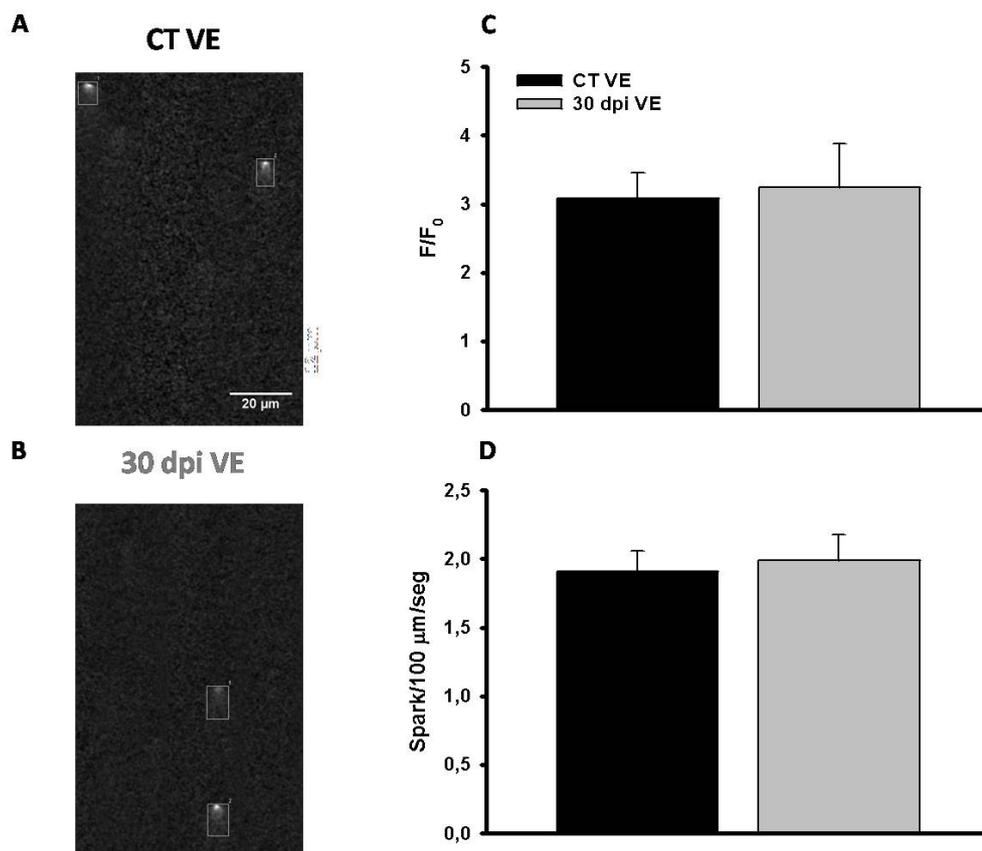
Quando avaliamos com maiores detalhes a frente de onda associada à liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, pela ativação do receptor de rianodina, percebemos que ocorre uma assincronia na liberação de cálcio nas células de animais infectados. A descrição da análise desses resultados foi apresentada na secção *Materiais e métodos*. A figura 34 ilustra e sumariza esse achado. Na figura 34A e B são apresentadas a imagem (esquerda) e a curva para o  $T_{50}$  da recaptura de cálcio (direita). Em C é apresentado o índice de assincronia. Obtivemos valores para o índice de assincronia de (unidade arbitrária)  $0,31 \pm 0,03$  e  $0,51 \pm 0,04$  para as células controle e com 30 dpi respectivamente.



**Figura 34: Índice de sincronia da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático.** (A) e (B) Figuras representativas da intensidade de fluorescência da frente de onda de liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (esquerda) e o traçado representando o tempo para alcançar o máximo de fluorescência em cada uma das linhas (direita). CT VE: cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais controle (n=34); 30 dpi VE: cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais infectados com *T. cruzi* após 30 dias de infecção (n=35). (A) CT VE. (B) 30 dpi VE. (C) Índice de assincronia em unidades arbitrárias. \*\* comparação entre CT VE e 30 dpi VE. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM, \*\*  $p < 0,05$ , teste *t* de *student*.

#### *Sparks de cálcio*

Além de avaliarmos a atividade global associada à liberação de cálcio, decidimos estudar em maiores detalhes as *sparks* de cálcio, que correspondem a uma das unidades básicas de liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Como podemos notar na figura 35, não ocorre, de uma forma geral, uma alteração na intensidade e na frequência das *sparks*. As figuras 35A e B são figuras representativas contendo duas *sparks* cada, para as células controle e com 30 dpi. As *sparks* são evidenciadas pelos retângulos brancos. Em C é apresentada a intensidade das *sparks* e em D a frequência.

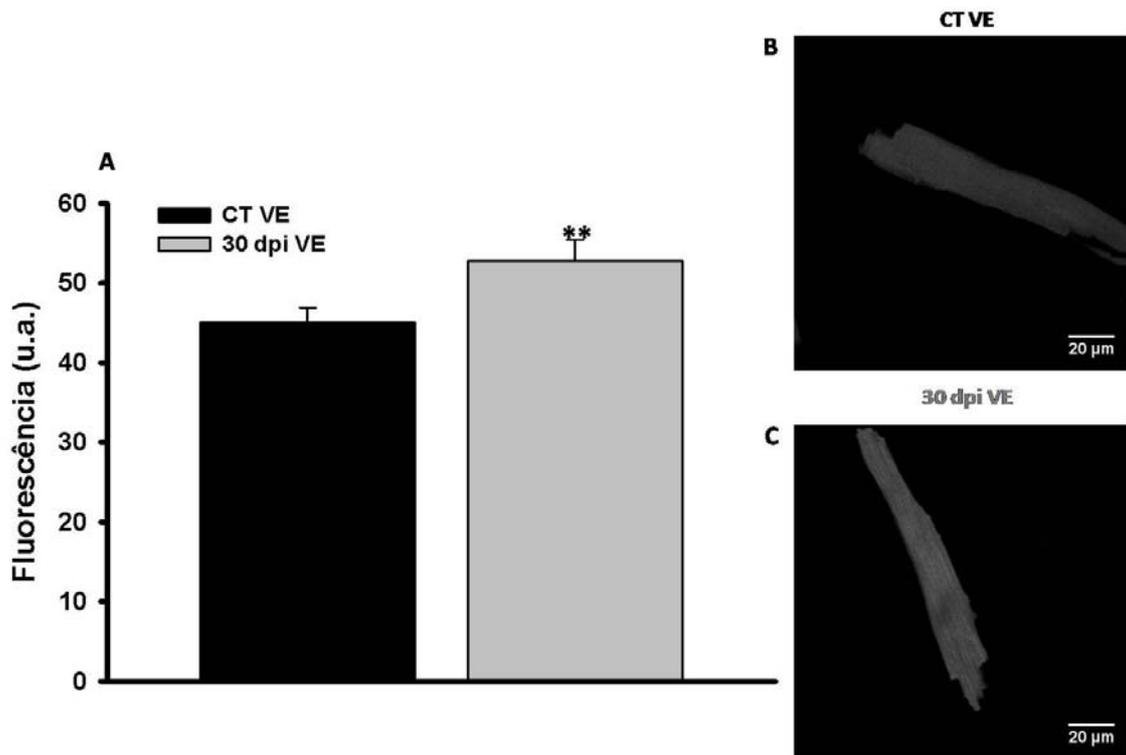


**Figura 35: Avaliação das sparks.** (A) e (B) Figuras representativas dos sparks avaliados pelo programa SparkMaster, sendo que os retângulos determinam os sparks detectados. (A) cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais controle (CT VE). (B) cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de animais infectados com *T. cruzi* após 30 dias de infecção (30 dpi VE). (C) Intensidade das sparks dada pela relação da intensidade de fluorescência máxima pela fluorescência basal. (D) Frequência de sparks (sparks/100 μm/segundo). Os dados são expressos como média ± EPM.

A intensidade das sparks, dada pela relação fluorescência máxima pela basal ( $F/F_0$ ) foi de  $3,1 \pm 0,4$  e  $3,2 \pm 0,6$  para as células controle e com 30 dpi, respectivamente. Já a frequência (em sparks/100 μm/segundo) foi de  $1,9 \pm 0,1$  e  $1,9 \pm 0,2$  para as células controle e com 30 dpi. Além disso, a constante de tempo para redução da intensidade de fluorescência (em ms) foi de  $36,9 \pm 1,7$  e  $42,9 \pm 2,5$  para as células controle e com 30 dpi, entretanto a diferença encontrada não foi significativa.

### *Produção de óxido nítrico em miócitos cardíacos infectados*

Adicionalmente aos experimentos de dinâmica intracelular de cálcio, também avaliamos a produção basal de óxido nítrico pelos cardiomiócitos infectados por *T. cruzi*. A figura 36 ilustra e sumariza esses achados. A figura 36A apresenta a média da intensidade de fluorescência para os grupos estudados, e as figuras 36B e C são imagens representativas de cardiomiócitos controle e infectado, respectivamente.

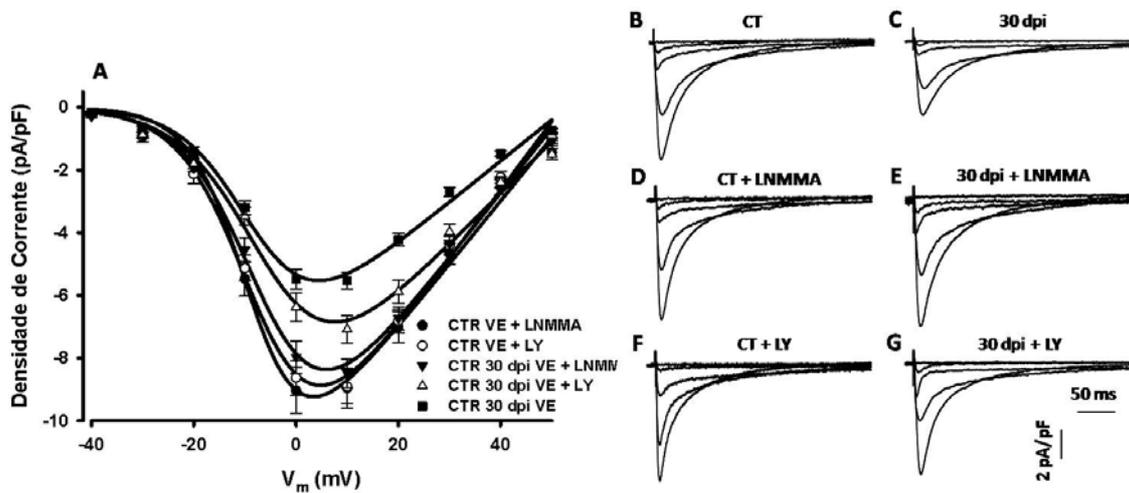


**Figura 36: Produção de óxido nítrico.** Figuras representativas de cardiomiócitos carregados com a sonda fluorescente DAF-2. (A) Figura representativa de um cardiomiócito isolado do ventrículo esquerdo do controle (CT VE n=73). (B) Figura representativa de um cardiomiócito isolado do ventrículo esquerdo do animal infectado com *T. cruzi* após 30 dias de infecção (30 dpi VE n=94). (C) Média da intensidade de fluorescência (unidade arbitrária). Os dados são expressos como média ± EPM, \*\* p<0,05, teste *t* de *student*.

Como podemos notar pela figura 36, a produção basal de óxido nítrico encontra-se aumentada nos cardiomiócitos de animais infectados com *T. cruzi*. A fluorescência basal (unidade arbitrária) foi de  $45,1 \pm$  e  $52,7 \pm 2,6$  para células controle e com 30 dpi.

### Participação da via NO/PI3Kinase na regulação da $I_{Ca,L}$

Conforme apresentado anteriormente, a  $I_{Ca,L}$  encontra-se atenuada na fase aguda de nosso modelo. Na tentativa de averiguar uma possível via associada à regulação da  $I_{Ca,L}$ , avaliamos a participação da via NO/PI3Kinase e sua habilidade em modular a  $I_{Ca,L}$  em cardiomiócitos infectados com *T. cruzi*. Esses achados são apresentados na figura 37. A figura 37A apresenta a relação da densidade de corrente por voltagem, e em B, C, D, E, F e G são apresentados os traçados para o controle, 30 dpi, controle + LNMMA, 30 dpi + LNMMA, controle + LY e 30 dpi + LY, respectivamente.



**Figura 37: Via óxido nítrico/PI3Kinase na modulação da corrente de cálcio ( $I_{Ca,L}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Colombiana.** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D, E, F, G) Traçados representativos para cardiomiócitos controle (CT); 30 dias pós-infecção (30 dpi) (n=14); CT + LNMMA (n=12); 30 dpi + LNMMA (n=14); CT + LY (n=10) e 30 dpi + LY (n=17). \* CT  $\neq$  30 dpi de -10 a 30 mV; \*\* CTR + LY  $\neq$  30 dpi + LY de -10 a 10 mV; \*\*\* 30 dpi + LY  $\neq$  30 dpi de 10 a 30 mV. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM, \*, \*\*, \*\*\*  $p < 0,05$ , *two-way anova*.

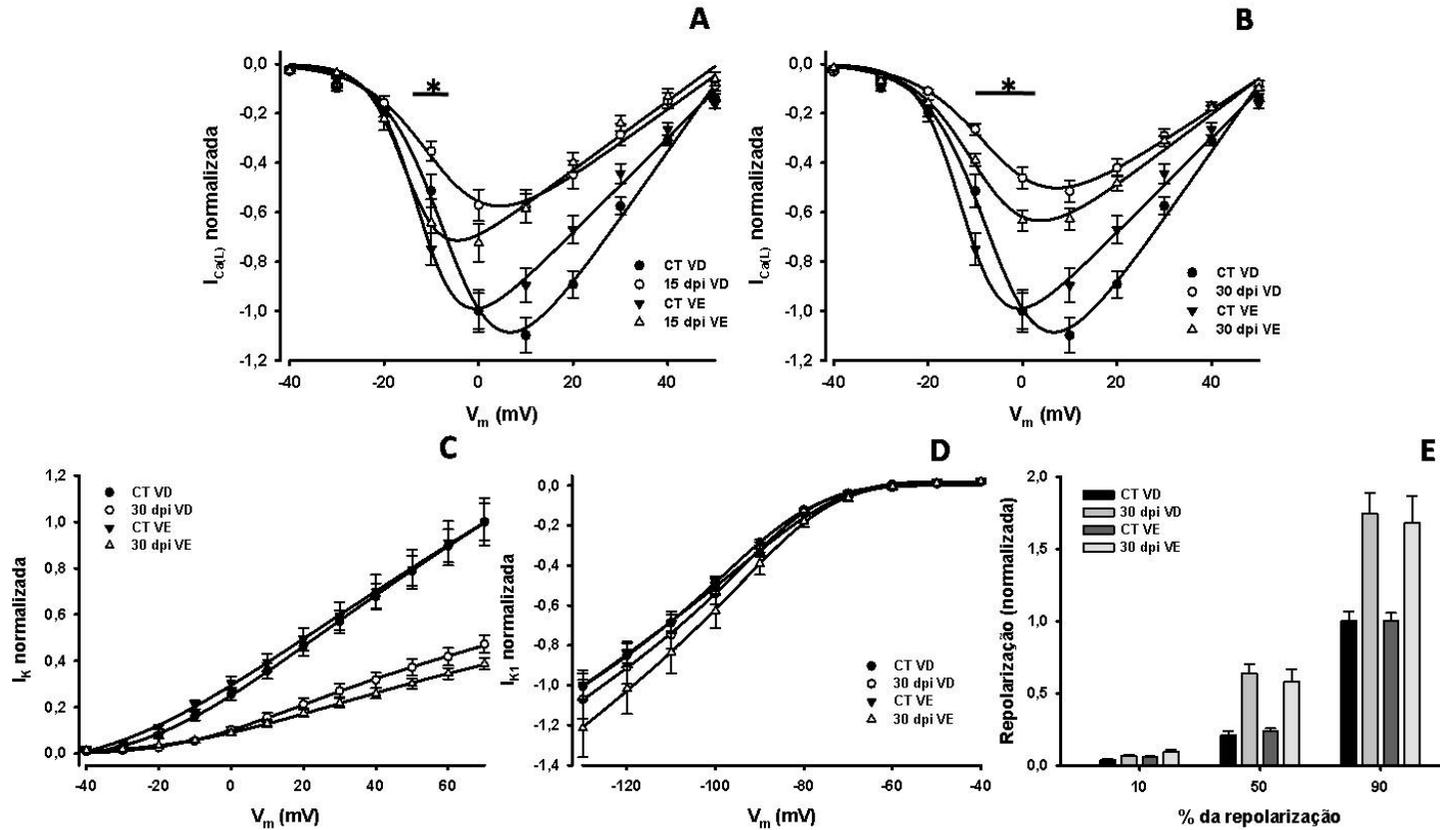
Como podemos observar na figura 37A, a incubação das células com inibidor não específico das diferentes isoformas de óxido nítrico sintase e pi3kinase, recuperou total ou parcialmente a densidade de corrente, quando comparado com as respectivas células controle. Por exemplo, a 10 mV, obtivemos valores de densidade de corrente

(pA/pF) de  $-8,9 \pm 0,6$ ,  $-8,9 \pm 0,5$ ,  $-8,5 \pm 0,5$ ,  $-7,1 \pm 0,5$  e  $-5,5 \pm 0,2$  para células controle + LNMMA, controle + LY, 30 dpi + LNMMA, 30 dpi + LY e 30 dpi controle do dia, respectivamente. Além disso, os parâmetros cinéticos associados à dependência de voltagem para ativação, tempo para o pico da corrente e constante de tempo para inativação foram praticamente normalizados, conforme apresentado na figura 6 (anexo 2) e tabela 9 (anexo 1).

### ***Comparação entre o ventrículo direito e o esquerdo – parâmetros eletrofisiológicos***

Como apresentado até o momento, de uma forma geral, a modulação do ventrículo direito e esquerdo apresenta diferenças ao longo da infecção por *T. cruzi*. Sendo assim, decidimos avaliar de forma comparativa as propriedades elétricas das células infectadas com *T. cruzi*, considerando o potencial de ação, a corrente de potássio retificadora de entrada, a corrente de potássio de saída e a corrente de cálcio. Essa comparação está apresentada na figura 38. Para essa comparação cada grupo experimental foi normalizado pelo seu respectivo controle. Na figura 38, em todos os painéis temos a comparação entre ventrículo direito e esquerdo, com 15 e/ou 30 dpi. Em A temos a comparação entre para  $I_{CaL}$  com 15 dpi, em B a comparação da  $I_{CaL}$  com 30 dpi, em C comparação da  $I_{to}$  para 30 dpi, em D da  $I_{K1}$  e em E os resultados para o PA com 30 dpi. Quando comparamos  $I_{Ca,L}$  com 15 dpi, é observada uma diferença na atenuação da corrente, quando comparando VE e VD. Por exemplo, a  $-10$  mV obtivemos valores de (corrente normalizada)  $-0,51 \pm 0,07$ ,  $-0,35 \pm 0,03$  e  $-0,75 \pm 0,06$ ,  $-0,64 \pm 0,09$ , para CT VD, 15 dpi VD, CT VE e 15 dpi VE respectivamente. Da mesma forma, com 30 dpi obtivemos resultados parecidos. Considerando  $0$  mV, obtivemos valores de (corrente normalizada)  $-1 \pm 0,08$ ,  $-0,46 \pm 0,04$  e  $-1 \pm 0,07$ ,  $-0,63 \pm 0,04$  para CT VD, 30 dpi VD, CT VE e 30 dpi VE respectivamente. Da mesma forma que para a  $I_{Ca,L}$ , obtivemos diferença entre  $I_{K1}$ , considerando VE e VD com 30 dpi. Por exemplo, considerando  $I_{K1}$  a  $-130$  mV os valores foram de (corrente normalizada)  $-1,01 \pm 0,06$ ,  $-1,07 \pm 0,09$  e  $-1,07 \pm 0,15$ , para CT VD, 30 dpi VD, CT VE e 30 dpi VE respectivamente. Contudo, quando comparamos as  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ , e PA, não obtivemos alteração considerando uma comparação entre VD e VE. Por exemplo, a redução da  $I_{to}$  foi similar considerando VE e VD. Para  $I_{to}$  obtivemos valores de (corrente normalizada) em  $70$  mV de  $1 \pm 0,8$ ,  $0,47 \pm 0,03$  e  $1 \pm 0,8$ ,  $0,39 \pm 0,02$ , para CT VD, 30

dpi VD, CT VE e 30 dpi VE respectivamente. Para o PA, a 90 % da repolarização, o aumento da duração do PA foi similar entre os grupos, sendo que obtivemos valores de  $1 \pm 0,06$ ,  $1,74 \pm 0,14$  e  $1 \pm 0,05 \pm 1,69 \pm 0,18$  para CT VD, 30 dpi VD, CT VE e 30 dpi.

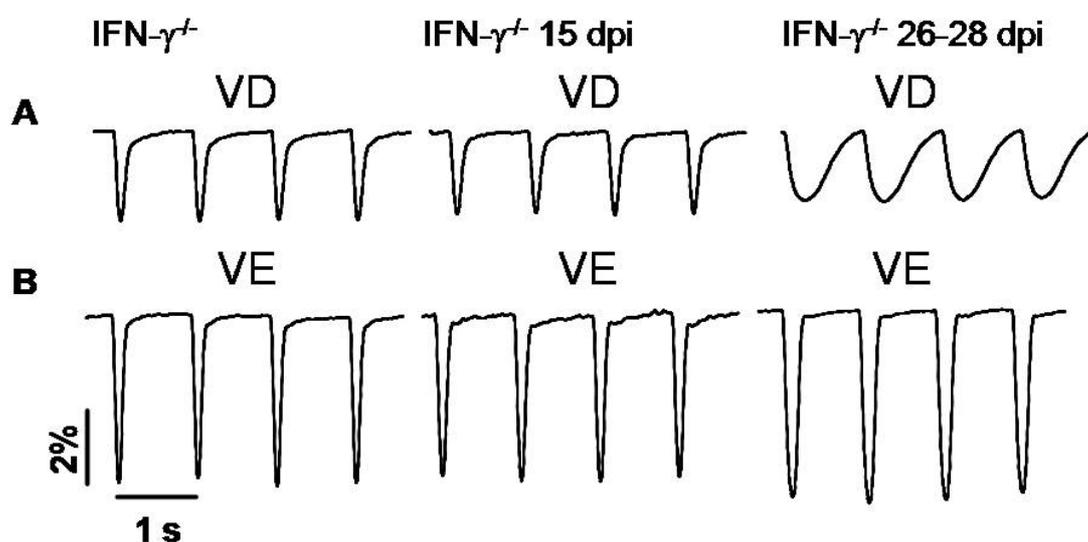


**Figura 38: Comparação da eletrofisiologia entre ventrículo esquerdo e direito - CEPA COLOMBIANA.** Dados normalizados das  $I_{Ca,L}$  (A e B),  $I_{t0}$  (C),  $I_{K1}$  (D) e Potencial de ação (E). Detalhes das figuras descritos nas demais legendas. \* comparação entre 15 dpi VE e 15 dpi VD ou 30 dpi VE e 30 dpi VD. As barras representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , *two-way anova*.

### **Resultados animal interferon- $\gamma^{-/-}$ (IFN- $\gamma^{-/-}$ ) - cepa colombiana**

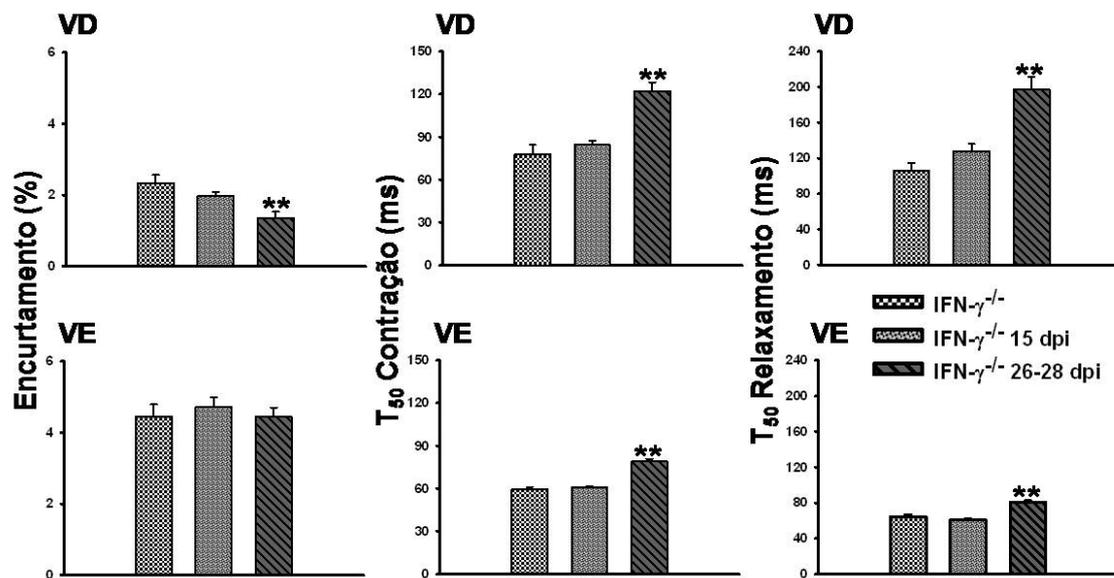
Quando avaliamos a contratilidade dos animais C57BL6 infectados, foi constatado uma correlação entre a produção inicial de IFN- $\gamma$  e a redução da capacidade contrátil do miócito cardíaco, tanto do VE como do VD. Por esse motivo, decidimos estudar a contratilidade celular do animal IFN- $\gamma^{-/-}$  para averiguar se, de fato, essa citocina participa na modulação da contração celular dos miócitos cardíacos.

A figura 39 representa traçados para as diferentes câmaras cardíacas estudadas, para o IFN- $\gamma^{-/-}$ , IFN- $\gamma^{-/-}$  15 dpi e IFN- $\gamma^{-/-}$  26-28 dpi. Como pode ser notado, a função contrátil do VE encontra-se preservada, em detrimento da funcionalidade contrátil do VD. A função contrátil foi mantida no VE, mesmo com alterações na cinética para o pico da contração, bem como para o relaxamento. Já para o VD, a redução na contratilidade foi acompanhada por uma piora, tanto na cinética de contração como relaxamento, sendo essa piora mais acentuada do que aquela observada para o VE. A 39 A representa os traçados para as células do ventrículo direito, e a figura 39B, os traçados para as células do ventrículo esquerdo. Os resultados ilustrados na figura 39 estão sumarizados na figura 40



**Figura 39: Traçados representativos da contratilidade celular para o animal IFN- $\gamma^{-/-}$ .** Da esquerda para a direita, traçados representativos das células controle, 15 e 30 (15 e 30dpi). (A) Traçados de células do ventrículo direito (VD). (B) Traçados de células do ventrículo esquerdo.

Como pode se notar na figura 40, diferentemente do animal C57Bl6 infectado o  $IFN-\gamma^{-/-}$  apresentou um comportamento distinto, entre o VE e VD. Por exemplo, o encurtamento celular (em %) foi de  $2,3 \pm 0,2$  e  $4,5 \pm 0,3$  para o  $IFN-\gamma^{-/-}$  não infectado, ventrículo direito e esquerdo, e de  $1,4 \pm 0,2$  e  $4,4 \pm 0,3$ , para células isoladas de animais  $IFN-\gamma^{-/-}$  com 26-28 dpi, no ventrículo direito e esquerdo respectivamente. Além disso, o tempo para 50% da contração (em MS) foi de  $77,8 \pm 6,6$  e  $59,3 \pm 1,8$  para o  $IFN-\gamma^{-/-}$  não infectado, ventrículo direito e esquerdo, e de  $121,9 \pm 6,3$  e  $78,9 \pm 1,87$ , para células isoladas de animais  $IFN-\gamma^{-/-}$  com 26-28 dpi, no ventrículo direito e esquerdo respectivamente. Já considerando o tempo para 50% do relaxamento, obtivemos valores (em ms) de  $106,1 \pm 8,9$  e  $64,5 \pm 2,1$  para o  $IFN-\gamma^{-/-}$  não infectado, ventrículo direito e esquerdo, e de  $197,6 \pm 1,4$  e  $80,2 \pm 2,1$  para células isoladas de animais  $IFN-\gamma^{-/-}$  com 26-28 dpi, no ventrículo direito e esquerdo respectivamente.



**Figura 40: Parâmetros da contratilidade celular do animal  $IFN-\gamma^{-/-}$ .** Da esquerda para a direita: Porcentagem de encurtamento da célula cardíaca; Tempo para 50% da contração (ms); Tempo para 50% do relaxamento (ms). (A) Resultados para o ventrículo direito (VD). (B) Resultados para o ventrículo esquerdo (VE).  $IFN-\gamma^{-/-}$  VE (n=49) controle ventrículo esquerdo;  $IFN-\gamma^{-/-}$  VD (n=39) controle ventrículo direito;  $IFN-\gamma^{-/-}$  15 (n=55) e 26-28 (n=45) dias pós-infecção (15 e 26-28 dpi) ventrículo esquerdo e  $IFN-\gamma^{-/-}$  15 (n=45) e 26-28 (n=37) dias pós-infecção ventrículo direito.

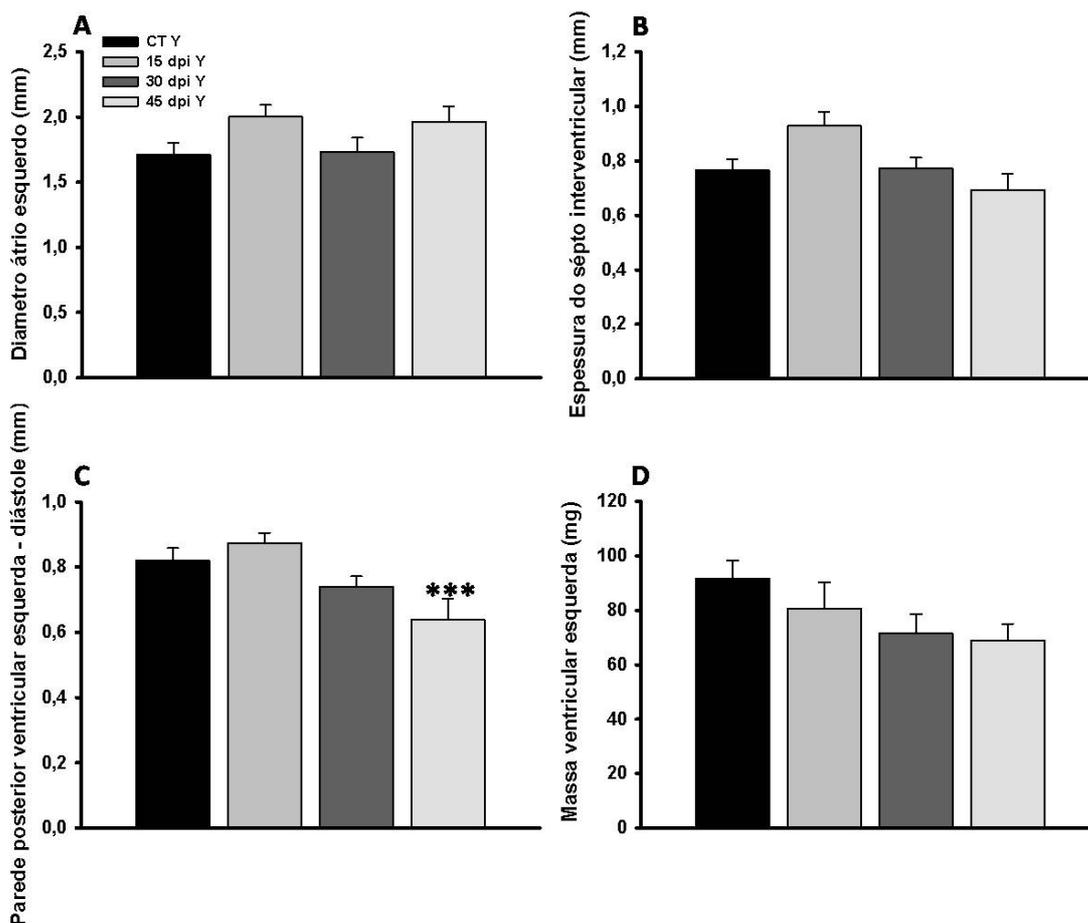
\*\*comparação entre IFN- $\gamma^{-/-}$  e IFN- $\gamma^{-/-}$  26-28 dpi. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM, \*, \*\*, \*\*\* p<0,05, *one-way anova*.

## **Resultados cepa Y**

### ***Ecocardiografia***

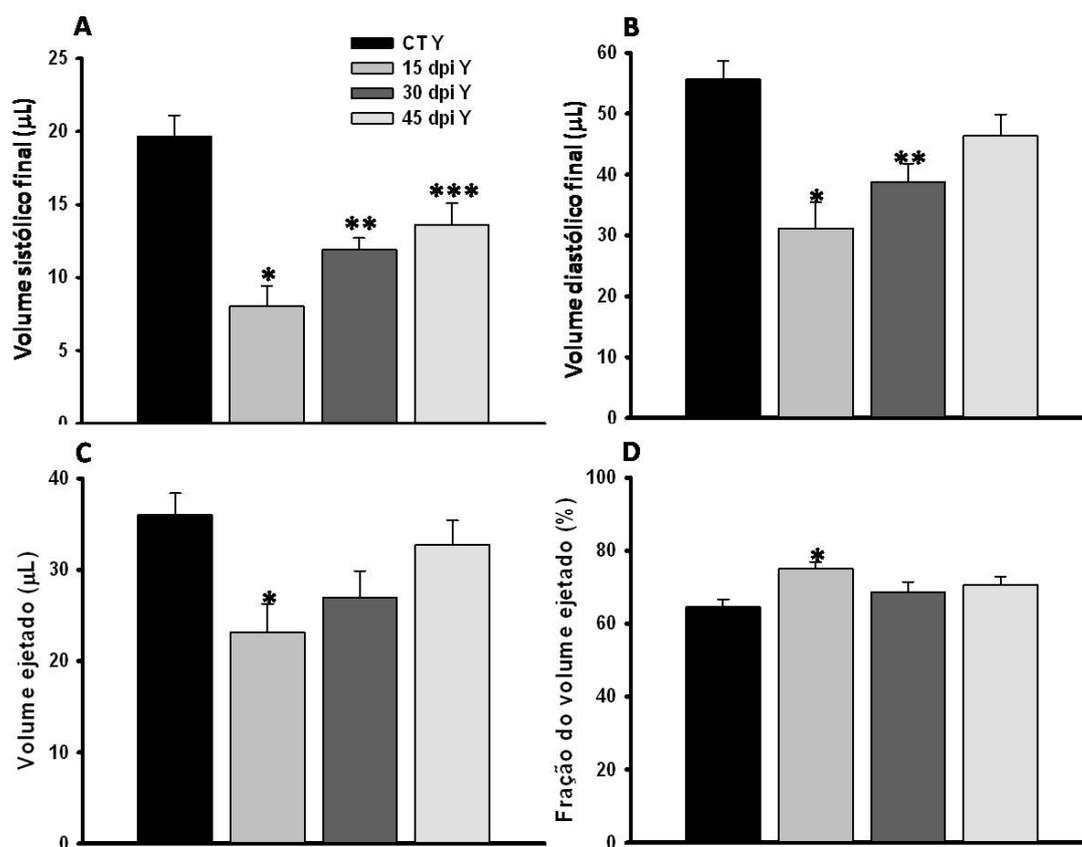
Como bem demonstrado pela literatura, existem diferentes cepas de *T. cruzi*, sendo que cada um dos grupos apresenta determinada virulência e patogenicidade. Por esse motivo, decidimos avaliar se os efeitos deletérios apresentados pela cepa colombiana seriam correspondentes à outra cepa de *T. cruzi*, com propriedades infecciosas distintas.

Primeiramente avaliamos as propriedades mecânicas de animais infectados com a cepa Y, com 15, 30 e 45 dias pós-infecção. Para tal objetivo utilizamos a técnica de ecocardiografia. Os parâmetros morfológicos são apresentados na figura 41.



**Figura 41: Parâmetros ecocardiográficos da cepa Y.** (A) Diâmetro do átrio esquerdo (mm). (B) Espessura do septo interventricular (mm). (C) Espessura da parede posterior ventricular esquerda (mm). (D) Massa ventricular esquerda (mg). CT Y: Controle dos experimentos com a cepa Y (n=8); 15 dpi: 15 dias pós-infecção (n=7); 30 dpi: 30 dias pós-infecção (n=6); 45 dpi: 45 dias pós-infecção (n=6). \*\*\* comparação entre CT e 45 dpi. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM, \*\*\*  $p < 0,05$ , *one-way anova*.

Conforme pode ser notado na figura 41, praticamente todos os parâmetros avaliados apresentam uma tendência a um aumento da massa cardíaca aos 15 dpi, com posterior tendência a uma redução da massa cardíaca aos 45 dpi, isso para todos os resultados apresentados, considerando diâmetro atrial (A), espessura do septo interventricular (B) e da parede posterior ventricular esquerda (C), bem como da massa ventricular esquerda (D). Por exemplo, a espessura do septo interventricular (em mm) foi de  $0,79 \pm 0,03$ ,  $0,93 \pm 0,05$ ,  $0,77 \pm 0,04$  e  $0,69 \pm 0,06$ , nos animais controle, 15, 30 e 45 dpi respectivamente. Adicionalmente, avaliamos a funcionalidade do coração. Esses dados são apresentados na figura 42.



**Figura 42: Parâmetros ecocardiográficos da cepa Y.** (A) Volume sistólico (µL). (B) Volume diastólico (µL). (C) Volume ejetado (µL). Fração do volume ejetado (%). CT Y: Controle dos experimentos com a cepa Y (n=8); 15 dpi: 15 dias pós-infecção (n=7); 30 dpi: 30 dias pós-infecção (n=6); 45 dpi: 45 dias pós-infecção (n=6). \* comparação entre CT e 15 dpi; \*\* comparação entre CT e 30 dpi; \*\*\* comparação entre CT e 45 dpi. Os dados são expressos como média ± EPM, \*, \*\*, \*\*\* p<0,05, *one-way anova*.

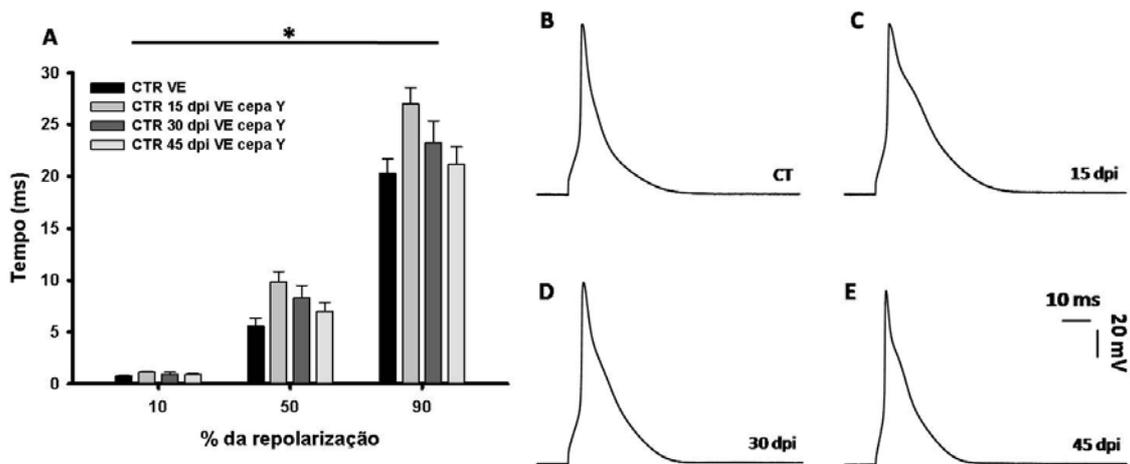
Na figura 42 podemos perceber que com 15 dpi existe uma redução no desempenho da função cardíaca, com recuperação da funcionalidade do coração com a evolução da infecção. Isso, considerando-se os parâmetros avaliados: o volume sistólico (A), diastólico (B), e ejetado (C), sendo que a fração de ejeção (D) apresentou ligeiro aumento com 15 dpi, com normalização de seus valores para níveis do controle com 30 dpi. Por exemplo, o volume ejetado foi de (em µL)  $35,9 \pm 2,4$ ,  $23,2 \pm 3,1$ ,  $26,9 \pm 2,9$  e  $32,7 \pm 2,6$ , para animais controle, 15, 30 e 45 dpi. Já para a fração de ejeção obtivemos valores de (%)  $64,5 \pm 2,2$ ,  $75,1 \pm 1,9$ ,  $68,6 \pm 2,8$  e  $70,7 \pm 2,2$  para animais controle, 15, 30 e 45 dpi.

### ***Propriedades elétricas dos cardiomiócitos - cepa Y***

Conforme observado nos dados morfológicos e funcionais dos corações infectados com a cepa Y, pode-se observar um diferente comportamento, quando se compara a cepa Y com a colombiana. Por esse motivo, decidimos avaliar as propriedades elétricas dos cardiomiócitos isolados dos animais infectados com a cepa Y. Para esse objetivo, estudamos apenas as células do ventrículo esquerdo.

#### ***Potencial de ação***

Inicialmente, avaliamos a morfologia do potencial de ação de cardiomiócitos isolados de animais infectados com a cepa Y. Avaliamos o PA em células controle com 15, 30 e 45 dpi. Como podemos perceber pela figura 43, os cardiomiócitos dos animais infectados por *T. cruzi*, cepa Y, apresentam um ligeiro prolongamento da repolarização do PA. Em A está representada a duração para diferentes porcentagens da repolarização do PA e em B, C, D e E são apresentados os traçados representativos para as células controle, 15, 30 e 45 dpi. Por exemplo, considerando 90% da repolarização, obtivemos valores (em ms) de  $20,3 \pm 1,4$ ,  $27,1 \pm 1,5$ ,  $23,3 \pm 2,1$  e  $21,2 \pm 1,7$ , para células controle, 15, 30 e 45 dpi. Além disso, o *overshoot* e a máxima taxa de despolarização não apresentaram alterações significativas, conforme demonstrado na tabela 10 (anexo 1).



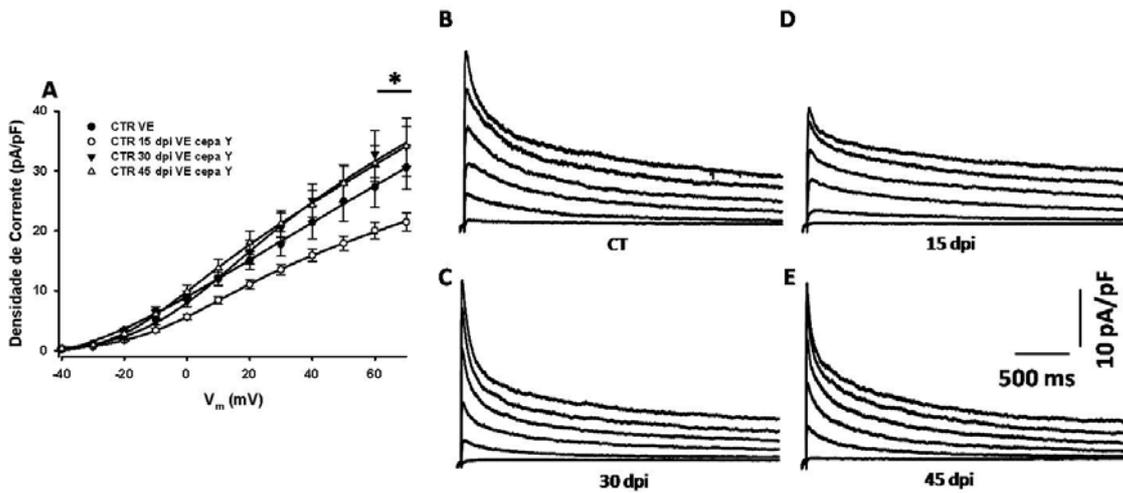
**Figura 43: Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - cepa Y.** (A) Tempo para repolarização do potencial de ação a 10, 50 e 90%. (B, C, D) Traçados representativos para cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR VE n=24), e para cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 (n=35), 30 (n=21) e 45 (n=27) dias pós-infecção (CTR 15, 30 e 45 dpi VE). As barras representam média  $\pm$  EPM. \* comparação entre CT e 15 dpi. \*  $p < 0,05$ , *one-way anova*.

#### *Corrente de potássio de saída*

Como está descrito na literatura, um dos principais componentes envolvidos na repolarização do PA em cardiomiócitos são as correntes de potássio de saída. Com esse objetivo, avaliamos tanto a corrente de potássio transitória rápida ( $I_{to}$ ) e a corrente de potássio retificadora retardada ( $I_K$ ).

Os resultados são apresentados na figura 44. Na figura 44A, é apresentada a relação da densidade de corrente em função da voltagem, e em B, C, D e E os traçados representativos para as células controle, 15, 30 e 45 dpi. Como se pode notar, ocorre uma ligeira atenuação dessa corrente com 15 dpi, com posterior recuperação para valores parecidos com os do controle. A  $I_{to}$ , o valor máximo de corrente no início do pulso, a 70 mV, por exemplo, apresentou valores de densidade de corrente (pA/pF) de  $30,6 \pm 3,7$ ,  $21,5 \pm 1,5$ ,  $34,1 \pm 4,8$  e  $34,1 \pm 3,3$ , para células controle, 15, 30 e 45 dpi, respectivamente. Considerando a dependência de voltagem para ativação, observamos que ocorre um deslocamento para a direita dessa curva com a progressão da infecção,

conforme ilustrado na figura 7 (anexo 2) e demonstrado na tabela 11 (anexo 1). Quando avaliamos a  $I_K$ , não encontramos diferença entre os grupos (dados não demonstrados).



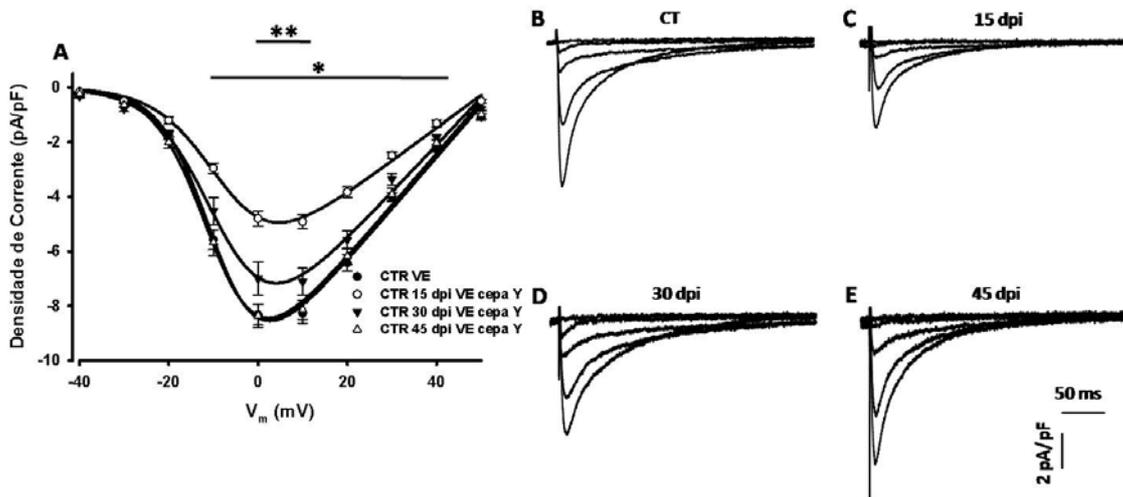
**Figura 44: Corrente transiente de saída de potássio ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - cepa Y.** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR VE n=18), e cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 (n=18), 30 (n=9) e 45 (n=13) dias pós-infecção (CTR 15, 30 e 45 dpi VE). \* comparação entre CT e 15 dpi. \*  $p < 0,05$  *two-way anova*.

Nesse estudo não avaliamos com o mesmo grau de detalhes a  $I_{K1}$ , porém com 15 dpi, não ocorreu nenhum tipo de alteração nessa família de correntes, conforme será apresentado na próxima sessão de resultados.

#### *Corrente de cálcio do tipo L*

Conforme observamos nos dados de ecocardiografia, notamos apenas uma atenuação da função cardíaca com 15 dpi, com posterior recuperação da funcionalidade do coração aos 30 e 45 dpi. Por esse motivo, decidimos avaliar a  $I_{Ca,L}$ , para verificarmos se essa recuperação poderia ser atribuída a uma recuperação dessa família de correntes. Os dados relativos a esses resultados são sumarizados na figura 45.

Os dados apresentados na figura 45 demonstram que com 15 dpi ocorre uma acentuada redução da  $I_{Ca,L}$ , com posterior recuperação dessa corrente à medida que evolui a infecção. Na figura 45A, está representada a relação da densidade de corrente em função da voltagem, e em B, C, D e E os traçados representativos para as células controle, 15, 30 e 45 dpi. Por exemplo, a 0 mV a densidade de corrente (pA/pF) foi de  $-8,3 \pm 0,4$ ,  $-4,8 \pm 0,2$ ,  $-6,9 \pm 0,6$ ,  $-8,3 \pm 0,4$ , para células controle, 15, 30 e 45 dpi, respectivamente. Além disso, a curva de condutância, o tempo para o pico da  $I_{Ca,L}$  e a constante de tempo para inativação apresentaram poucas alterações, indicando que as propriedades biofísicas do canal, de uma forma geral, não se modificaram. Esses resultados são ilustrados na figura 8 (anexo 2) e demonstrados na tabela 12 (anexo 1).



**Figura 45: Corrente de Cálcio ( $I_{Ca,L}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y.** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam a média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D, E) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR VE n=18), e para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 (n=22), 30 (n=12) e 45 (n=14) dias pós-infecção (CTR 15, 30 e 45 dpi VE). \* comparação entre CT e 15 dpi; \*\* comparação entre CT e 30 dpi. \*, \*\*  $p < 0,05$  two-way anova.

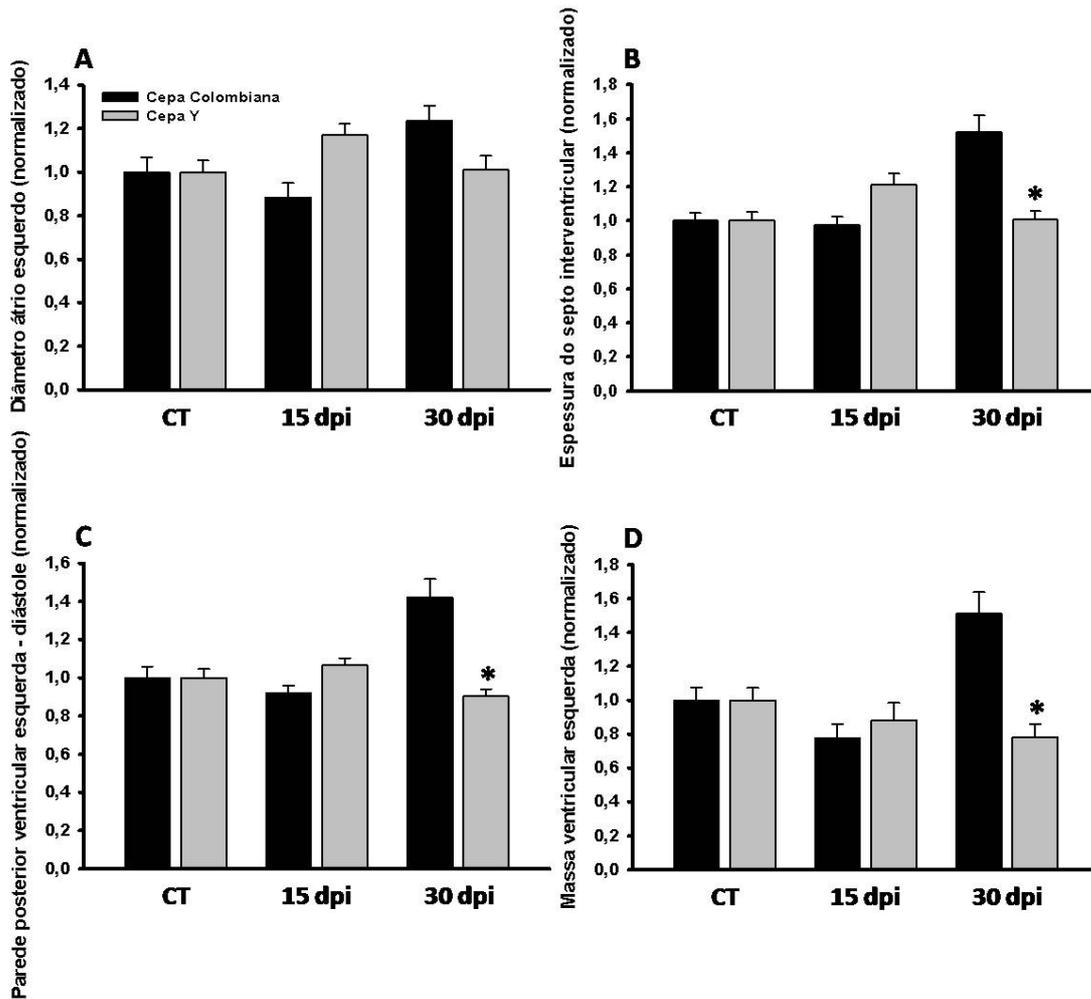
## **Resultados da comparação entre cepa Y e colombiana**

Para avaliarmos a diferente modulação entre as cepas de *T. cruzi* utilizadas em nosso estudo, realizamos uma comparação normalizada dos resultados obtidos para ambas as cepas. Cada uma das variáveis foi normalizada em função dos seus controles.

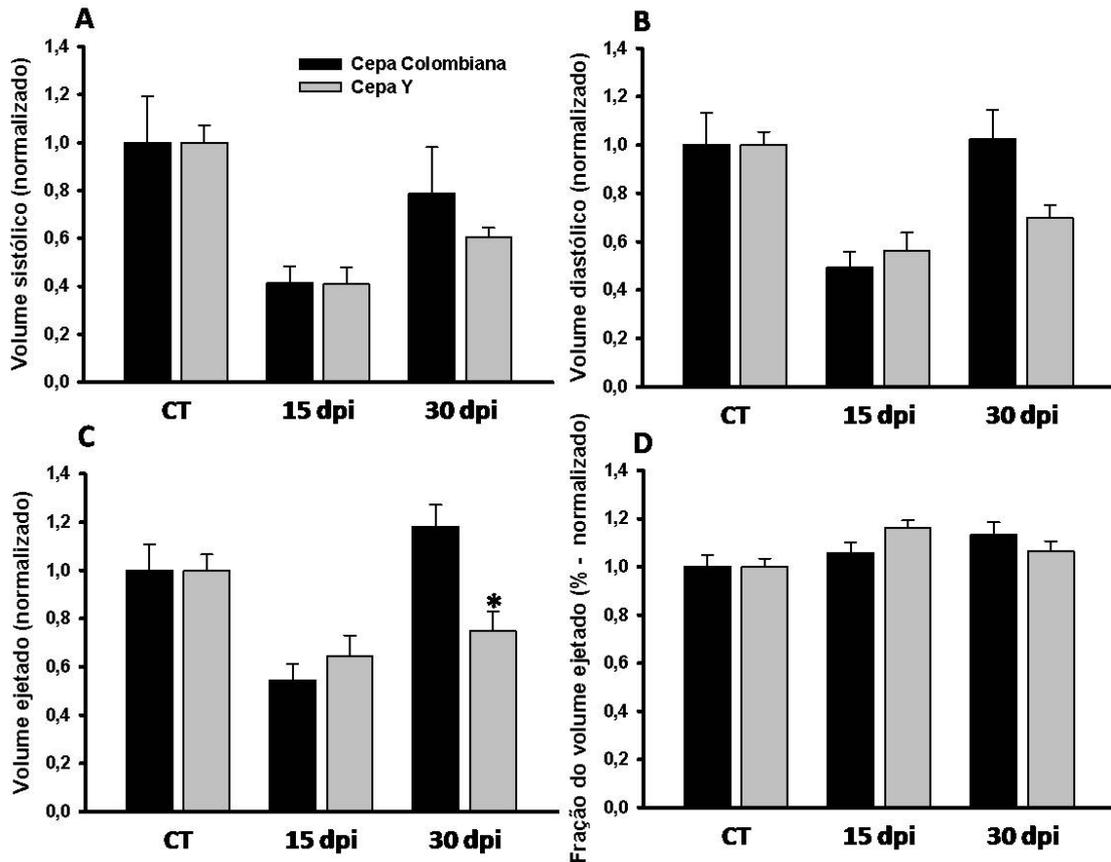
### ***Ecocardiografia***

Primeiramente, comparamos os dados de funcionalidade do coração entre as cepas. Como podemos perceber pela figura 46, a hipertrofia observada no coração dos animais infectados com a cepa colombiana não é observada nos animais infectados com a cepa Y, considerando o diâmetro do átrio esquerdo (A), espessura do septo ventricular (B) e da parede ventricular esquerda (C), bem como a massa ventricular esquerda. Por exemplo, para o septo ventricular, aos 30 dpi, obtivemos valores de  $1,00 \pm 0,05$ ,  $1,5 \pm 0,11$ ,  $1,00 \pm 0,05$  e  $1,01 \pm 0,05$  (dados normalizados) para células controle, 30 dpi (cepa colombiana) e controle 30 dpi (cepa Y).

Quando avaliamos os dados de funcionalidade cardíaca, conforme apresentado na figura 47, obtivemos um perfil diferente entre as cepas. Para a cepa colombiana, existe uma completa recuperação da funcionalidade, porém a cepa Y ainda encontra-se em processo de recuperação, já que com 45 dpi ela também se encontra totalmente recuperada, como apresentado anteriormente. As diferenças não foram encontradas em todos os parâmetros avaliados, que foram volume sistólico (A), diastólico (B), e ejetado (C), e a fração de ejeção (D). Considerando o volume ejetado, obtivemos valores de  $1,00 \pm 0,11$ ,  $0,54 \pm 0,07$ ,  $1,18 \pm 0,09$ ,  $1,00 \pm 0,07$ ,  $0,64 \pm 0,09$ ,  $0,75 \pm 0,08$  (dados normalizados) para animais controle, 15 e 30 dpi infectados com cepa colombiana e controle, 15 e 30 dpi infectados com a cepa Y, respectivamente.



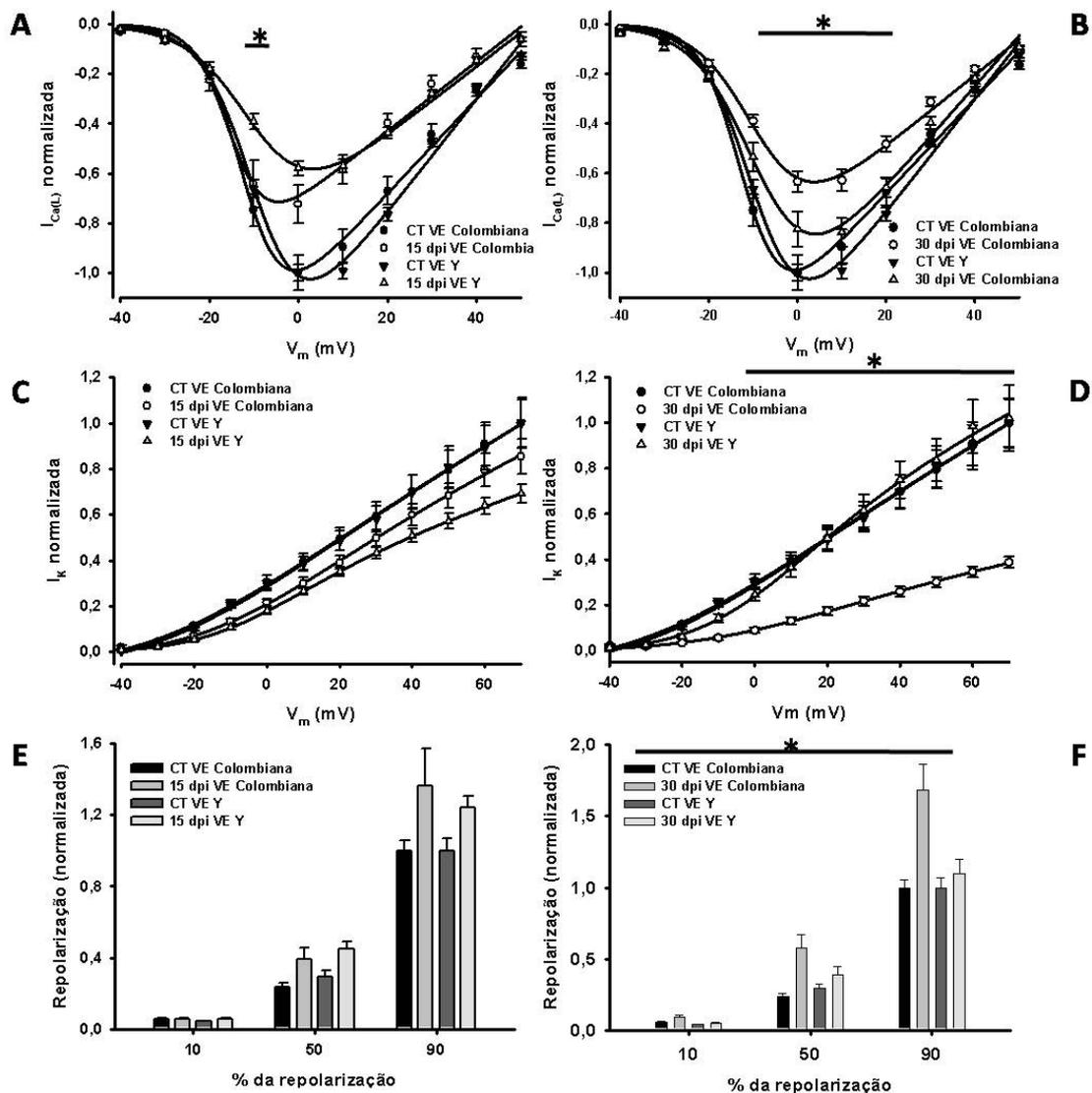
**Figura 46: Parâmetros ecocardiográficos da comparação entre cepa colombiana e Y.** Dados normalizados. (A) Diâmetro do átrio esquerdo. (B) Espessura do septo interventricular. (C) Espessura da parede posterior ventricular esquerda. (D) Massa ventricular esquerda. As barras pretas referem-se à cepa colombiana, e as cinzas, à cepa Y. \* comparação entre 30 dpi colombiana e 30 dpi Y. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM, \*  $p < 0,05$  *one-way anova*.



**Figura 47: Parâmetros ecocardiográficos comparação entre cepa colombiana e Y.** Dados normalizados. (A) Volume sistólico. (B) Volume diastólico. (C) Volume ejetado. Fração do volume ejetado. As barras pretas referem-se à cepa colombiana, e as cinzas, à cepa Y. \* comparação entre 30 dpi colombiana e 30 dpi Y. Os dados são expressos como média ± EPM, \*  $p < 0,05$  para *one-way anova*.

## ***Eletrofisiologia***

Da mesma forma que realizamos uma comparação normalizada para os dados de ecocardiografia entre as cepas, também avaliamos as propriedades das células musculares cardíacas. Esses resultados estão representados na figura 48. A parte esquerda da figura representa os dados relativos a 15 dpi e a parte a direita representa os dados relativos a 30 dpi. Em A e B são apresentados os dados para a  $I_{Ca,L}$ , em C e D são apresentados os resultados para a  $I_{to}$  e em E e F são apresentados os resultados para o potencial de ação. Tanto em 15 como 30 dpi, podemos observar que ocorre diferença na modulação dos sistemas estudados.



**Figura 48: Comparação da eletrofisiologia entre ventrículo esquerdo das cepas colombiana e Y. Dados normalizados das  $I_{Ca,L}$  (A e B),  $I_{to}$  (C e D) e potencial de ação para 15 e 30 dias pós infecção.. \* comparação entre 15 dpi VE colombiana e 15 dpi VE Y ou 30 dpi VE colombiana e 30 dpi VE colombiana. As barras representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$ , *two-way anova*.**

Considerando a  $I_{Ca,L}$  em -10 mV, obtivemos valores de  $-0,75 \pm 0,06$ ,  $-0,64 \pm 0,10$ ,  $-0,39 \pm 0,03$  e  $0,66 \pm 0,04$ ,  $-0,39 \pm 0,03$ ,  $-0,54 \pm 0,06$  para controle, 15 e 30 dpi com a cepa colombiana e controle, 15 e 30 dpi com a cepa Y. Já para a  $I_{to}$  em 70 mV, obtivemos valores de  $1,00 \pm 0,1$ ,  $0,85 \pm 0,08$ ,  $0,39 \pm 0,02$  e  $1,00 \pm 0,1$ ,  $0,69 \pm 0,04$ ,  $1,1 \pm 0,1$  para controle, 15 e 30 dpi com a cepa colombiana e controle, 15 e 30 dpi com a

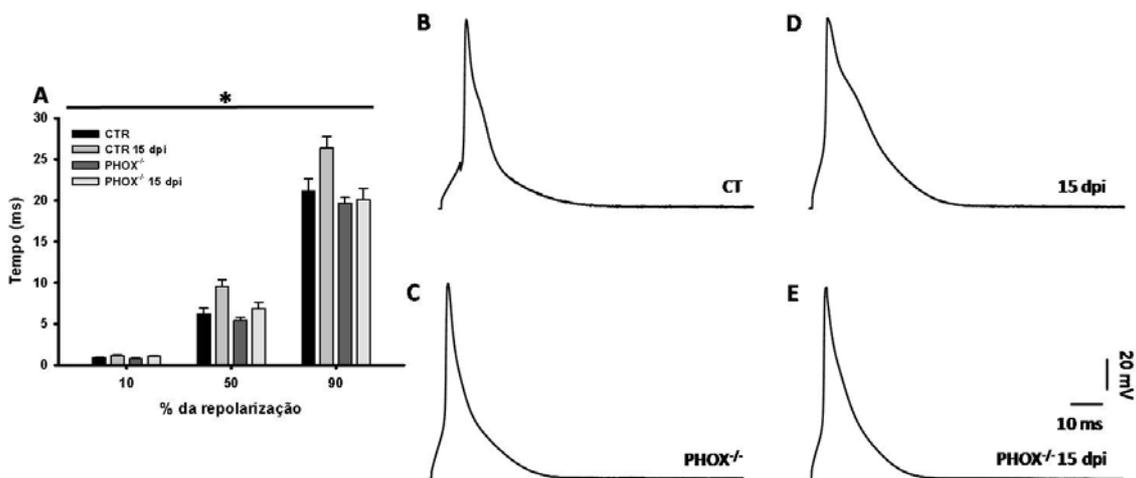
cepa Y. Além disso, o PA apresentou valores de  $1,00 \pm 0,06$ ,  $1,37 \pm 0,21$ ,  $1,68 \pm 0,18$  e  $1,00 \pm 0,07$ ,  $1,24 \pm 0,06$ ,  $1,01 \pm 0,09$  para controle, 15 e 30 dpi com a cepa colombiana e controle, 15 e 30 dpi com a cepa Y.

### **Resultados cepa Y - NOX2<sup>-/-</sup>**

Dados da literatura indicam que durante a infecção por *T. cruzi*, ocorre uma profunda alteração nos sistemas anti-oxidantes da célula cardíaca, bem como um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, diversos grupos tem demonstrado a habilidade de derivados de superóxido em modular a funcionalidade e expressão de diferentes famílias de canais para íons. Por esse motivo, decidimos avaliar se a NOX2 estaria envolvida no remodelamento elétrico observado com 15 dpi, da cepa Y.

### **Potencial de ação**

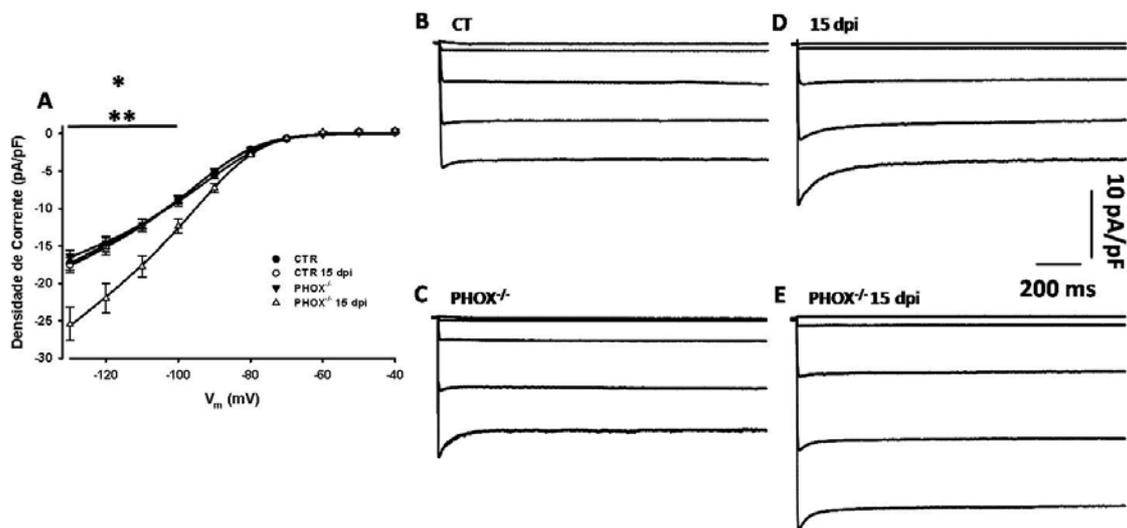
Inicialmente avaliamos a forma do potencial de ação de cardiomiócitos isolados de animais infectados com a cepa Y. Avaliamos o PA em células controle, 15 dpi, NOX2<sup>-/-</sup> e NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi. Como podemos perceber pela figura 49, os cardiomiócitos NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi não apresentaram prolongamento do PA. Em A está representada a duração para diferentes porcentagens da repolarização do PA e em B, C, D e E são apresentados os traçados representativos para células controle, 15 dpi, NOX2<sup>-/-</sup> e NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi. Por exemplo, considerando 90% da repolarização, obtivemos valores (em ms) de  $21,2 \pm 1,4$ ,  $26,3 \pm 1,4$ ,  $19,7 \pm 0,7$  e  $20,1 \pm 1,3$ , para células controle, 15 dpi, NOX2<sup>-/-</sup> e NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi. Além disso, o *overshoot* não apresentou alteração, ao contrario da máxima taxa de despolarização que aumentou nos NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi, conforme demonstrado na tabela 13 (anexo 1).



**Figura 49: Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y NOX2<sup>-/-</sup>.** (A) Tempo para repolarização do potencial de ação a 10, 50 e 90%. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR n=34), para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 dias pós-infecção (CTR 15 dpi n=42), para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo do animal *knockout* para NOX2<sup>-/-</sup> (NOX<sup>-/-</sup> n=51), e para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para NOX2<sup>-/-</sup> infectado a 15 dpi (NOX<sup>-/-</sup> 15 dpi n=36). As barras representam média ± EPM. \* comparação entre CT e 15 dpi. \* p<0,05, *two-way anova*.

### **Correntes de potássio**

Primeiramente avaliamos a I<sub>K1</sub>, para auxiliar na explicação dos resultados obtidos na figura 50. Como pode ser visualizado na figura 50, ocorre robusto aumento na densidade de corrente nos animais NOX2<sup>-/-</sup> infectados. Na figura 50A é apresentada a relação da densidade de corrente por voltagem, e em B, C D e E os traçados representativos para as células controle, NOX2<sup>-/-</sup>, 15 dpi e NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi. Por exemplo, em -130 mV obtivemos valores de densidade de corrente (pA/pF) de - 17,2 ± 1,1, -17,5 ± 1,1, -16,4 ± 0,9 e -25,4 ± 2,2, para células controle, 15 dpi, NOX2<sup>-/-</sup> e NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi. Adicionalmente, quando avaliamos a condutância para I<sub>K1</sub>, observamos um aumento significativo da condutância para I<sub>K1</sub> nas células de NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi quando comparada com todos os demais grupos (figura 9, anexo 2).

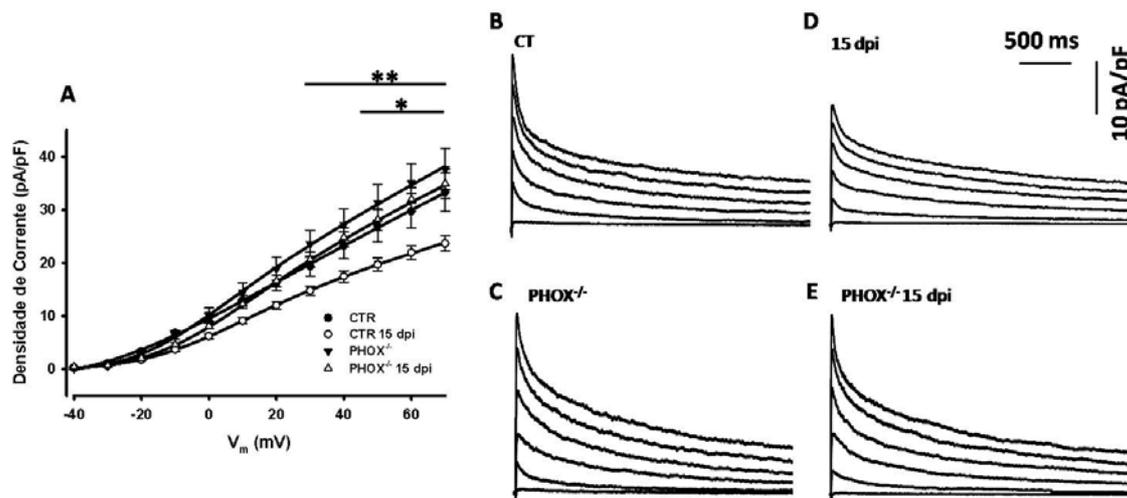


**Figura 50: Corrente de Potássio Retificadora de Entrada ( $I_{K1}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y  $NOX2^{-/-}$ .** (A) Relação da corrente sustentada, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos e as barras representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR n=18), para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo a 15 dias pós-infecção (CTR 15 dpi n=18), para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para  $NOX2^{-/-}$  ( $NOX^{-/-}$  n=20), e para cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para  $NOX2^{-/-}$  infectado a 15 dpi ( $NOX^{-/-}$  15 dpi n=16). \* comparação entre CTR 15 dpi e  $NOX$  15 dpi, \*\* comparação entre  $NOX^{-/-}$  e  $NOX^{-/-}$  15 dpi. \*\*  $p < 0,05$ , *two-way anova*.

Como já mencionado anteriormente, a corrente de potássio de saída, com seus diferentes componentes, é descrita como um dos principais mecanismos associado à repolarização do PA em cardiomiócitos. Com base nesses dados prévios, avaliamos tanto a corrente de potássio transitória rápida ( $I_{to}$ ) quanto a corrente de potássio retificadora retardada ( $I_K$ ).

Os resultados são apresentados na figura 51. Na figura 51A é apresentada a relação da densidade de corrente por voltagem, e em B, C, D e E os traçados representativos para as células controle, 15 dpi,  $NOX2^{-/-}$  e  $NOX2^{-/-}$  15 dpi. Como pode ser notado, com 15 dpi ocorre uma atenuação da  $I_{to}$ , sendo que essa redução é prevenida

nos animais  $NOX2^{-/-}$  infectados. A  $I_{to}$ , valor máximo de corrente do início do pulso, por exemplo, a 70 mV exibiu valores de densidade de corrente (pA/pF) de  $33,4 \pm 3,6$ ,  $23,7 \pm 1,5$ ,  $37,7 \pm 3,8$  e  $34,9 \pm 2,7$  para células controle, 15 dpi,  $NOX2^{-/-}$  e  $NOX2^{-/-}$  15 dpi. Considerando a dependência de voltagem para ativação, observamos que nos animais  $NOX2^{-/-}$  15 dpi não ocorre prevenção do deslocamento para a direita da curva, conforme ilustrado na figura 10 (anexo 2) e demonstrado na tabela 14 (anexo 1). Da mesma forma que para os demais experimentos, avaliamos a  $I_K$ , sendo que não encontramos diferença entre os grupos (dados não demonstrados).

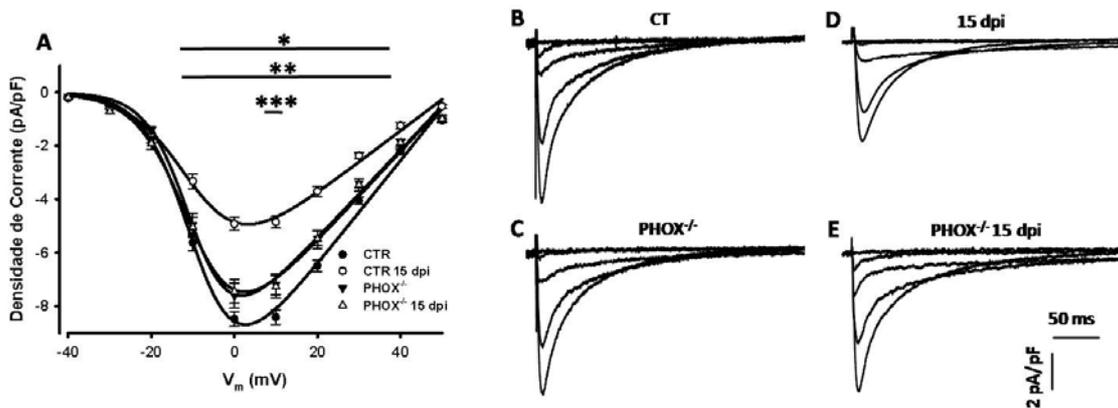


**Figura 51: Corrente transiente rápida saída de potássio ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y  $NOX2^{-/-}$ .** (A) Relação da corrente de pico normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR n=23), para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo a 15 dias pós-infecção (CTR 15 dpi n=23), para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para  $NOX2^{-/-}$  ( $NOX^{-/-}$  n=14), e para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para  $NOX2^{-/-}$  infectados a 15 dpi ( $NOX^{-/-}$  15 dpi n=16). \* comparação entre CTR e CTR 15 dpi; \*\* comparação entre CTR 15 dpi com  $NOX^{-/-}$  15 dpi.

## Corrente de cálcio do tipo L

Apesar de não terem sido realizados experimentos funcionais com o coração de animais NOX2<sup>-/-</sup>, para avaliarmos se essa via está envolvida no remodelamento mecânico observado com 15 dpi na cepa Y, decidimos estudar a I<sub>Ca,L</sub> já que correlações com a funcionalidade cardíaca podem ser obtidas com o estudo dessa família de corrente. Os dados relativos a esses resultados são sumarizados na figura 52.

Os dados apresentados na figura 52 demonstram que os animais NOX2<sup>-/-</sup> apresentam uma ligeira atenuação da I<sub>Ca,L</sub>. Além disso, outro importante achado nesse grupo de experimentos é que os animais NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi não apresentam nenhuma atenuação da I<sub>Ca,L</sub>. Na figura 52A é apresentada a relação da densidade de corrente por voltagem, e em B, C, D e E os traçados representativos para as células controle, 15 dpi, NOX2<sup>-/-</sup> e NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi. Por exemplo, a 10 mV a densidade de corrente (pA/pF) foi de  $-8,4 \pm 0,3$ ,  $-4,9 \pm 0,2$ ,  $-7,1 \pm 0,4$  e  $-7,3 \pm 0,4$ , para células controle, 15 dpi, NOX2<sup>-/-</sup> e NOX2<sup>-/-</sup> 15 dpi. Além disso, a curva de condutância não apresentou alteração, já o tempo para o pico da corrente e as constantes de tempo para inativação apresentaram alterações pontuais. Esses resultados são ilustrados na figura 11 (anexo 2) e demonstrados na tabela 15 (anexo 1).



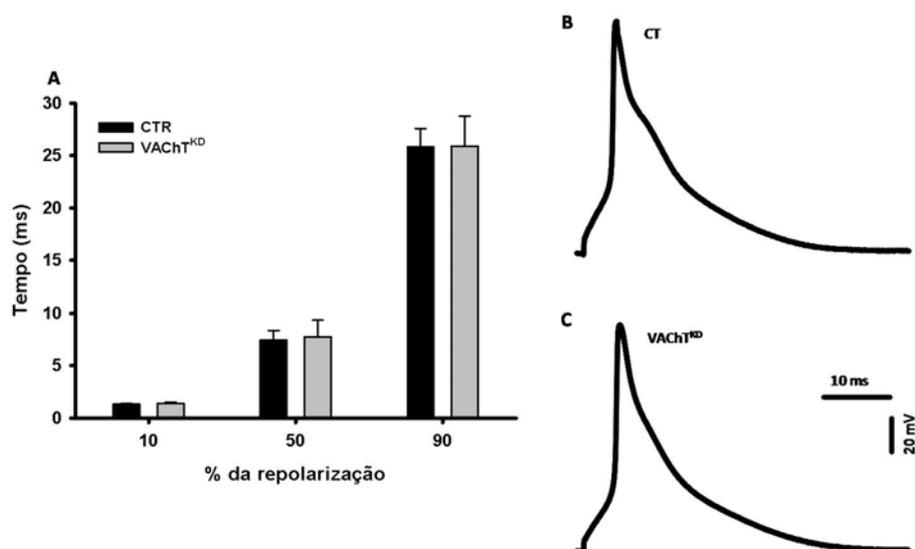
**Figura 52: Corrente de Cálcio (I<sub>Ca,L</sub>) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y NOX2<sup>-/-</sup>.** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D, E) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR n=25), para os cardiomiócitos infectados do ventrículo esquerdo aos 15 dias pós-infecção (CTR

15 dpi n=25 ), para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para NOX2<sup>-/-</sup> (NOX<sup>-/-</sup> (n=26)), e para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para NOX2<sup>-/-</sup> infectado a 15 dias (NOX<sup>-/-</sup> 15 dpi (n=19)). \* comparação entre CT e 15 dpi; \*\* comparação entre CTR 15dpi e NOX<sup>-/-</sup> 15 dpi; \*\*\*, comparando CT com NOX<sup>-/-</sup>. \*, \*\*, \*\*\* p<0,05, *two-way anova*.

### **Resultados do animal *knockdown* para o transportador de acetilcolina (VACHT<sup>KD</sup>)**

Como última abordagem experimental em nosso trabalho, decidimos avaliar uma possível associação entre disfunção elétrica e redução na atividade colinérgica do coração, já que resultados prévios da literatura indicam que ocorre uma acentuada redução da inervação do coração na fase aguda da doença de Chagas. Com esse, objetivo, utilizamos o animal *knockdown* para o transportador vesicular de acetilcolina. Nesse estudo avaliamos apenas a atividade elétrica das células musculares ventriculares isoladas.

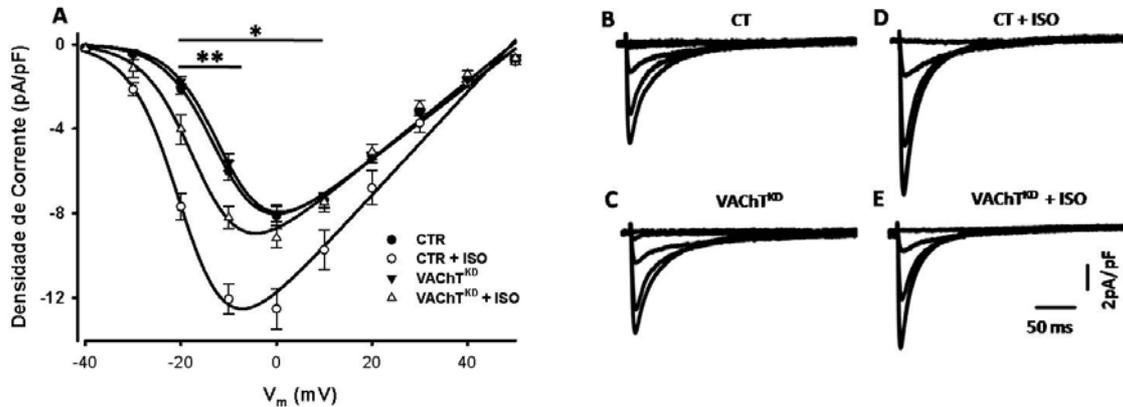
Primeiramente avaliamos o potencial de ação dos cardiomiócitos e, conforme demonstrado na figura 53, os animais VACHT<sup>KD</sup> não apresentam alteração na forma do PA. Em A é apresentada a média para o tempo de repolarização em diferentes porcentagens, e, em B e C, os traçados representativos para células controle e VACHT<sup>KD</sup>. Por exemplo, a 90% de repolarização, obtivemos valores (em ms) de 25,8 ± 1,7 e 25,9 ± 2,8, acompanhado de uma ligeira atenuação da máxima taxa de despolarização e do *overshoot* - tabela 16 (anexo 1).



**Figura 53: Potencial de ação (PA) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em VAcHT<sup>KD</sup>.** (A) Tempo para repolarização do potencial de ação a 10, 50 e 90%. (B e C) Traçados representativos para os cardiomiócitos controles do ventrículo esquerdo (CTR) (n=15), e para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo do animal *knockdown* para o transportador de acetilcolina (VAcHT<sup>KD</sup>) (n=15). As barras representam média ± EPM.

A falta de alteração na forma do PA indica que em condições basais as correntes iônicas dos animais VAcHT<sup>KD</sup> encontram-se similares à dos animais controle. Portanto, não avaliamos as correntes de potássio. Contudo, decidimos avaliar a resposta da  $I_{Ca,L}$  ao isoproterenol para averiguarmos se uma disfunção colinérgica é seguida de uma disfunção beta-adrenérgica. Os resultados apresentados na figura 54 mostram que os animais VAcHT<sup>KD</sup> apresentam uma  $I_{Ca,L}$  igual à dos animais controle, entretanto a resposta ao isoproterenol encontra-se atenuada nos VAcHT<sup>KD</sup>. Na figura 54A, estão representados os resultados para a densidade de corrente em função da voltagem (pA/pF), e nas figuras 54B, D e C, E são apresentadas as figuras representativas para os grupos controle, controle + 100 nM de isoproterenol, VAcHT<sup>KD</sup>, e VAcHT<sup>KD</sup> + 100 nM de isoproterenol. Por exemplo, a -10 mV obtivemos valores de densidade de corrente (em pA/pF) de  $-5,9 \pm 0,5$ ,  $-12,5 \pm 0,7$ ,  $-5,6 \pm 0,4$  e  $-8,2 \pm 0,5$ , para células controle, controle + ISO, VAcHT<sup>KD</sup>, e VAcHT<sup>KD</sup> + ISO, respectivamente. Além disso, os animais VAcHT<sup>KD</sup> apresentaram uma atenuação no deslocamento da curva de

condutância sob o efeito do ISO, bem como da aceleração da inativação, conforme demonstrado na figura 12 (anexo 2) e tabela 17 (anexo 1).



**Figura 54: Corrente de Cálcio ( $I_{Ca,L}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em animais  $VACHT^{KD}$ .** (A) Relação da corrente de pico, normalizada pela capacitância celular, em função da voltagem. Os círculos representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 3. (B, C, D, E) Traçados representativos para os cardiomiócitos controle do ventrículo esquerdo (CTR, n=14), para os cardiomiócitos do ventrículo esquerdo do animal *knockdown* para o transportador de acetilcolina ( $VACHT^{KD}$ , n=20), CTR + Isoproterenol (ISO, n=9) e  $VACHT^{KD}$  + ISO (n=14). \* comparação entre CTR e CTR + ISO; e entre CTR + ISO e  $VACHT^{KD}$  + ISO, \*\* comparação entre  $VACHT^{KD}$  e  $VACHT^{KD}$  + ISO, \*, \*\*  $p < 0,05$ , *two-way anova*.

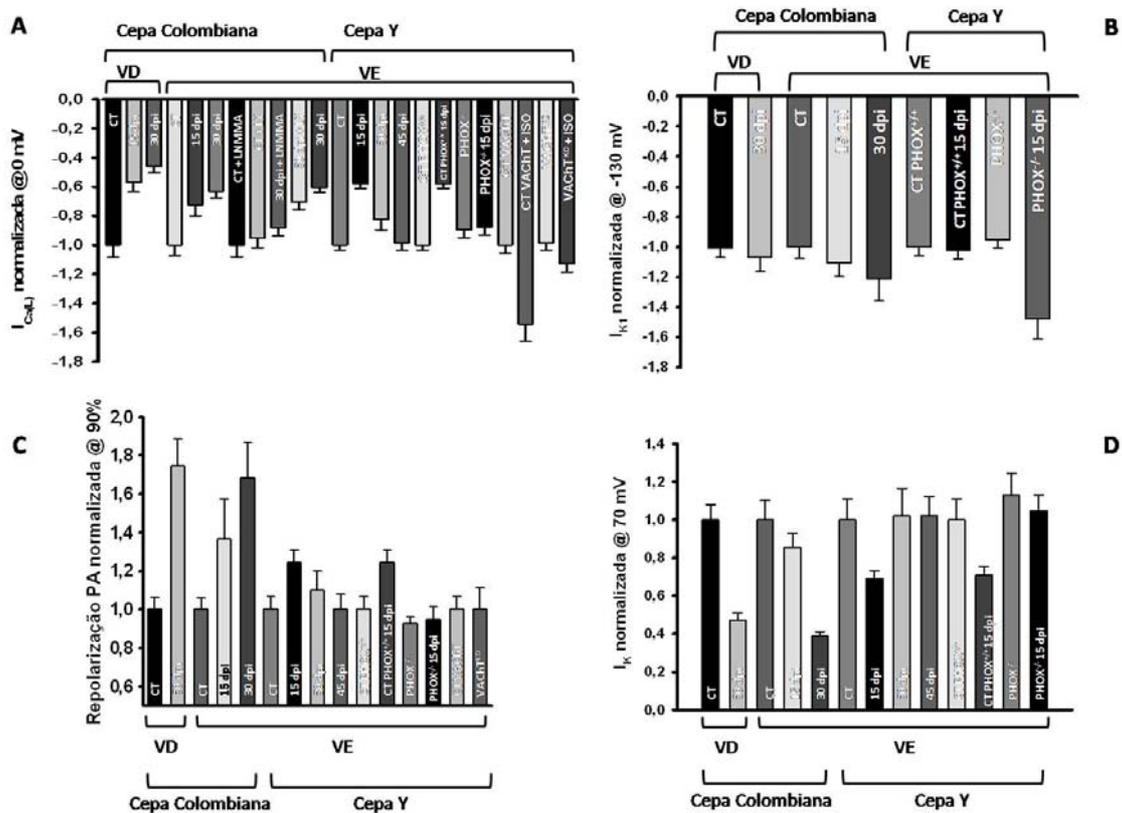
### Comparação geral dos resultados de eletrofisiologia

Em nosso estudo avaliamos inúmeros parâmetros eletrofisiológicos, em diferentes condições experimentais. Na figura 55 é apresentada uma visão geral dos resultados, sendo cada um dos grupos normalizado pelo seu respectivo controle.

Como podemos perceber nos experimentos com a  $I_{Ca,L}$ , (Figura 55A) os resultados mais marcantes demonstram a redução diferencial da  $I_{Ca,L}$ , entre o VD e VE, infectados com a cepa colombiana. Além disso é possível perceber o recobro total da  $I_{Ca,L}$ , no animal infectado com a cepa Y. Por último, a diferença de resposta ao isoproterenol em relação ao animal controle e ao  $VACHT^{KD}$ .

Considerando a  $I_{K1}$ , (Figura 55B) o resultado mais marcante é o grande aumento da densidade de corrente no animal VACHT<sup>KD</sup> infectado.

Quando avaliamos o potencial de ação (Figura 55C) observamos nitidamente que o aumento do tempo para repolarização é bem maior no animal infectado com a cepa colombiana, do que aquele infectado com a cepa Y. Importante também, que ocorre o recobro completo do potencial de ação com a cepa Y com 45 dpi. Para a  $I_{to}$  (Figura 55D) observamos, um padrão similar daquele observado para o potencial de ação.



**Figura 55: Visão geral dos resultados de eletrofisiologia.** Resultados normalizados, de acordo com o controle de cada grupo, sendo os resultados em (A)  $I_{Ca,L}$ , (B)  $I_{K1}$ , (C) potencial de ação e (D)  $I_{to}$ .

## **DISCUSSÃO**

## **Modelo experimental com a cepa colombiana**

O coração é um órgão vital, envolvido no endereçamento, através do sistema circulatório, de nutrientes e depuração de metabólitos, permitindo assim um funcionamento adequado de toda a fisiologia corpórea.

Por esse motivo, alterações na fisiologia desse órgão possuem importante repercussão no funcionamento de praticamente todas as estruturas corpóreas, tornando assim o coração um alvo importante de modulação por diferentes sistemas, para que sua fisiologia se adapte às necessidades do indivíduo.

Quando ocorre o estabelecimento de diferentes cardiopatias, a funcionalidade do órgão em questão é reduzida, tornando assim a qualidade de vida do indivíduo comprometida. Dentre as inúmeras cardiopatias que atentam contra a vida do homem, a doença de Chagas possui um importante papel, sendo endêmica na América do Sul, porém estendendo-se, em um menor grau, a outras regiões do planeta. A cardiopatia originada pela doença de Chagas possui múltipla origem, sendo ainda desconhecida a gênese do problema cardíaco decorrente dessa doença. No estágio final, pode-se encontrar uma completa reorganização do tecido cardíaco, com um elevado depósito de colágeno, o qual é acompanhado por uma disfunção no cardiomiócito ventricular e alteração no padrão eletrocardiográfico. Todos esses fatores, contribuem para o péssimo prognóstico associado aos indivíduos que desenvolvem a forma cardíaca crônica da doença de Chagas.

Do ponto de vista da evolução da doença no ser humano, pouco se sabe sobre as vias de sinalização envolvidas no remodelamento cardíaco observado. Sabe-se que, na fase aguda, alguns indivíduos podem apresentar arritmias complexas, podendo levar ao óbito. Depois da fase aguda, praticamente assintomática, o indivíduo passa por algumas décadas sem manifestar nenhum problema cardíaco, sendo que ao redor de 30-40% dos casos ocorrerá a manifestação da forma cardíaca da doença. Um dos poucos achados que são evidenciados sobre um possível mecanismo associado à evolução da cardiopatia chagásica é a presença, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, de um intenso infiltrado inflamatório, o qual poderia constantemente lesar o tecido cardíaco, culminando assim no estabelecimento da cardiopatia. Entretanto essa correlação não pode ser realizada de forma direta. Sendo assim, ainda é uma questão em aberto na literatura os mecanismos celulares associados ao remodelamento do miócito cardíaco no

decorrer da evolução da doença de Chagas. Por esse motivo, no presente estudo avaliamos a funcionalidade do miócito cardíaco em um modelo murino na fase aguda, tanto do ponto de vista mecânico como elétrico, na tentativa de elucidar a gênese da cardiopatia chagásica.

Primeiramente determinamos tanto a curva de parasitemia quanto a produção de alguns marcadores inflamatórios, para ganharmos alguma informação inicial sobre o componente imunológico de nosso modelo. Como relatado nos resultados, animais infectados com a cepa colombiana apresentam uma parasitemia que se desenvolve lentamente, com número máximo de parasitos na circulação ao redor de 45 dias pós-infecção (dpi), sendo que em seguida ocorre um declínio na parasitemia para níveis não mais detectáveis. Importante de se observar que, com essa cepa, ocorre uma taxa de mortalidade acentuada ao redor de 30 dias pós-infecção. Sabe-se, na literatura, que o camundongo da linhagem C57BL6 é um modelo que apresenta resistência a infecção por *T. cruzi*. Porém, mesmo utilizando uma baixa carga parasitaria inicial (50 parasitos/animal), foi observada uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40%.

Quando avaliamos a produção de alguns marcadores pró-inflamatórios, observamos inicialmente uma elevada produção de IFN- $\gamma$ , sendo seguida por um aumento na produção de MCP-1 e TNF- $\alpha$ . A lógica na sequência de produção das citocinas e quimiocina avaliadas segue a sequência de ativação do sistema imune. O IFN- $\gamma$  é uma das mais importantes citocinas envolvidas no controle do número de parasitos, envolvida na potencialização da resposta microbicida do macrófago, um dos principais componentes da resposta imune inata. Já o MCP-1 tem um importante papel em facilitar a migração de diferentes células fagocitárias para sítios de infecção. Já o TNF- $\alpha$  possui papel fundamental em potencializar a resposta imune inata, favorecendo assim a eliminação do parasito. Assim, após um aumento inicial dessas moléculas na circulação, ocorre um declínio da resposta, associada a uma diminuição da parasitemia. Entretanto, uma observação mais cuidadosa do perfil de produção de citocinas e quimiocinas, demonstra que as três moléculas em questão, mesmo aos 170 dpi, não retornaram para o valor basal originalmente observado a 0 dpi. Esse resultado sugere que em nosso modelo foi instalada uma inflamação crônica, mesmo na ausência de parasitos na circulação. O processo de inflamação crônica foi observado também no tecido cardíaco, sendo que tanto nos 30 dpi quanto nos 90 dpi, foi constatado um intenso infiltrado inflamatório (dado não mostrado). Sendo assim, do ponto de vista da

resposta imune, nosso modelo apresenta uma resposta similar ao que ocorre em muitos outros modelos, inclusive em muitos estudos realizados em humanos.

Do ponto de vista macroscópico, sabe-se que na fase aguda da doença de Chagas ocorrem múltiplas alterações no traçado do ECG, tanto de modelos animais como no homem. Por esse motivo, decidimos iniciar nossos estudos avaliando o padrão eletrocardiográfico dos animais infectados aos 30 dpi. Este ponto foi tomado como representativo da fase aguda, pois foi observada uma alta taxa de mortalidade.

Em humanos, são observados, na fase aguda da doença, diferentes alterações no ECG, como por exemplo taquicardia sinusal, baixa amplitude do complexo QRS, alterações de repolarização ventricular, bloqueio atrioventricular de 1<sup>o</sup> grau, aumento da frequência cardíaca, além de outras manifestações. Em modelos usando camundongos, nem sempre são achadas alterações eletrocardiográficas na fase aguda, sendo essas alterações dependentes da espécie do animal e da cepa de *T. cruzi* utilizada (Andrade , 1990; Eickhoff et al., 2010; Waghabi et al., 2009).

Em virtude das dificuldades técnicas e limitações do método utilizado, o eixo y (voltagem), associado a amplitude do sinal do eletrocardiograma, não pode ser utilizado para análise dos resultados. Isso porque a forma de implantação dos eletrodos poderia gerar alterações na amplitude e cinética do sinal, que não fossem necessariamente atribuídas a alterações provocadas pela cardiopatia chagásica (Zipes et al., 2006).

Mesmo não sendo possível utilizar a amplitude do sinal, que poderia fornecer importantes informações sobre a existência ou não, em nosso modelo, do complexo QRS de baixa amplitude, detectamos outras importantes alterações morfológicas no ECG dos camundongos, associadas principalmente a duração das ondas que compõem o ECG.

Primeiramente, observamos um aumento da frequência cardíaca, fato já observado no homem e em modelo murino na fase aguda. O aumento da frequência cardíaca pode ser atribuído a uma destruição dos neurônios parassimpáticos, fato que ocorre na fase aguda da doença de Chagas, sendo que, hipoteticamente, a desnervação simpática também observada não seria tão grave quanto a parassimpática (Machado et al., 1987; Machado et al., 1998; Ribeiros dos Santos e Hudson, 1981), sendo as bases moleculares desse processo ainda não estabelecidas. As bases moleculares para as alterações encontradas seriam a presença de autoanticorpos contra o receptor muscarínico M2 (Fu et al., 1993), e o receptor adrenérgico B1 (Magnusson et al., 1990).

Uma possível explicação para papel modulatório apresentado pelos autoanticorpos já foi demonstrado, pois foram capazes de modular a eletrofisiologia da célula cardíaca, principalmente a corrente de cálcio do tipo-L e do potencial de ação (Del Corosso et al., 2004). Entretanto, a hipótese de que autoanticorpos contra o receptor muscarínico e adrenérgico poderiam modular a frequência cardíaca, por alterarem o tonus do nodo sino atrial já na fase aguda da doença de Chagas ainda precisa ser testada, tendo em vista que a maioria dos estudos que detectaram a presença desses auto-anticorpos o fizeram apenas na fase crônica.

Além disso, foi possível constatar uma profunda alteração na repolarização ventricular, como evidenciado pelo aumento da duração do complexo QRS. Adicionalmente, alterações atriais também foram detectadas, sendo ela atribuída principalmente a uma dissociação átrio ventricular, devido ao aparecimento de alternância de onda P (Moffa e Sanches, 2001). Adicionalmente, o observado padrão também pode ser associado a um bloqueio atrioventricular de grau um, já que não ocorreu uma alteração na frequência cardíaca no período observado (Moffa e Sanches, 2001).

Levando-se em conta a morfologia do complexo QRS, ao se observar atentamente a onda média do ECG dos animais chagásicos, aparentemente em dois deles (figura 14 B, 1 ECG da esquerda, parte superior; 4 ECG da esquerda, parte inferior) é possível inferir que esses animais apresentavam infarto inferior do miocárdio (Moffa e Sanches, 2001, p 521). Porém, uma análise histológica seria necessária para confirmar este fato. Adicionalmente, analisando o ECG dos animais na figura 14 B, primeiro e terceiro à direita e segundo a esquerda, é possível perceber uma isquemia subepicárdica, acompanhada de bloqueio de ventrículo esquerdo (Moffa e Sanches, 2001, p 533).

As arritmias, que também são um constante achado na fase aguda da doença de Chagas, não foram detectáveis em nosso modelo. Isso porque a linha de base do sinal, principalmente dos animais controles, é muito oscilante. Isso se deve a um fator principal: o ECG foi realizado em animais acordados, não anestesiados. Optamos por realizar o ECG em animais acordados porque é bem conhecido que diferentes anestésicos são capazes de alterar principalmente a duração das diferentes ondas do ECG (Owczuk et al., 2008; Copeland et al., 2008), fato que poderia mascarar os resultados.

Apesar de não ter sido possível verificar arritmias em nosso modelo, o coração estudado apresentou alterações funcionais e estruturais que justificam principalmente a ocorrência de reentrada. Para que ocorra esse fenômeno são necessários alguns requisitos, tais como: dupla via de condução do impulso elétrico; diferentes refratariedades entre ambas; e condução bidirecional em ao menos uma das vias (Moffa e Sanches, 2001).

Diferenças regionais na refratariedade resultam, principalmente, de aumento na deposição de colágeno e alterações na eletrofisiologia celular, como p. ex. aumento da duração do potencial de ação, diferenças que culminam em um aumento da duração do QT. Sendo assim, podemos imaginar que com o passar da infecção ocorre uma alteração nos parâmetros eletrofisiológicos da célula muscular cardíaca e remodelamento da matriz extracelular do coração, associadas aos problemas de condução detectados em nosso modelo (como bloqueio de ramo direito e esquerdo). A junção desses fatores contribui gradativamente para uma maior incidência de reentrada, culminando com uma maior ocorrência de taquiarritmias ventriculares graves, podendo assim contribuir para os óbitos recorrentes na doença de Chagas na fase aguda e crônica (Moffa e Sanches, 2001; Brener et al., 2000).

As alterações eletrocardiográficas encontradas em nosso modelo foram acompanhadas por alteração no ecocardiograma. Constatamos uma intensa hipertrofia generalizada pelas estruturas do coração, sendo mais evidente no septo intraventricular e no ventrículo esquerdo. A hipertrofia relatada em nosso estudo também já foi observada em outro estudo, no qual foi utilizada a cepa colombiana (Kumar et al., 1969, Federici et al., 1964). O fato de não serem relatadas alterações cardiomorfológicas na fase aguda da doença de Chagas não implica a sua ausência. Um dos poucos estudos realizados demonstrou que de oito pacientes que vieram a óbito na fase aguda, cinco deles morreram devido a uma intensa miocardite (Brener et al., 2000). Entretanto, a maior disponibilidade de ecocardiogramas observada hoje em dia pode favorecer futuramente uma maior coleta de dados sobre alterações morfológicas cardíacas associadas à fase aguda da doença.

As alterações ecocardiográficas encontradas em nosso modelo demonstram que com 30 dpi ocorre uma hipertrofia cardíaca, sendo que com 15 dpi essa hipertrofia ainda não é observada. Contudo, com 15 dpi é observada uma redução no volume sistólico, diastólico e ejetado, porém manutenção da fração do volume ejetado. Esse resultado

indica que com 15 dpi ocorrem alterações nas propriedades mecânicas do miócito cardíaco, o que provavelmente o torna menos distensível. Para gerar uma compensação no sistema, devido à eminente redução na capacidade contrátil do coração, uma sinalização hipertrófica é ativada, culminando com um aumento da massa cardíaca, levando à compensação. O sinal hipertrófico gerado poderia ser atribuído a sinalizadores moleculares hipertróficos clássicos, como a via do BNP/ANP, ou a moléculas do sistema imune, como o TNF- $\alpha$ . Sendo que em nosso estudo observamos um aumento na produção de TNF- $\alpha$  e outros da literatura já relataram aumento de BNP/ANP durante a infecção por *T. cruzi*

Sendo assim, inicialmente a produção de TNF- $\alpha$ , em conjunto com outras vias de ativação hipertrófica, induziria um aumento na massa cardíaca devida à hipertrofia miocárdica. Contudo, em função de uma constante ativação das vias hipertróficas, o miócito cardíaco perde a sua habilidade em induzir hipertrofia celular, resultando no estabelecimento de uma incapacidade do miócito em responder ao sinal hipertrófico, migrando dessa forma para uma hipertrofia descompensada. Associado a esse fato, existe o potencial apoptótico do TNF- $\alpha$  sobre os cardiomiócitos, que pode contribuir para a redução da massa ventricular observada em nosso modelo, da transição da fase aguda para a crônica, o que pode culminar com o aumento da deposição de colágeno, classicamente relatado em diferentes modelos de estudo da doença de Chagas

Entretanto, quando é realizado um bloqueio do TNF- $\alpha$ , pode ocorrer uma piora no quadro da cardiopatia observada na fase crônica da doença de Chagas. Em um estudo utilizando Etanercepte, ficou demonstrado que na fase crônica existe um comprometimento da função ventricular cardíaca, porém isso não foi acompanhado por um aumento na parasitemia, na taxa de mortalidade, bem como na expressão cardíaca de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , ANP e BNP, sendo o mecanismo ainda desconhecido de redução da função cardíaca devido ao bloqueio do TNF- $\alpha$  (Bilate et al., 2007). Esse fato pode ser atribuído ao papel diferencial que ambos os receptores de TNF- $\alpha$  possuem no coração, sendo que com a evolução da cardiopatia chagásica, pode ocorrer uma superexpressão do TNFR1, em detrimento de uma redução do TNFR2.

Recentemente, foi demonstrado que no coração existe a expressão de dois receptores para TNF- $\alpha$ , sendo que o TNFR1 possui um efeito deletério na função cardíaca, sendo que a ativação desse receptor leva ao estabelecimento de hipertrofia, apoptose e ativação de NF- $\kappa$ B. Já o TNFR2, possui efeito contrário, sendo um ativador

de vias antihipertróficas, contribuindo para manutenção da função miocárdica (Hamid et al., 2009). Apesar de diversos resultados do nosso presente estudo, bem como outros da literatura, apontarem para um importante papel do TNF- $\alpha$  em modular a fisiologia cardíaca, o exato papel que essa citocina possui na evolução da cardiopatia chagásica, ainda precisa ser mais bem avaliado. Além do TNF- $\alpha$ , outras citocinas também são capazes de modular a fisiologia cardíaca, fato que será discutido em maiores detalhes posteriormente.

Com o objetivo de melhor compreender o remodelamento mecânico que ocorre no miócito cardíaco, realizamos experimentos para caracterizar a função contrátil da célula muscular cardíaca, tanto do ventrículo direito quanto do ventrículo esquerdo.

Em nosso estudo, demonstramos que existe uma correlação entre o início da produção de MCP-1 e IFN- $\gamma$  e uma redução na função do miócito ventricular da câmara direita e esquerda. Sendo assim, esse resultado sugere um papel dessas duas moléculas na disfunção contrátil observada no miócito cardíaco. Porém, o papel que ambas as moléculas possuem nessa modulação precisa ser mais bem estudado. Além disso, os níveis elevados de TNF- $\alpha$  observados com 30 dpi também se correlacionam com redução da função contrátil da célula com 30 e 45 dpi, indicando um possível papel para essa citocina na modulação da função miocárdica, sendo que o TNF- $\alpha$  já foi associado diretamente a uma redução da capacidade contrátil do músculo. Muitos dos efeitos deletérios do TNF- $\alpha$  sobre a fisiologia do miócito cardíaco são atribuídos a uma redução na liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, bem como uma redução da sensibilidade dos miofilamentos pelo cálcio (Duncan et al., 2007; Amadou et al., 2002; Goldhaber et al., 1996). Uma observação mais atenta aos resultados, comparando VE e VD, revela que existe uma pequena diferença na modulação da função contrátil da célula cardíaca ao longo da infecção, o que causaria diferenças associadas à resposta da câmara cardíaca direita e esquerda.

Como discutido até o momento, a infecção por *T. cruzi* causa uma alteração na maquinaria contrátil da célula cardíaca, com um remodelamento do acoplamento excitação contração. Além da habilidade do *T. cruzi* em induzir uma alteração na expressão de importantes proteínas contráteis do miócito cardíaco, a interação dele com a célula do hospedeiro pode ativar vias adicionais que também podem contribuir para a disfunção celular observada. Dados da literatura sugerem que a capacidade do *T. cruzi* de infectar diferentes células não linfóides, incluindo os cardiomiócitos, se baseia em

sua habilidade de interagir com a célula do hospedeiro e ativar diferentes vias de sinalização.

Foi demonstrado, inicialmente, que a internalização de *T. cruzi* em células não linfóides era um processo dependente da ativação de dois receptores de TGF- $\beta$  presentes na membrana celular, sendo que a deleção de ambos os receptores reduziu enormemente a capacidade infectante (Ming et al., 1995). Já foi demonstrado, em cardiomiócitos, que o TGF- $\beta$  pode ativar inúmeras vias, dentre elas a via da AKT (Chen et al., 2001), e que em macrófago ocorre a ativação da PI3kinase (Todorov et al., 2000), vias que possuem inúmeros alvos intracelulares. Em outros modelos de infecção por *T. cruzi* já ficou demonstrado uma elevada produção de TGF- $\beta$ . Adicionalmente, já foi relatado que o TGF- $\beta$  é capaz de induzir desorganização das junções comunicantes entre os miócitos cardíacos (*gap junction*), por modular o arranjo espacial da conexina 43, sendo que os níveis elevados de TGF- $\beta$  e desorganização das junções comunicantes também são observados na fase crônica da doença de Chagas, em humanos e modelo animal (de Carvalho et al., 1992; Waghbi et al., 2009). Sendo assim, além do TGF- $\beta$  participar da ativação de diferentes vias, também pode interferir nas propriedades elétricas da célula muscular cardíaca, podendo contribuir para as alterações observadas em nosso modelo. Além de modular a expressão do TGF- $\beta$ , a interação do *T. cruzi* com o cardiomiócito estimula outras vias de sinalização. Essa interação favorece também a ativação de vias de liberação de cálcio intracelular, sendo que essa ativação é necessária para a infecção da célula cardíaca pelo parasito, causando rearranjo do citoesqueleto (Tardieux et al., 1994; Moreno et al., 1994). Além disso, posteriormente ficou demonstrado, em célula de fibroblasto de rim, que um fator solúvel de *T. cruzi* é capaz de ativar formação de IP3 e mobilizar cálcio intracelular, bem como rearranjar o citoesqueleto. Adicionalmente, quando depletados os estoques intracelulares de cálcio, mas não o cálcio extracelular, o processo acima descrito foi abolido. Posteriormente, ficou demonstrado que uma fração solúvel de *T. cruzi* era capaz de ativar transientes repetitivos de cálcio em célula cardíaca isolada. Esses eventos eram independentes da ativação dos canais de cálcio do tipo-L, porém dependentes da ativação de proteína G, bem como do cálcio do retículo sarcoplasmático (Barr et al., 1996). Sendo assim, esses trabalhos demonstraram que o *T. cruzi* é capaz de causar um remodelamento/ativação de diferentes vias de liberação de cálcio (Barbosa e Meirelles, 1995). Adicionalmente, cultura de cardiomiócitos neonatos e células endoteliais com *T. cruzi* durante 4-7 dias

causou um aumento na concentração citoplasmática basal de cálcio. Em contraste, quando estimulada à liberação de cálcio via receptor  $\beta$ -adrenérgico, foi demonstrada uma liberação menor nas células infectadas, bem como um retardo na cinética de ativação e recaptura (Morris et al., 1988; Bergdolt et al. 1994), indicando uma regulação não somente dos receptores de membrana e vias de sinalização intracelular, bem como dos processos básicos de funcionamento da célula, já que a controle da concentração citoplasmática de cálcio é fundamental para o funcionamento da célula cardíaca.

Dentre uma das vias que acreditamos estar envolvida nas alterações relacionadas ao manuseio do cálcio intracelular e á Pi3kinase/akt. Dados da literatura demonstram que cardiomiócitos de ratos neonatos, quando incubados com TNF- $\alpha$ , apresentam uma ativação da via PI3kinase/Akt, culminando com ativação de NF- $\kappa$ B e JUN kinase, sendo essa via fundamental para o papel hipertrófico do TNF- $\alpha$  durante o estabelecimento da hipertrofia cardíaca (Hiraoka et al., 2001; Frati et al., 2002) sendo que existem evidências demonstrando que o TNFR1 é capaz de inibir e o TNFR2 estimular a fosforilação da akt (Higuchi et al., 2006). Entretanto, não foi observada ativação de Akt por TNF- $\alpha$  em nenhum dos modelos (Lecour et al., 2005), fato que evidencia o papel específico dessa molécula sinalizadora em diferentes formas de estímulo, como também sugere uma função dependente da concentração circulante dessa citocina, bem como o nível de expressão de seus receptores no coração. Nossos resultados indicam uma produção crônica de TNF- $\alpha$ , nas diferentes fases da doença, podendo contribuir para o remodelamento celular observado no miócito cardíaco. Adicionalmente, outras citocinas também são capazes de estimular a via Pi3kinase/Akt em cardiomiócitos. Em fibroblasto cardíaco humano, foi observado que a IL-18 é capaz de ativar a via em questão, levando à ativação de NF- $\kappa$ B (Reddy et al., 2008). Esses resultados, envolvendo a ativação da via PI3kinase por diferentes moléculas do sistema imune, abre portas para um vasto campo de pesquisa que ainda é pouco explorado.

A via de ativação PI3kinase/Akt possui não somente um importante papel na facilitação da infecção de células não fagocíticas, mas também uma estratégia evolutiva da interação do *T. cruzi* com seu hospedeiro. Em um elegante estudo realizado por Chuenkova e Pereira-Perrin (2009), ficou demonstrado que o *T. cruzi*, mais especificamente um fator neurotrófico derivado de parasito (PDNF), uma trans-sialidase que está localizada na superfície do protozoário, é capaz de ativar Akt, levando à ativação de vias antiapoptóticas, através da inibição da transcrição de diferentes fatores

apoptóticos, como caspase-9, genes da família Bcl2 e do fator de transcrição FOXO. Sendo assim, uma vez que o *T. cruzi* tenha infectado a célula, ele é capaz de manter a viabilidade celular, por meio da ativação de via PI3kinase/Akt, permitindo assim que ele dure por um longo período no interior da célula (4-5 dias). Apesar de esse mecanismo ser uma interessante estratégia para permanência de *T. cruzi* em células cardíacas, principalmente durante a fase crônica da doença, evidências diretas do papel anti-apoptótico da ativação da Akt por infecção de *T. cruzi* em célula muscular cardíaca ainda precisa ser demonstrado.

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que existe uma correlação entre as alterações observadas macroscopicamente (eletro e ecocardiograma) e molecularmente (eletrofisiologia e contração celular) em relação às alterações do miócito cardíaco. Também demonstramos que existe uma alteração significativa na eletrofisiologia do coração, evidenciada pelas alterações eletrocardiográficas. Sabe-se que existe uma estreita associação entre a atividade elétrica global do coração demonstrada pela análise do ECG com a eletrofisiologia do miócito cardíaco isolado. Por esse motivo decidimos estudar alguns dos componentes envolvidos no controle da excitabilidade da célula muscular cardíaca. Iniciamos nosso estudo avaliando o potencial de ação cardíaco, que é a resposta elétrica final do miócito cardíaco (Bers, 2002).

Nossos dados claramente apontam para um aumento da duração do PA, tanto em células do VD quanto nas do VE. Entretanto, os resultados do VE indicam que o remodelamento elétrico evidenciado no PA é estabelecido entre 15-30 dpi e não com 15 dpi. Esses dados indicam que primeiramente ocorre um remodelamento mecânico seguido pelo elétrico, já que as alterações nas propriedades contráteis do miócito cardíaco e portanto do coração foram observadas com 15 dpi. Isso abre uma janela onde pode-se sugerir que os mecanismos associados ao remodelamento mecânico sejam distintos daqueles observados no remodelamento elétrico.

Além da alteração observada na repolarização do PA, constatamos também uma diminuição na taxa de despolarização do VE e um aumento do *overshoot* do VD com 30 dpi. Esse fato indica que, provavelmente, a corrente de sódio (Berecki et al., 2010) é diferentemente modulada no VE e no VD ao longo da evolução da infecção. Interessante de ser observado que dados prévios da literatura já demonstram que na fase

aguda da doença de Chagas, em modelo canino, ocorre uma alteração na morfologia do PA do ventrículo esquerdo (Pacioretty et al., 2010).

Em seguida, quando comparamos as mudanças observadas no PA do VE e do VD, percebemos que o percentual de aumento da duração do PA foi similar entre os miócitos das diferentes câmaras cardíacas. Assim, tais mudanças são correlacionadas com as alterações eletrocardiográficas, o que constitui um importante substrato celular para a ocorrência de arritmias cardíacas (Boukens et al., 2009), fato comumente observado na fase aguda.

Diferentes componentes iônicos estão envolvidos no controle da repolarização do PA cardíaco. Em nosso estudo decidimos avaliar a  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{Ca,L}$ , sendo a última uma importante conexão com a ativação da contração celular.

Quando avaliamos a  $I_{K1}$ , observamos que existe um discreto aumento da densidade de corrente, porém não da condutância dessa família de corrente ao longo da infecção, sendo essa característica mais evidente no VE do que no VD. Outro parâmetro avaliado foi o potencial de repouso das células do VE com 30 dpi. Observamos que as células infectadas apresentaram um potencial de membrana mais hiperpolarizado quando comparado com as células controle (Tabela 18 anexo1). Sabe-se que alterações na condutância para  $I_{K1}$  podem contribuir tanto para importantes alterações na forma do PA, bem como no ECG. Uma redução na densidade da  $I_{K1}$  está associada a um aumento da duração do potencial de ação, bem como do intervalo QT (McLerie e Lopatin, 2003). Já um aumento na densidade de corrente está associado a um encurtamento do potencial de ação, com aceleração da fase 3 da repolarização, tornando a célula hiperpolarizada. Além disso, é observado um encurtamento do intervalo QTc, indicando uma correlação entre o encurtamento do PA e o fenótipo observado no ECG (Miake et al., 2003). Aparentemente, as alterações observadas em nosso modelo são contraditórias quando comparadas com esse estudo. Entretanto, algumas peculiaridades merecem ser comentadas, pois são capazes de explicar a suposta discrepância. No estudo realizado por Miake e cols. (2003), a superexpressão da Kir2.1 resultou em um aumento de mais de 100% na densidade de corrente. Já em nossos estudos, o aumento observado foi discreto (ao redor de 30% no potencial mais negativo, sendo que não existe diferença em voltagens mais positivas). Sabe-se que no miócito cardíaco de camundongos, a corrente de potássio transitória de saída possui papel de destaque na repolarização do PA (Roman-Campos et al., 2010; Rota et al., 2007). Sendo assim, podemos imaginar

que com a evolução da doença de Chagas, a disfunção associada a  $I_{K1}$  pode possuir um papel mais relevante. No modelo *knockout* para conexina-43, foi observado que em condições basais existe um aumento na densidade da  $I_{K1}$  (Kontogeorgis et al., 2008). Desse modo parece existir uma correlação entre uma redução na expressão da conexina-43 e um aumento da  $I_{K1}$ . De outros estudos, sabe-se que durante a cardiopatia chagásica existe uma redução na expressão da conexina 43 (Campos de Carvalho et al., 1992; Waghabi et al., 2009). Assim sendo, podemos traçar um paralelo entre uma progressiva redução na expressão da conexina 43, culminando com um progressivo aumento na densidade da  $I_{K1}$  durante o progresso da doença de Chagas. Existem outras vias intracelulares capazes de modular a função e densidade da  $I_{K1}$ . Alguns estudos demonstram que fosforilação por PKA e alterações no pH intracelular modulariam positiva ou negativamente a densidade da  $I_{K1}$ , porém os resultados obtidos até o momento são contraditórios, sendo a questão um ponto em aberto na literatura (Lopatin e Nichols, 2001).

Apesar das alterações observadas na  $I_{K1}$ , elas por si só não são suficientes para explicar as alterações no PA do cardiomiócito, bem como aquelas observadas no ECG. Por esse motivo, também avaliamos a corrente total de potássio de saída.

Como pôde ser observado em nossos resultados, ocorre uma redução no componente inicial da corrente de potássio, que é denominado pela literatura de  $I_{to}$  (Grandy et al., 2007). Essa redução ocorreu tanto no VE como no VD. Além disso, a redução na corrente de potássio foi observada apenas com 30 dpi, sendo esse mais um indicativo que o remodelamento elétrico vem posterior ao remodelamento mecânico. Já a corrente obtida no final dos mesmos registros, em que foi avaliada a  $I_{to}$ , formada principalmente pelos componentes lentos (Grandy et al., 2007), também apresentou uma redução significativa na densidade de corrente (dado não mostrado). Da mesma forma que em nosso estudo, Pacioretty et al. (2010) observou na fase aguda uma redução da densidade da  $I_{to}$ , sendo que podemos assim traçar um mecanismo em comum na fase aguda. Existem muitos mecanismos que podem estar envolvidos com a redução da corrente de potássio de saída.

Alguns trabalhos apontam para a habilidade do NO em modular a densidade da  $I_{to}$ , principalmente em células atriais (Gomez et al., 2008). Nesse modelo utilizando inicialmente células do ovário de hamster (CHO) expressando Kv 4.3 e perfundindo doador de óxido nítrico e o próprio óxido nítrico, os autores perceberam uma redução

na densidade de corrente. Além de perfundirem doadores de NO e o próprio NO na célula CHO, eles também perfundiram essas substâncias em célula atrial, e observaram um efeito similar. Porém, eles não averiguaram a habilidade do NO em modular diretamente os miócitos ventriculares. Eles utilizam um animal KO para a isoforma endotelial da NO e concluíram que o NO não teria um potente papel em célula ventricular. Porém, um trabalho mais recente da literatura (Roman-Campos et al., 2010) demonstrou que o NO é capaz de modular negativamente a densidade da  $I_{to}$ , sendo a inibição revertida quando utilizado o L-NG-monometil Arginina Citrato (L-NMMA), um inibidor não específico para as três isoformas da NOS presente no coração. No trabalho de Gomez et al. (2008), eles propõem que o NO é capaz de ativar adenilato ciclase, levando a ativação de PKA ou proteína fosfatase-2, culminando na redução na densidade de corrente de potássio.

A participação de vias dependentes do estado redox da célula, bem como ativação de cGMP, proteína cinase C, CaMKII, foram descartadas. Alguns trabalhos sugerem que a atividade da adenilato ciclase está alterada durante a infecção por *T. cruzi*, sendo postulado que existe uma redução em sua atividade, não somente em células cardíacas como também em células endoteliais (Morris et al., 1988; Morris et al., 1992). Sendo assim, o aumento na produção de óxido nítrico observado em nosso modelo como em outros (Huang et al., 1999; Machado et al., 2000), acompanhado de uma alteração na atividade da adenilato ciclase, podem contribuir para a redução da  $I_{to}$ . Aparentemente, a produção de óxido nítrico, durante a infecção por *T. cruzi*, é potencializada por diferentes citocinas. Machado e cols. (2000) incubaram cardiomiócitos infectados com as diferentes citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e observaram que ocorre um aumento na produção de NO pelo cardiomiócito infectado, na presença dessas moléculas. Adicionalmente, quando incubadas em conjunto, a produção de NO é potencializada. Entretanto, ainda não se sabe ao certo qual isoforma de NO tem a ação potencializada por um estímulo com as citocinas. Tal estudo sugere que o aumento na produção de NO deve-se a um aumento na expressão de iNOS. Entretanto, podemos imaginar que cada uma das citocinas é capaz de ativar diferencialmente uma dada isoforma (Fernandez-Velasco et al., 2007), ou elas podem potencializar a ação apenas de uma delas. Fernandez-Velasco e cols. (2007) demonstraram que a iNOS, associada a um aumento na produção de  $O_2^-$ , induziu uma redução na expressão de Kv 4.2, o que se correlacionou com uma menor densidade de

$I_{to}$  em miócito cardíaco incubado com TNF- $\alpha$ . Este trabalho também forneceu evidências que incubando cardiomiócitos isolados com peroxinitrito ocorre uma redução da  $I_{to}$ . Sendo assim, nesse estudo eles demonstraram a habilidade de NO modular de forma genômica e não genômica a função da  $I_{to}$ .

Entretanto, para as demais correntes de potássio, aparentemente o NO possui um efeito ionotrópico positivo (maiores detalhes Tamargo et al., 2010). Também é proposto na literatura um interessante mecanismo, correlacionado à produção de espécies reativas de oxigênio e redução da  $I_{to}$ , através da desestabilização do mRNA da subunidade Kv 4.3.

Seguindo com os estudos das correntes iônicas durante infecção por *T. cruzi*, avaliamos a  $I_{Ca,L}$ . Como podemos perceber, diferentemente da  $I_{to}$ , da  $I_{K1}$  e do PA, ocorre uma inibição significativa da  $I_{Ca,L}$ , já com 15 dpi, tanto no VE como no VD. Além disso, essa atenuação é mais pronunciada com 30 dpi. A redução observada na  $I_{Ca,L}$  foi diferente entre o VD e VE, sendo que aparentemente no VD há um maior percentual de redução da  $I_{Ca,L}$ , quando comparado com o VE. A redução da  $I_{Ca,L}$  possui uma correlação com a diminuição da capacidade contrátil do miócito cardíaco. Entretanto a menor  $I_{Ca,L}$  não resultou em uma diminuição da liberação de cálcio pelo RS.

A redução na  $I_{Ca,L}$  não é um mecanismo presente em todos os modelos de disfunção cardíaca, sendo um achado variável na literatura (Mukherjee et al, 1998, Tsuji et al., 2000; Gomez et al., 1997; Mewes e Ravens, 1994). Esse fato demonstra que, dependendo do modelo de estudo, diferentes vias são ativadas. Conseqüentemente, um diferente quadro resultante é observado.

Uma importante informação adicional que obtivemos é que existe uma diferença significativa na atenuação da  $I_{Ca,L}$  entre o VD e o VE. Esse resultado sugere um prognóstico pior para as células do ventrículo direito. Adicionalmente, esse fato nos sugere que possam existir vias de sinalização diferenciais entre o VE e VD, sendo esse fato pouco discutido na literatura. Posteriormente serão discutidos resultados adicionais, que ajudam a corroborar esse fato.

Existem diferentes vias associadas a uma potencial redução da  $I_{Ca,L}$ . Nossos resultados claramente demonstram que existe a participação da via PI3Kinase/Óxido nítrico na regulação negativa da  $I_{Ca,L}$ . Imaginamos que a ativação dessa via tenha como finalidade proteger o cardiomiócito de uma sobrecarga de cálcio. Como já discutido anteriormente, durante a infecção por *T. cruzi*, é observada em cardiomiócitos a

ativação da via Akt/PI3kinase/NO, sendo que em nosso estudo demonstramos a consequência funcional dessa via: a redução da  $I_{Ca,L}$ . A redução da  $I_{Ca,L}$ , teoricamente, levaria a uma atenuação da liberação e cálcio do retículo sarcoplasmático, entretanto isso não foi observado. Assim, podemos imaginar um mecanismo compensatório para manutenção da liberação de cálcio pelo RS, como p.e. um ganho de função do receptor de rianodina, com aumento de sua probabilidade de abertura. Essa redução na  $I_{Ca,L}$ , mantendo a liberação de  $Ca^{2+}$  pelo retículo, impede um agravamento exacerbado da função contrátil da célula cardíaca, e evita uma sobrecarga citoplasmática de cálcio. Esse fato é necessário, já que durante a infecção, observa-se um aumento na concentração plasmática desse íon (essa elevação citoplasmática de  $Ca^{2+}$  aparentemente é necessária para permitir a replicação do *T. cruzi* na célula). Diversos dados da literatura demonstram que uma quantidade excessiva de  $Ca^{2+}$  pode induzir a morte celular. Sendo assim, esse fato seria um mecanismo evolutivo deletério, e não benéfico para a replicação de *T. cruzi* na célula muscular cardíaca. Resumidamente, a infecção do cardiomiócito pelo *T. cruzi* necessita da ativação da via Pi3kinase/Akt/NO, sendo que essa via favorece a infecção da célula e, ao mesmo tempo, evita uma sobrecarga de cálcio na célula cardíaca e também ativa vias antiapoptóticas (já que durante a infecção, diversas vias apoptóticas também são ativadas indiretamente, como produção extracelular e intracelular de NO,  $O_2^-$ , e outros). Essa é uma interessante estratégia evolutiva, através da qual o *T. cruzi* se mantém por um longo período uma célula muscular cardíaca viva.

Os mecanismos envolvendo a regulação da  $I_{Ca,L}$  já são propostos há algum tempo na literatura.

Já foi demonstrado que elevada concentração de NO pode estimular excessivamente a produção de cGMP, ativando a PKG, a qual pode modular negativamente a  $I_{Ca,L}$  por fosforilação direta (Fischmeister et al., 2005). De fato, foi demonstrado recentemente que PKG é capaz de fosforilar diretamente as subunidades  $\alpha$ -1C (Cav1.2) e a subunidade  $\beta$ -2, promovendo a redução da  $I_{Ca,L}$  em cardiomiócitos (Yang et al., 2007). Porém, o excesso de NO também pode favorecer o aumento da  $I_{Ca,L}$  via S-nitrosilação por oxidação de grupos tióis pelo peróxido-nitrito (Campbell et al., 1996, revisto por Hess et al., 2005). Além disso, a atuação do NO pode variar em função da concentração e do local onde ele é produzido. Gonzalez et al. (2008) demonstraram que em baixas concentrações do doador de NO (Nitroprussiato de Sódio

– NPS, 0.1 a 10  $\mu\text{M}$ ) existe um aumentando na força de contração em experimentos com órgão isolado, sendo este efeito aparentemente devido à S-nitrosilação, pois foi inibido pela presença de uma molécula com papel de “sequestradora” das espécies reativas do oxigênio. Entretanto, em concentrações elevadas (NPS>100  $\mu\text{M}$ ) o NO tem um efeito negativo, pois reduz a capacidade contrátil do coração por um mecanismo dependente da ativação da PKG, já que a inibição farmacológica desta cinase inibiu o efeito produzido anteriormente.

Modelos supreexpressando diferentes isoformas de NOS já foram estudados. No animal com superexpressão condicionada da nNOS no coração, observa-se uma redução da  $I_{\text{Ca,L}}$ , a qual é revertida com o uso de um inibidor específico da nNOS (Burkard et al., 2007). Já o animal superexpressando eNOS apresenta uma redução na capacidade contrátil da célula miocárdica, sendo essa redução atribuída a uma menor afinidade dos miofilamentos pelo cálcio (Brunner et al., 2001). Contudo, uma atenuação da  $I_{\text{Ca,L}}$  não pode ser descartada, já que esse fato não foi avaliado pelos autores. Como pode ser observado, a modulação da  $I_{\text{Ca,L}}$  pelo NO está bem registrado na literatura, porém o mecanismo pelo qual o NO exerce seu efeito ainda não está bem estabelecido.

Apesar de claramente ser demonstrado por nossos resultados que existe uma regulação da corrente de cálcio pela via PI3Kinase/NO durante a infecção por *T. cruzi*, esse não é o mecanismo único envolvido no controle dessa corrente durante a infecção.

Um detalhe importante não levantado pelo grupo que estudaram a função da superexpressão condicional da nNOS, foi que, em voltagens nas quais normalmente não existe uma  $I_{\text{Ca,L}}$ , ou são observados valores muito baixos (entre -50 a -30 mV), eles observaram um elevado valor de corrente, quando comparado com o controle. Além disso, ocorre uma maior expressão de um marcador hipertrófico, o  $\beta$ -MHC. Esse fato é levado em consideração nessa discussão, pois em muitos registros da corrente de cálcio realizados no presente trabalho, foi observado um padrão similar à corrente de cálcio do tipo T. Ou seja, um tempo para o pico da corrente menor do que habitual, uma densidade de corrente de cálcio maior do que a comum, bem como uma cinética de inativação mais acelerada em -20 mV. Contudo esse achado não foi homogêneo nos nossos estudos, sendo necessária a realização de experimentos adicionais em condições específicas para comprovar se de fato existe a reexpressão da corrente de cálcio do tipo T durante a evolução da cardiopatia chagásica em modelo murino. Porém, muitos resultados de nosso estudo e dados da literatura sugerem que esse fenômeno ocorra. Já

foi demonstrado que a expressão da subunidade Cav 3.2 (subunidade associada à corrente de cálcio do tipo T) é regulada pela concentração citoplasmática de cálcio, via estimulação de PKC. Além disso, o aumento da expressão de Cav 3.2 resultou em um aumento da corrente de cálcio do tipo T, sendo esses experimentos realizados em células de rato neonato. (Zheng et al., 2010). Sendo assim, a elevada concentração citoplasmática de cálcio observada em células cardíacas infectadas, associada a uma maior expressão de nNOS e  $\beta$ -MHC, pode ser uma via bioquímica relacionada a reexpressão de corrente de cálcio do Tipo-T, fato normalmente observado em modelos de hipertrofia cardíaca (Ferron et al., 2003). A função da corrente de cálcio do Tipo T, em condições hipertróficas, ainda não é muito bem estabelecida na literatura, sendo que resultados contrários são encontrados. Evidências demonstram que uma superexpressão da corrente carregada pela subunidade Cav 3.1 possui um papel benéfico em modelo de hipertrofia, por uma via dependente da ativação da eNOS (Nakayama et al., 2009). Ao contrário, utilizando o animal Ca 3.2<sup>-/-</sup>, através de modelo de bandejamento da aorta, e de infusão de angiotensina II, não foi observada hipertrofia em comparação com o animal controle. O mecanismo molecular proposto nesse estudo envolve a ativação da via calcineurina/NFAT. Devido à contradição de resultados presente na literatura, um estudo mais detalhado é necessário para melhor caracterizar o papel da possível corrente de cálcio do tipo T reexpressa durante a cardiopatia chagásica.

Dando continuidade ao estudo do acoplamento excitação-contração de nosso modelo, avaliamos a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Segundo modelos clássicos da literatura, geralmente quando se observa uma redução na corrente de cálcio do tipo L, tem-se uma redução no transiente global de cálcio. Em nosso modelo, entretanto, na fase aguda não observamos diferença na liberação de cálcio pelo retículo. Em linha com esses dados, também não foi encontrada alterações nos estoques de cálcio do RS. Na fase aguda, avaliando a constante de tempo associada a recaptura de, que funciona como um indicativo da função da SERCA2A. Observamos um aumento no valor da constante de tempo, indicando uma menor eficiência do sistema. Quando avaliamos o tempo para o pico do transiente, observamos que ocorre um retardo para a máxima liberação de cálcio. Além disso, quando avaliamos a sincronia de liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (detalhes nos materiais e métodos) observamos um desacoplamento do canal de cálcio e o receptor de rianodina, indicando um desarranjo estrutural do acoplamento excitação-contração em sua unidade

fundamental, o *couplon* (Stern et al., 1997; Frazini-Armstrong et al., 1999). O *couplon* é a unidade básica de controle da liberação de cálcio pela célula muscular. Ela permite o funcionamento adequado do acoplamento excitação-contração, e um desarranjo dessa unidade básica culmina geralmente em uma redução na liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Louch et al., 2006; Gomez et al., 1997). Sendo assim, diferentes resultados do nosso modelo indicam que, na fase aguda, deveria ser observada uma redução na liberação global de cálcio, a saber: aumento do tempo para o pico do transiente, desacoplamento da interação entre canal de cálcio e receptor rianodia, e redução na corrente de cálcio do tipo L. Esses dados indicam fortemente que existe um ganho de função para o receptor de rianodina, provavelmente levando em um aumento da probabilidade de abertura desse canal, porém essa hipótese não foi comprovada. O receptor de rianodina é uma proteína com inúmeros sítios passíveis de S-nitrosilação, sendo que cada monômero de sua estrutura possui 89 cisteínas, sendo 12 passíveis de s-nitrosilação. Alguns dados da literatura indicam que, quando o receptor de rianodina é nitrosilado, ocorre um aumento na probabilidade de abertura do canal (Stoyanovsky et al., 1997), principalmente via ativação da nNOS. Porém, essa informação ainda não é um consenso (Zahradnikova et al. 1997). O papel que o NO apresenta na modulação do receptor de rianodina em nosso modelo ainda precisa ser melhor averiguado.

Adicionalmente, outro importante mecanismo envolvido no controle da função do receptor rianodina é o seu estado de fosforilação. Essa proteína possui inúmeros sítios de fosforilação. É bem conhecido que durante a insuficiência cardíaca acontece uma hiperfosforilação do receptor, levando o canal a um estado de subcondutância, o que pode ocasionar um vazamento de cálcio durante a diástole, levando a depleção de cálcio do retículo sarcoplasmático. Essa é uma das hipóteses mais aceitas para a ocorrência de insuficiência cardíaca (Zalk et al., 2007).

Entretanto, em nosso modelo, não observamos uma redução nos estoques intracelulares de cálcio. Isso indica que tal mecanismo possivelmente não participa nas fases iniciais da doença de Chagas. Sendo assim, é necessário mais estudos para identificar a via envolvida na modulação do receptor de rianodina em nosso modelo. Entretanto, uma outra possibilidade, sem necessariamente levar a um ganho de função do receptor de rianodina, pode ocorrer durante as fases transitórias que culminam com insuficiência cardíaca na doença de Chagas. O aumento na duração do potencial de ação pode favorecer uma saída maior de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, levando assim

a um fluxo igual de cálcio entre a situação controle e experimental, podendo assim gerar um estímulo suficiente para liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Porém, para averiguar esse fato, experimentos adicionais de *action potencial clamp* são necessários, para se determinar de fato qual a corrente de cálcio que é ativada durante o potencial de ação.

Outro dado que indica que em nosso modelo aparentemente não existe um aumento na probabilidade de abertura do receptor de rianodina são os *sparks* de cálcio. Os *sparks* de cálcio foram primeiramente descritos em células musculares cardíacas (Cheng et al., 1993). A unidade física fundamental do cardiomiócito é o *couplon*, porém a unidade funcional básica é o *spark* de cálcio. A avaliação da frequência e amplitude dos *sparks* são importantes indicativos do estado funcional do receptor de rianodina. Em nosso modelo, não observamos nem um aumento na frequência, nem na amplitude dos *sparks*, indicando que na fase aguda, não existe um ganho de função do receptor rianodina. Entretanto, uma análise funcional mais detalhada dessa proteína precisa ser realizada no curso temporal da doença de Chagas, para melhor definir o funcionamento desse receptor e seu papel no estabelecimento da cardiopatia.

### **Modelo experimental com a cepa colombiana – papel do interferon- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ na cardiopatia Chagásica**

#### ***IFN- $\gamma$***

Diversos resultados da literatura apontam para um importante papel do TNF- $\alpha$  na regulação da função cardíaca. Contudo, devido aos importantes achados nos dados de contratilidade celular observados em nosso modelo, decidimos avaliar a função contrátil de animais IFN<sup>-/-</sup> infectados com *T. cruzi*. Quando observados os parâmetros de contratilidade celular do animal C57BL6 infectado com a cepa colombiana com 15 dpi, é possível notar uma correlação entre a redução na capacidade contrátil do miócito cardíaco, e um aumento na produção de IFN- $\gamma$ . Esse fato, nos levou a levantar a hipótese que o IFN- $\gamma$  possui um papel geral no controle das propriedades mecânicas do miócito ventricular.

Nossos resultados apontam primeiramente para um importante papel antes desconhecido do IFN- $\gamma$  na fisiologia do miócito cardíaco. Como podemos perceber, o VD apresenta uma redução significativa na capacidade contrátil, quanto comparado com o VE. Esse resultado é o primeiro relato da literatura indicando que o IFN- $\gamma$  possui um papel no controle das propriedades mecânicas da célula cardíaca, sendo esse papel diferencial entre o VD e VE. Porém, devemos salientar que esse efeito pode ser indireto, já que a deleção da via de resposta do IFN- $\gamma$  pode induzir outros efeitos, sendo esses os mecanismos finais envolvidos na disfunção contrátil observada. Entretanto essa é uma nova via a ser estudada na fisiologia do miócito cardíaco.

Quando o animal IFN- $\gamma^{-/-}$  foi infectado, observamos claramente que a capacidade contrátil do miócito cardíaco foi preservada no VE, mesmo com uma alteração significativa do tempo para 50% da contração e relaxamento. Esse resultado sugere que o IFN- $\gamma$  participa ativamente do remodelamento mecânico observado aos 15 dpi em nosso modelo, podendo ser esse papel atribuído ao remodelamento das proteínas da maquinaria contrátil como já evidenciado por outros estudos (Heineke et al., 2003). Entretanto, ao contrário do VE, o VD apresentou um agravamento na função contrátil, sendo que a cinética de contração e relaxamento foram mais prejudicadas do que o observado para o VE. Esse fato evidencia ainda mais um novo papel diferencial do IFN- $\gamma$  em modular a fisiologia do miócito cardíaco, quando considerando diferentes regiões do coração.

O papel do IFN- $\gamma$  em modular a mecânica da célula cardíaca ainda não é bem esclarecido. Existem poucos estudos que avaliaram a função do IFN- $\gamma$  sobre a fisiologia da célula cardíaca. Em um estudo em que foi avaliada a função da proteína muscular LIM (MLP), um componente da maquinaria contrátil, ficou demonstrado que IFN- $\gamma$ , através de uma superexpressão da iNOS, leva a uma redução na expressão da MLP, quando cardiomiócitos em cultura são estimulados com endotelina-1, um conhecido indutor de hipertrofia cardíaca (Heineke et al., 2003). Os autores sugerem que esse pode ser um mecanismo associado ao estabelecimento da insuficiência cardíaca no modelo estudado, porém conclusões definitivas não foram realizadas. Os resultados desse trabalho indicam um papel antihipertrófico para a estimulação via IFN- $\gamma$ . Porém, em outro estudo, cardiomiócitos de animais neonatos foram estimulados com IFN- $\gamma$  resultando em um aumento de 15 vezes na síntese de ANP. Quando o IFN- $\gamma$  foi cocubado com MCP-1, esse aumento foi de 400 vezes (Cunha-Neto et al., 2005). Além

disso, nesse mesmo estudo, foi verificado que diversos genes pertencentes à via do IFN- $\gamma$  estão superexpressos na fase crônica da doença de Chagas, indicando um importante papel dessa via na cardiopatia chagásica. Já em outro estudo, ficou demonstrado que quando músculos papilares de ratos, são expostos a IFN- $\gamma$  e LPS, ocorre uma redução na capacidade contrátil do músculo, bem como uma menor resposta ao isoproterenol, sendo o mecanismo envolvido na depressão da função miocárdica um aumento na produção de NO via iNOS (Sun et al., 1998). Porém, para a ação depressora do IFN- $\gamma$  na função contrátil, aparentemente é necessária a presença de IL1- $\beta$  (Ungureanu-Longrois et al., 1995).

Adicionalmente, o IFN- $\gamma$  possui uma importante ligação com o metabolismo energético dos cardiomiócitos, sendo capaz de reduzir expressão de creatina cinase, inibir o metabolismo oxidativo e reduzir os níveis de ATP (Cunha-Neto et al., 2005 e referências). Esses resultados sugerem um papel do IFN- $\gamma$  no remodelamento metabólico cardíaco observado na doença de Chagas.

No que se refere à habilidade do IFN- $\gamma$  em modular a dinâmica de cálcio intracelular, ficou demonstrado que a incubação de cardiomiócitos neonatos com tal citocina induz um aumento nos níveis diastólicos de cálcio (Bick et al., 1999). Outras citocinas também foram capazes de induzir esse aumento, porém em uma proporção menor. Esse pode ser um importante mecanismo envolvido na geração da redução do volume da câmara cardíaca com 15 dpi, por um aumento na tensão do cardiomiócito, o qual se correlaciona com a produção inicial de IFN- $\gamma$ . Como podemos perceber, diferentes estudos sugerem que o IFN- $\gamma$  seja capaz de modular a função mecânica da célula cardíaca, sendo que os mecanismos moleculares de tal habilidade ainda precisam ser elucidados.

Alguns artigos sugerem um possível papel dos IFNs no controle da excitabilidade celular. Em um estudo utilizando IFN- $\alpha$ , e não o  $\gamma$ , foi demonstrado que exposição aguda de células ventriculares ao IFN- $\alpha$  levou a uma redução na atividade do  $K_{ATP}$ , sendo a atividade do IFN- $\alpha$ , sobre o  $K_{ATP}$ , dependente da ativação de um receptor tirosina cinase presente na membrana plasmática (Nishio et al., 1999).

O papel do IFN- $\gamma$  sobre modulação de correntes iônicas foi estudado primariamente em células da micróglia de ratos. Norenberg e cols. (1992) demonstraram que a micróglia indiferenciada, quando exposta a IFN- $\gamma$ , sofre

diferenciação, levando à célula a apresentar uma corrente de potássio de saída. Essa corrente apresentou potencial de reversão próximo ao do  $K^+$ , sendo inibida tanto por aplicação de 4-aminopiridina quanto de tetraetilamônio no meio extracelular. Além disso, o IFN- $\gamma$  também é capaz de aumentar a corrente retificadora de entrada e de saída de potássio, por uma via dependente de PKC, em célula da micróglia de rato (Visentin et al., 1995).

Nossos dados, em conjunto com resultados da literatura, indicam uma importante ação do IFN- $\gamma$  em modular aspectos relevantes da fisiologia do miócito cardíaco. Além disso, essa capacidade pressupõe-se como sendo diferencial, quando se compara células do VE e do VD. Sendo assim, esse grupo inédito de evidências experimentais abrem um importante campo de estudo para o papel do IFN- $\gamma$  na modulação da fisiologia do miócito cardíaco.

### ***TNF- $\alpha$***

Como evidenciado até o momento pelos dados aqui apresentados e resultados da literatura, a produção e ação do TNF- $\alpha$  possui papel importante no estabelecimento da cardiomiopatia chagásica. Sendo assim, um mecanismo de produção crônica dessa molécula no coração é necessário, para que ocorra uma constante modulação negativa do miócito cardíaco. Inicialmente, o TNF- $\alpha$  é produzido por células do sistema imune, como p. ex. macrófagos. Uma vez na circulação, o TNF- $\alpha$  é capaz de ativar a produção de NO no cardiomiócito, levando a um remodelamento elétrico e/ou mecânico da célula cardíaca. Posteriormente, o cardiomiócito estimulado é capaz de produzir TNF- $\alpha$ . Com a redução da parasitemia, ocorre uma redução na produção de TNF- $\alpha$  plasmático, sendo que outro estímulo é necessário para continuar a produção de TNF- $\alpha$  na célula cardíaca. Durante o processo de infecção por *T. cruzi*, sabe-se que ocorre um aumento no nível citoplasmático de cálcio (Morris et al., 1988; Bergdolt et al. 1994), sendo esse aumento sustentado por dias. Em nosso modelo, como apresentado anteriormente, também ocorre um remodelamento na dinâmica intracelular de cálcio nos cardiomiócitos. Dados da literatura demonstram que uma elevada concentração de cálcio em macrófagos e células de Kupffer é capaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$  (Letari et al., 1991; Seabra et al., 1998). Além dessa via, tem-se que durante a infecção por *T. cruzi* é observado um

aumento no estresse oxidativo em cardiomiócitos. Já foi demonstrado que durante a infecção por *T. cruzi*, o TLR4 é capaz de ativar a produção de TNF- $\alpha$  (Oliveira et al., 2010), sendo essa ativação mediada por O<sub>2</sub><sup>\*-</sup> via NOX-2 (Zhang e Feng, 2010). Assim, não somente a produção de NO e as alterações nos níveis basais de Ca<sup>2+</sup>, mas também um aumento na produção de O<sub>2</sub>, podem induzir a produção de TNF- $\alpha$  no coração de animais infectados por *T. cruzi*.

Como podemos perceber, existem diferentes mecanismos que podem induzir uma constante produção de TNF- $\alpha$  na infecção por *T. cruzi*. Por esses motivos, esse se torna um importante alvo terapêutico para o tratamento da cardiopatia chagásica, tanto em sua forma aguda quanto na crônica. É importante que NÃO pensemos que o TNF- $\alpha$  seja a ÚNICA molécula responsável pelo estabelecimento da cardiopatia chagásica, já que diferentes vias, como também demonstrado em nosso próprio estudo, estão associadas ao desenvolvimento da cardiopatia. Contudo, a ação pleiotrópica do TNF- $\alpha$  na fisiologia do miócito cardíaco o torna um interessante alvo terapêutico, o qual ainda precisa ser avaliado.

### **Modelo experimental – comparação entre cepa Y e colombiana**

Os estudos relativos às diferentes habilidades de cepas distintas de *T. cruzi* de gerarem padrões fisiopatológicos distintos, vêm sendo executados a anos pela comunidade científica. A maioria deles reportam alterações macroscópicas, como eletro e ecocardiográficas (Sadigursky e Andrade, 1986) bem como microscópicas, como deposição de colágeno e alterações na massa cardíaca (Frederici, 1964, Kumar et al., 1964, Andrade, 1990). De nosso conhecimento, não existe nenhum estudo em nível molecular avaliando a influência da cepa de *T. cruzi* sobre as propriedades do miócito ventricular ao longo da infecção.

Com esse objetivo, decidimos traçar um paralelo entre a fase aguda durante a infecção gerada pela cepa colombiana com a da cepa Y, conhecidas por gerarem um diferente padrão de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco. A colombiana é capaz de gerar um infiltrado inflamatório agudo e crônico sustentado (Andrade, 1990; Camargos et al., 2000), já aquele observado para a cepa Y está presente apenas na fase aguda, sendo reduzido na fase crônica (Camargos et al., 2000).

Primeiramente avaliamos comparativamente os dados ecocardiográficos e, como demonstrado, a cepa Y não foi capaz de induzir uma hipertrofia nas diferentes regiões do coração, sendo que algumas regiões apresentaram uma ligeira redução na espessura (parede posterior ventricular esquerda) ou na massa (ventrículo esquerdo). Entre 30-45 dias existe uma tendência a estabilização do sistema, indicando que uma condição de equilíbrio foi alcançada. Um perfil completamente diferente foi observado com a cepa colombiana, em que uma intensa hipertrofia foi constatada. Já considerando os volumes sistólicos e diastólicos finais, o recobro para valores normais foi mais lento com a cepa Y, quando comparado com a colombiana. Esses resultados sugerem fortemente que a resposta imunológica induzida pela cepa colombiana gera uma adaptação cardíaca distinta daquela observada para a cepa Y. Sabe-se que a inflamação cardíaca originada pela cepa colombiana é lenta e constante, já a Y gera uma inflamação intensa na fase aguda, com posterior redução (Andrade, 1990; Camargos et al., 2000). Sendo assim, esse é mais um resultado demonstrando que cepas diferentes geram alterações macroscópicas cardíacas distintas, e tais alterações podem ser correlacionadas com a resposta imune diferencial durante a infecção.

Como podemos observar na fase aguda da cepa Y (com 15 dpi), ela é capaz de induzir uma redução tanto na  $I_{to}$  quanto na  $I_{Ca,L}$ , de uma forma similar à observada na cepa colombiana. Além disso, também constatamos um aumento no tempo necessário para repolarização do potencial de ação. Entretanto, com a evolução da infecção, ocorre uma progressiva melhora dos parâmetros eletrofisiológicos avaliados, sendo que com 45 dpi, os valores de todos os parâmetros estudados (PA,  $I_{to}$  e  $I_{Ca,L}$ ) encontram-se iguais ao controle, indicando completa recuperação das propriedades elétricas do miócito. Esses resultados são completamente contrários ao observado para a cepa colombiana, que com 15 dpi já apresenta significativas alterações mecânicas e elétricas, sendo as alterações mantidas aos 90 e 200 dpi (dado não mostrado). Assim, podemos traçar um paralelo entre uma redução da inflamação no tecido cardíaco e uma melhora no funcionamento do órgão.

Diferentes grupos vêm tentando correlacionar as diferentes zimodemas com o fenótipo patológico demonstrado pela doença de Chagas. Assim, em nosso trabalho, propomos uma nova abordagem, do ponto de vista cardíaco, de se realizar um prognóstico da evolução da doença de Chagas. Quando o modelo em questão apresentar um infiltrado inflamatório persistente, mesmo depois do suposto *clearance* de parasitos

na circulação, esse indivíduo irá manifestar a forma cardíaca da doença. Já quando esse fato não for observado, ela não será manifestada. Esse fato auxilia a explicar porque muitos indivíduos não entram em uma fase manifesta da doença de Chagas, e outros indivíduos sim. Contudo, essa hipótese precisa ser melhor avaliada e comprovada, sendo um novo ponto em aberto na literatura correspondente a cardiopatia chagásica.

As variações internas dentro da população de *T. cruzi* são atribuídas à variação de comportamento das cepas nos diferentes modelos animais e às características bioquímicas e moleculares das diferentes cepas. Essa heterogeneidade (com base genética) encontrada entre as cepas determinaria um tropismo diferencial por tecidos, e conseqüentemente a variação do resultado clínico observado (Andrade, 1999; Vago et al., 2000). Apesar de a hipótese de variantes genéticas ser importante no estabelecimento dos sintomas clássicos da patologia chagásica, nenhuma correlação direta até então foi realizada (Devera et al., 2003). Sendo assim, poderíamos ainda sugerir que cepas com tropismo diferenciado pelo coração poderiam persistir durante longo período no tecido cardíaco, gerando assim, uma resposta inflamatória crônica e sustentada, favorecendo o estabelecimento da cardiopatia.

### **Aspectos evolutivos da interação entre *T. cruzi* e hospedeiro vertebrado**

Além das implicações clínicas da patologia chagásica, podemos pensar nos aspectos evolutivos das duas cepas estudadas.

Uma importante via envolvida na manutenção de cardiomiócitos infectados vivos é a ativação das vias Pi3kinase/akt e MEK1/ERK1/2, que podem ser ativadas tanto pelo próprio *T. cruzi* quanto pela sua principal cisteino-protease, cruzipain. Ambas as vias são capazes de ativar a caspase-9, promovendo a sobrevivência celular. Já a via MEK1/ERK1/2 causa aumento de BCL-2. Além dessas rotas, outras proteínas estão envolvidas na atividade antiapoptótica elucidada pelas vias Pi3kinase/akt e MEK1/ERK1/2 (Aoki et al., 2004, Aoki et al., 2006). Essa via de morte celular programada pode ser correlacionada com os diferentes tipos de cepas de *T. cruzi* e o seu grau de patogenicidade. Se pensarmos do ponto de vista filosófico, a interação entre hospedeiro vertebrado e invertebrado no ciclo de vida do *T. cruzi* é relativamente recente, (ao redor de 8000-6000 anos quando o Andino iniciou o processo de domesticar pequenos roedores. Entretanto novas técnicas, principalmente de biológica

molecular, vem colocando em cheque essa hipótese, remetendo o início da interação a 10000-9000 anos. Para maiores detalhes consultar Araujo et al., 2009) visto que a forma de inoculação do *T. cruzi* é passiva, e não ativa, sendo muito sujeita ao insucesso da infecção. Por esse motivo, por esse ciclo ser relativamente recente, a adaptação do *T. cruzi* em parasitar o hospedeiro vertebrado também é novo na evolução. Levando-se em consideração nossos resultados, observamos com a cepa Y uma atenuada e transitória modulação do componente elétrico da célula cardíaca, enquanto para a cepa colombiana foi observado um remodelamento crônico das propriedades elétricas do miócito cardíaco. Adicionalmente, outros dados da literatura demonstram que a cepa Y gera um remodelamento cardíaco mais atenuado do que a cepa colombiana. Assim, podemos imaginar que a interação *T. cruzi*-hospedeiro vertebrado, com a cepa Y, seja um modelo de interação melhor adaptada, enquanto com a cepa colombiana esteja ainda em processo de adaptação. Esse fato ainda pode ser associado à alta taxa de mortalidade observada na fase aguda pela infecção com a cepa colombiana, quando comparada com a cepa Y.

### **Papel do superóxido no remodelamento elétrico durante a cardiopatia Chagásica**

Existe uma idéia central de que o estresse oxidativo gerado pela infecção por *T. cruzi* contribua para o dano cardíaco observado, via uma ativação e produção constante de citocinas pro-inflamatórias (Carvalho et al., 2006). Em nosso trabalho demonstramos que a ausência de NOX-2, *per si*, preveniu parcialmente o remodelamento elétrico observado durante a infecção por *T. cruzi*, indicando que um dos componentes principais envolvidos no remodelamento elétrico seja, de fato, a geração de  $O_2^{*-}$  pela NOX-2. Em nosso modelo, constatamos que a ausência de  $O_2^{*-}$ , produzido pela NOX-2, preveniu a redução observada na  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{to}$ , bem como o aumento do tempo necessário para repolarização do PA. Entretanto, não podemos afirmar se a ausência da  $O_2^{*-}$ , preveniu um possível remodelamento genético, ou a ausência de  $O_2^{*-}$ , eliminou uma via aguda de regulação de ambas as correntes. Esse fato ainda precisa ser investigado.

Existe uma ligação entre o estímulo dos receptores de TNF- $\alpha$ , NADPH e eNOS, culminando com excesso de produção de peróxido de nitrito. Muitos fatores de transcrição são sensíveis ao estado redox, dentre eles o NFk-B (Galter et. al., 1994),

sendo que o aumento de ROS no núcleo funciona como um supressor de transcrição gênica, já que alguns desses fatores são ativados em seu estado reduzido. Importante que em células VSMCs e em cardiomiócitos já foi descrita a localização de NOX-4 no núcleo, gerando um importante *link* entre regulação da expressão gênica e ROS (Hilenski et al., 2004). Por outro lado, a produção de ROS por NOX-2 já foi relacionada com aumento da ativação de NFK- $\beta$ , sendo esse aumento relacionado com a ativação da I $\kappa$ b cinase, resultando na ativação do NF $\kappa$ -B, já que essa via teria íntima associação com a ativação do receptor para TNF- $\alpha$  (Li et al., 2008). Assim, dependendo da via em questão, a qual levaria a uma diferenciada ativação de múltiplos efetores, ela determinaria o papel final do ROS e sua habilidade em ativar ou reprimir a transcrição gênica.

A habilidade do ROS gerado pela NOX em modular diferentes componentes dos cardiomiócitos ainda não está bem estabelecida. Diferentes estudos demonstram que o ROS gerado por NADPH pode diminuir (Cherednichenko et al., 2004) ou aumentar a probabilidade de abertura dos receptores rianodina (Sanchez et al., 2005), contribuindo dessa forma para regulação da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Além disso, tem sido postulado que a produção de ROS por NADPH pode aumentar a probabilidade de abertura do canal de cálcio do tipo-L por um mecanismo ainda não bem estabelecido (Zeng et al., 2008). Considerando a I<sub>to</sub>, diversos estudos já demonstraram que uma exposição crônica das células cardíacas a angiotensina II leva a uma redução da tradução de mRNA da subunidade Kv 4.2 por um mecanismo dependente da geração de espécies reativas do oxigênio via NOX-2 (Zhou et al., 2006). Quando consideramos a I<sub>K1</sub>, observamos que ocorre um expressivo aumento na densidade de corrente. Os animais NOX-2 infectados, apesar de terem um formato preservado do PA, indicando uma normalização da função elétrica da célula cardíaca, apresentam elevada taxa de mortalidade, sendo que todos os animais infectados morrem ao redor de 20 dpi. Essa elevada taxa de mortalidade pode estar associada a uma maior ocorrência de arritmias (Miake et al., 2003), favorecida pelo pronunciado aumento da I<sub>K1</sub> observado no animal NOX-2<sup>-/-</sup> infectado.

Além da habilidade do O<sub>2</sub><sup>\*-</sup> em modular a atividade elétrica do miócito cardíaco, ele participa ativamente no controle do funcionamento da maquinaria contrátil. Apesar de não termos avaliado a função cardíaca do animal NOX-2<sup>-/-</sup> infectado, podemos supor que as proteínas da maquinaria contrátil do miócito cardíaco também encontram-se

preservadas no animal NOX-2. Já foi demonstrado que um maior estresse oxidativo pode acarretar uma redução na sensibilidade dos miofilamentos pelo cálcio. Gao et al., 1996, demonstraram que o aumento da concentração de superóxido, mesmo com aumento da concentração extracelular de cálcio, a capacidade do  $\text{Ca}^{2+}$  em aumentar a força de contração do coração foi extremamente atenuada, demonstrando assim uma ligação direta entre estresse oxidativo e sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, em um modelo de insuficiência cardíaca em camundongos *knockout* para a proteína distrofina, que é um modelo para a distrofia muscular de Duchenne, foi observado um elevado nível de estresse oxidativo. Willians et al. (2007) demonstraram que esses animais apresentam uma redução na capacidade contrátil do miócito cardíaco, bem como reduzida sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio. Os animais *knockout* e controle foram tratados com N-acetilcisteína (um antioxidante), e foi observado que a disfunção contrátil do miocárdio, bem como a alteração na relação capacidade contrátil x cálcio extracelular, foi atenuada. Este fato indica que neste modelo de IC o estresse oxidativo está contribuindo para gerar uma disfunção contrátil em função da alteração na sensibilidade dos miofilamentos pelo cálcio. Um dos mecanismos atualmente propostos para alterações na sensibilidade do miofilamento corresponde a alterações na TnTC, sendo tais alterações devidas a um aumento nas espécies reativas de oxigênio, que é capaz de ativar ASK1, uma proteína membro da família das MAPcinases. ASK1 é habilitada a fosforilar a troponina C e, sendo assim, reduzir a capacidade contrátil do miócito cardíaco (He et al., 2003). Adicionalmente, em um modelo de bandejamento da aorta (Greive et al., 2006), ficou demonstrado que o animal NOX-2<sup>-/-</sup> apresentou uma preservada função de contração celular, quando comparado com o controle. Além disso, quando as células controle foram perfundidas com N-acetilcisteína (um anti-oxidante), a contração celular foi recuperada. Além do remodelamento mecânico, observado em hipertrofia patológica, a geração de ROS está intimamente relacionada a uma maior deposição de fibrose intersticial (Greive et al., 2006), indicando a habilidade do ROS em modular não somente o miócito cardíaco, mas também o meio que o circunda. Sendo assim, esse aumento da fibrose pode contribuir enormemente para distúrbios mecânicos e elétricos do coração, gerando assim a possibilidade do ROS em modular não somente a fisiologia do miócito cardíaco, bem como da matriz extracelular durante a cardiopatia chagásica.

Diferentes trabalhos têm demonstrado que a geração de ROS está intimamente associada ao desenvolvimento de hipertrofia, sendo que a participação das ROS depende da forma de estímulo hipertrófico inicial. Em um modelo de administração de angiotensina-II, é observado um aumento da produção de ROS, via NOX-2, induzindo hipertrofia, sendo esse efeito atenuado no animal NOX-2<sup>-/-</sup> (Bendall et al., 2002). Entretanto, o mesmo resultado não foi observado quando usado um modelo de bandejamento da aorta (Byrne et al., 2003).

Além da habilidade das ROS em regular o crescimento celular dos miócitos cardíacos, elas também possuem a habilidade de regular a apoptose nessas mesmas células, sendo que diferentes fontes de estímulo são capazes de induzir a produção de ROS e gerar apoptose, como por exemplo angiotensina II e TNF- $\alpha$  (Akki et al., 2009). Interessantemente a ativação do receptor TGF- $\beta$ 1 é capaz controlar a apoptose induzida por NOX, por reduzir a atividade dessa proteína (Dandapat et al., 2008).

Em nosso trabalho, demonstramos que existe um importante papel do O<sub>2</sub><sup>\*-</sup>, durante a infecção por *T. cruzi*, no controle da excitabilidade celular cardíaca. Entretanto, a maioria dos estudos considerando a produção de O<sub>2</sub><sup>\*-</sup> durante a infecção por *T. cruzi* demonstrou o papel do desacoplamento da cadeia respiratória na geração das ROS. Resultados da literatura indicam que o desacoplamento da cadeia respiratória e uma redução da produção de ATP, em conjunto, podem contribuir para a disfunção observada nas fases aguda e crônica da doença de Chagas (Vyatkina et al., 2004). Contudo, nossos resultados claramente demonstram que a geração de ROS no citosol e/ou membrana plasmática possui um importante papel na gênese do remodelamento elétrico observado durante a infecção por *T. cruzi*, indicando que as diferentes fontes de ROS podem contribuir para diferentes disfunções no miócito cardíaco. Além disso, quando avaliada a influência da cepa sobre a redução da atividade de componentes da cadeia respiratória na fase aguda, foram observados resultados semelhantes, quando considerado a cepa Tulahuen e SGO-Z12 (Baez et al., 2008), indicando que as desordens mitocondriais são inerentes à cepa de *T. cruzi*. Contudo, estudos considerando a fase crônica ainda precisam ser realizados para avaliar se durante a evolução da infecção ocorre uma alteração desse perfil. Outro achado interessante indica que cardiomiócitos de ratos isolados, quando infectados em cultura por *T. cruzi*, possuem um aumento progressivo na produção de ROS, o qual não foi abolido por diferentes vias, incluindo NOX (Gupta et al., 2009). Baseando-se nesses resultados o

autor sugere que, durante a infecção por *T. cruzi*, a principal fonte de ROS seja a mitocôndria. O mecanismo sugerido é que a invasão da célula pelo *T. cruzi* causa um aumento no influxo de cálcio, que é o evento gerador da despolarização mitocondrial, conduzindo para a produção de ROS. Isso porque apenas *T. cruzi* vivo, e não lisado, foi capaz de gerar um aumento na produção de ROS (Gupta et al., 2009). Contudo, o autor não levou em consideração que em condições patológicas ocorre um aumento na expressão de NOX-2, sendo que na forma ativa e com maior expressão ela pode contribuir significativamente para a produção de ROS durante a infecção. Dessa forma, as diferentes fontes de ROS durante a infecção por *T. cruzi*, que contribui de fato para o dano cardíaco observado, ainda precisam ser melhor estabelecidas.

### **Desnervação e participação do sistema nervoso central na doença de Chagas**

A habilidade do *T. cruzi* em causar danos em células do sistema nervoso, tanto central quanto periférico, é relatada desde os primórdios da pesquisa da doença de Chagas. O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) durante a fase aguda da doença de Chagas ocorre na forma de encefalite com múltiplos focos, com grau variável de parasitismo e infiltrado inflamatório, sendo que animais com um dano mais severo do sistema nervoso geralmente morrem, como resultado da lesão cerebral e/ou miocardite aguda intensa, sendo o componente cardíaco mais proeminente. A encefalite observada principalmente na fase aguda regride durante a progressão para a fase crônica, sendo praticamente ausente nessa fase (Pittella, 1993). A habilidade do *T. cruzi* de infectar células neuronais do SNC ainda não foi bem documentada, sendo a sua habilidade de infectar astrócitos, a principal célula parasitada no SNC, bem documentada (Mata et al., 2000)

Considerando-se o sistema nervoso periférico, já foi demonstrado que na fase aguda da doença de Chagas ocorre uma redução da inervação simpática do coração em ratos infectados, sendo que a inervação é reconstituída na fase crônica da doença. A presença da desnervação simpática foi correlacionada com o intenso infiltrado inflamatório observado durante a fase aguda, com posterior recuperação do padrão de inervação simpático na fase crônica (Machado e Ribeiro, 1989). Além da desnervação simpática, ocorre também uma desnervação parassimpática do coração, porém ela também se recupera com a evolução da infecção para a fase crônica (Machado et al.,

1987). Um fato importante a ser notado é que a extensão e curso temporal da desnervação, tanto simpática quanto parassimpática, podem variar de acordo com o modelo animal levado em consideração (Machado et al., 1998; Ribeiro dos Santos e Hudson, 1981). Importante de ser notado que, em ambos os casos, para o componente simpático e parassimpático, ocorre uma importante participação de células do sistema imune e a produção de seus mediadores celulares na neurodegeneração observada, sendo que o óxido nítrico possui papel central (Melo et al., 1998; Garcia et al., 1999). Considerando o tropismo diferencial de diferentes cepas, quando avaliado o tropismo da cepa Y e colombiana pelo sistema nervoso autônomo (componente simpático e parassimpático) não é observada nenhuma diferença entre elas, sendo que o dano observado em ambos os casos é mais correlacionado com o infiltrado inflamatório. A correlação entre infiltrado inflamatório e presença do parasito foi mais proeminente na fase aguda do que na crônica (Souza et al., 1996).

Uma antiga teoria pregava que a desnervação cardíaca observada na doença de Chagas pudesse ser a origem dos problemas cardíacos observados. Contudo, com o passar dos anos, observou-se que esse fato era um efeito adicional da infecção, e não o agente principal causador das manifestações cardíacas da doença. Apesar das evidências demonstrarem isso, até pouco tempo era difícil associar o papel da desnervação do coração e a cardiopatia chagásica.

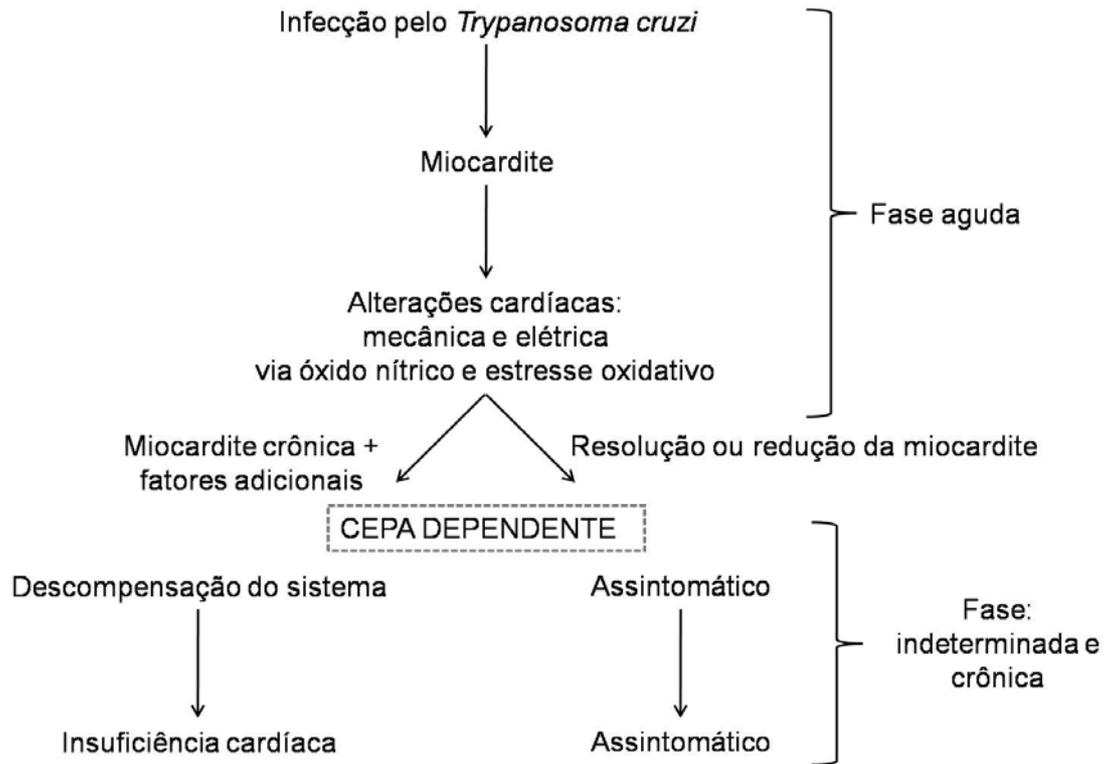
O desenvolvimento do animal *knockdown* para o transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT<sup>KD</sup>) permitiu avaliar, de forma isolada, o efeito de uma redução da função colinérgica do coração. Resultados da literatura sugerem que a redução da atividade colinérgica cardíaca seja capaz de gerar, a longo prazo, uma redução na função cardíaca, associada a uma alteração na dinâmica intracelular de cálcio dos cardiomiócitos. Entretanto, os resultados mostrados no presente trabalho evidenciam que uma redução na atividade colinérgica não foi capaz de causar alterações profundas na atividade elétrica dos miócitos ventriculares cardíacos, em condições basais. Contudo, a redução da atividade colinérgica foi seguida por uma disfunção adrenérgica, já que tanto a corrente de cálcio do tipo L quanto a força de contração do órgão isolado (Anexo 4) apresentaram uma resposta atenuada no animal VAcHT<sup>KD</sup> ao isoproterenol. Esses resultados sugerem que existe uma regulação acoplada entre os dois sistemas.

Tendo em vista nossos resultados, podemos concluir que a redução da atividade colinérgica do coração pode contribuir de forma efetiva para o remodelamento mecânico,

sem, contudo, alterar a atividade elétrica do miócito ventricular cardíaco. Entretanto, o grau de contribuição da desnervação colinérgica na cardiopatologia chagásica fica difícil de ser mensurada, tendo em vista o caráter multifatorial associado ao desenvolvimento das alterações mecânicas e elétricas observadas na doença em questão.

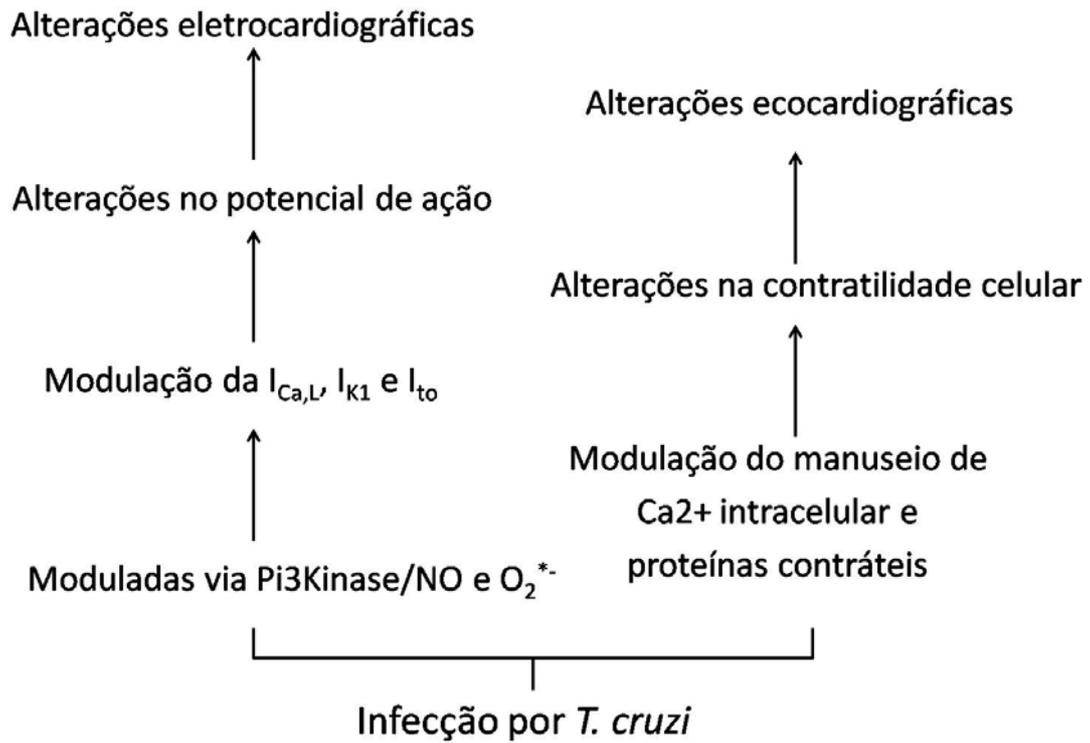
### **Mecanismo geral do estabelecimento da cardiopatia chagásica**

Levando em consideração nossos resultados, bem como dados apresentados pela literatura, podemos propor um mecanismo geral para o estabelecimento da cardiopatia chagásica. A infecção do hospedeiro vertebrado leva à ativação do sistema imune, sendo a consequência deletéria dessa resposta a geração de uma miocardite. Essa miocardite é capaz de levar, através da ativação de diferentes vias, a um remodelamento elétrico e mecânico do miócito cardíaco. O remodelamento elétrico é obtido através da alteração na condutância de diferentes famílias de canais iônicos, como  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_K$  e  $I_{to}$ , porém não se restringindo a essas. Já o remodelamento mecânico, é obtido em partes devido modulação do manuseio do cálcio intracelular, que contribui para o remodelamento elétrico e mecânico. As alterações celulares são atribuídas principalmente à ativação de vias que levam a produção de óxido nítrico e superóxido, porém não sendo restrito a essas vias. A depender da cepa, a miocardite é sustentada, gerando uma miocardite crônica, ou é resolvida, resultando em uma miocardite transitória. No segundo caso, tem-se que com a resolução da miocardite, ou a uma forte atenuação, levando a um recobro da função cardíaca. Sendo assim, o animal infectado entra na fase indeterminada da infecção, apresentando-se assintomático. Já no caso da miocardite sustentada, o remodelamento cardíaco continua e o sistema passa por uma fase transitória de compensação, seguida por uma descompensação. Uma vez que o coração não é mais capaz de gerar uma resposta compensatória, se estabelece no animal a insuficiência cardíaca. Assim, nosso modelo de estudo proporciona uma hipótese de que o estabelecimento de uma fase cardíaca crônica, manifesta ou não, irá depender da cepa, sendo que a cepa determinará uma miocardite crônica ou transitória. O modelo de estabelecimento da doença de Chagas está esquematizado na figura 56. A sequência de eventos que levam ao fenótipo cardíaco observado na fase aguda, é apresentado na figura 57.



**Figura 56: Mecanismo geral para o estabelecimento da cardiopatia chagásica.**

Além disso, apresentamos um esquema, propondo uma lógica que explica do ponto de vista molecular (produção de NO e  $O_2^{*-}$  e alteração no manuseio de cálcio) as alterações macroscópicas observadas (mudanças no padrão eletrocardiográfico e alterações na morfologia e funcionamento do coração, demonstradas pela técnica de ecocardiografia)



**Figura 57** Eventos envolvidos nas alterações elétricas e mecânicas do coração na fase aguda da doença de Chagas

## **CONCLUSÕES**

- A parasitemia dos animais infectados com a cepa colombiana apresenta um caráter transitório, com elevada taxa de mortalidade aos 30 dpi.
- A produção de MCP-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  segue o decurso da parasitemia, sendo observada uma inflamação crônica aos 170 dpi.
- Os experimentos de ECG demonstram que animais infectados com a cepa colombiana com 30 dpi apresentam um prolongamento do seguimento QRS, bem como alternância de onda P e alternância de amplitude do complexo QRS.
- Na ecocardiografia foi possível constatar, nos animais infectados com a cepa colombiana, que existe uma queda no desempenho cardíaco com 15 dpi, com recobro aos 30 dpi. O recobro da função cardíaca foi acompanhada por uma hipertrofia do coração.
- Os experimentos de contratilidade celular relevaram que existe uma forte atenuação da capacidade contrátil do miócito cardíaco, com alterações nas cinéticas de ativação, tanto do ventrículo direito como do esquerdo, aos 15, 30 e 45 dpi.
- As propriedades elétricas dos miócitos isolados tanto do ventrículo direito e esquerdo foram alteradas nos animais com 15 e/ou 30 dpi infectados com a cepa colombiana. As alterações foram dependentes do tempo de infecção, sendo mais acentuadas com 30 dpi. De uma forma geral ocorreu um aumento do tempo da repolarização do potencial de ação, redução da corrente de saída transiente rápida de potássio bem como do retificador retardado, redução da corrente de cálcio do tipo L e um ligeiro aumento da corrente de potássio retificadora de entrada. A redução na corrente de cálcio do tipo L foi revertida quando o cardiomiócito, isolado de animal com 30 dpi, foi incubado com inibidor não seletivo para as óxido nítrico sintases e para as fosfoinositol-3 cinases.
- O manuseio de cálcio intracelular do cardiomiócito do ventrículo esquerdo isolado do animal com 30 dpi foi alterada. O transiente global intracelular de

cálcio não foi alterado, porém o tempo para o pico e recaptura de cálcio foram aumentados. Adicionalmente observamos uma assincronia na liberação de cálcio. O estoque intracelular de cálcio também não foi alterado no animal infectado, bem como a frequência e amplitude das *sparks* de cálcio.

- Quando comparado as propriedades elétricas do VE com e VD, dos animais infectados com a cepa colombiana, o VD apresentou alterações mais pronunciadas do que o VE
- Animais interferon- $\gamma$  *knockout* apresentaram uma alteração diferenciada na capacidade contrátil do miócito isolado com 15 e 26-28 dpi, comparando o ventrículo direito e o esquerdo. O VE não apresentou redução na capacidade contrátil, a despeito de alterações na cinética de contração e relaxamento. Já o VD apresentou uma atenuação da função contrátil, tanto com 15 e 26-28 dpi, sendo a atenuação agravada com a evolução da infecção. Da mesma forma que o VE, o VD apresentou alterações na cinética de contração e relaxamento, porém com um maior grau de gravidade.
- A produção basal de óxido nítrico é maior nos cardiomiócito do ventrículo esquerdo isolado do animal com 30 dpi.
- A infecção com a cepa Y causou uma redução transitória na função cardíaca, quando avaliado pela ecocardiografia.
- Os animais infectados com a cepa Y apresentaram uma alteração transitória das propriedades elétricas dos miócitos isolados do ventrículo esquerdo, sendo que foi observada atenuação nos 15 e 30 dpi, com recobro dos valores aos 45 dpi. Aos 15 dpi ocorreu um aumento do tempo da repolarização do potencial de ação, redução da corrente de saída transiente rápida de potássio e redução da corrente de cálcio do tipo L. Essas alterações não foram observadas com 45 dpi.
- As propriedades elétricas do miócito cardíaco do ventrículo esquerdo de animais *knockout* para a dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato oxidase do tipo 2

infectados com a cepa Y com 15 dpi, apresentaram: preservação do potencial de ação, corrente transitória rápida de potássio, e corrente de cálcio do tipo-L. Adicionalmente foi observado um aumento na corrente de potássio retificadora de entrada.

- Animais *knockdown* para o transportador de acetilcolina apresentaram um potencial de ação e corrente de cálcio do tipo-L igual ao controle. Já a resposta da corrente de cálcio do tipo-L ao isoproterenol no animal *knockdown* foi atenuada.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47, 15-22, 2009.

Alcantara, G. Experimentalle Chagas-Kardiopathie. *Parasitol*, 10, 296-303, 1959.

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*, 64, 1961-1967, 1996.

Alvarez MN, Piacenza L, Irigoín F, Peluffo G, Radi R. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 432, 222–232, 2004.

Amadou A, Nawrocki A, Best-Belpomme M, Pavoine C, Pecker F. Arachidonic acid mediates dual effect of TNF- $\alpha$  on  $Ca^{2+}$  transients and contraction of adult rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 282, C1339–C1347, 2002.

Andrade SG. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardial pathology in mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85, 17-27, 1990.

Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strain and the importance of principal clones. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (Suppl. I), 185-187, 1999.

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

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

Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmavor C, Gonzalez N, Percoco G, Borges R, Guevara R, Ramirez JL. Myocardial parasites persistence in chronic chagasic patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 726-732, 1999.

Anumonwo JMB, Lopatin NA. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 45-54, 2010.

Aprigliano O, Masuda MO, Meirelles MNL, Pereira MC, Barbosa HS, Barbosa JCN. Heart muscle cells acutely infected with *Trypanosoma cruzi*: Characterization of electrophysiology and neurotransmitter responses. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 25, 1265-1274, 1993.

Araujo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease - a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, Suplemento 1, 9-16, 2009

Barbosa HS, Meirelles MN. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Structure and Function*, 20, 275-284, 1995.

Barr SC, Han W, Andrews NW, Lopez JW, Ball BA, Pannabecker TL, Gilmour Jr RTF. A factor from *Trypanosoma cruzi* induces repetitive cytosolic free Ca<sup>2+</sup> transients in isolated primary canine cardiac myocytes. *Infection and Immunity*, 1770-1777, 1996.

Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation*, 105, 293-296, 2002.

Benitah JP, Alvarez JL, Gomez AM. L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 26-36, 2010.

Benndorf K, Nilius B. Properties of an early outward current in single cells of the mouse ventricle. *General Physiology and Biophysics*, 7, 446-466, 1988.

Benvenuti LA, Aiello VD, Palomino SA, Higuchi ML. Ventricular expression of atrial natriuretic peptide in chronic chagasic cardiomyopathy is not induced by myocarditis. *International Journal of Cardiology*, 88, 57-61, 2003.

Berecki G, Wilders R, de Jonge B, van Ginneken AC, Verkerk AO. Re-evaluation of the action potential upstroke velocity as a measure of the Na<sup>+</sup> current in cardiac myocytes at physiological conditions. *PLoS One*, 5, e15772, 2010.

Bergdolt BA, Tanowitz HB, Wittner M, Morris SA, Bilezikian JP, Moreno AP, Spray DC. *Trypanosoma cruzi*: effects of infection on receptor-mediated chronotropy and Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat cardiac myocytes. *Experimental Parasitology*, 78, 149-160, 1994.

Bers DM. Calcium cycling and signalling in cardiac myocytes. *Annual Review of Physiology*, 70, 23-49, 2008.

Bers, D. Calcium cyclin and signaling in cardiac myocytes. *Annual Review of Physiology*, 70, 23-49, 2008.

Bers, D. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415, 198-205, 2002.

Bers, D. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2 edition, Kluwer Academic Pub, 2001.

Bers, D. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37, 417-429, 2004.

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Alterations of K<sup>+</sup> current in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation Research*, 73, 379-385, 1993.

Bian Y, Sun M, Silver M, Ho KK, Marchionni MA, Caggiano AO, Stone JR, Amende I, Hampton TG, Morgan JP, Yan X. Neuregulin-1 attenuated doxorubicin-induced decrease in cardiac troponins. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 297, H1974-H1983, 2009.

Bick RJ, Wood DE, Poindexter B, Mcmillin JB, Karoly A, Wang D, Bunting R, McCann T, Law GJ, Buja LM. Cytolines increase neonatal cardiac myocyte calcium concentrations: the involvement of nitric oxide and cyclic nucleotides. *Journal of Interferon Cytokine Research*, 19, 645-653, 1999.

Bilate AMB, Salemi VM, Ramires FJ, Brito T, Russo M, Fonseca SG, Fae KC, Martins DG, Silva AM, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. TNF- $\alpha$  blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes and Infection*, 9, 1104-1113, 2007.

Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium Exchange: its physiological implications. *Physiological Review*, 79, 763-854, 1999.

Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beats goes on. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 3306-3317, 2005.

Borba ES, Sterin-Borba L. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, 54, 149-156, 1996.

Boukens BJ, Christoffels VM, Coronel R, Moorman AT. Developmental basis for electrophysiological heterogeneity in the ventricular and outflow tract myocardium as a substrate for life-threatening ventricular arrhythmias. *Circulation Research*, 104, 19-31, 2009.

Brahmajothi MV, Campbell DL, Rasmusson RL, Morales MJ, Trimmer JS, Nerbonne JM, Strauss HC. Distinct transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) phenotypes and distribution of fast inactivating potassium channel  $\alpha$  subunits in ferret left ventricular myocytes. *Journal of General Physiology*, 113 581-600, 1999.

Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 4, 389–396, 1962.

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

Brunner F, Andrew P, Wolkart G, Zechener R, Mayer B. Myocardial contractile function and heart rate in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. Circulation, 104, 3097-3102, 2001.

Bukard N, Rokita AG, Kaufmann SG, Hallhuber M, Wu R, Hu K, Hofmann U, Bonz A, Frantz S, Cartwright EJ, Neyses L, Maier LS, Maier SKG, Renne T, Schuh K, Ritter O. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. Circulation Research, 100, e32, 2007.

Camargos ER, Franco DJ, Garcia CM, Dutra AP, Teixeira Al Jr, Chiari E, Machado CR. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 62, 604-612, 2000.

Campbell DL, Stamler JS, Strauss HC. Redox Modulation of L-Type calcium channels in Ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. Journal of General Physiology, 108, 277-293, 1996.

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

Casini S, Verkerk AO, van Borren MM, van Ginneken AC, Veldkamp MW, de Bakker JM, Tan HL. Intracellular calcium modulation of voltage-gated sodium channels in ventricular myocytes. *Cardiovascular Research*, 81, 72-81, 2009.

Catterall WA. Ion Channel Voltage sensors: structure, function and pathophysiology. *Neuron*, 67, 915-928, 2010.

Cha HN, Hong GR, Kin YW, Kin JY, Dan JM, Park SY. Deficiency of iNOS does not prevent isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in mice. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 13, 153-159, 2009.

Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. TGF-beta(1) modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 281, H1035-H1039, 2001.

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

Cheng H, Lederer WJ, Canne MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 262, 740-744, 1993.

Chuenkova MV, Pereira-Perrin M. *Trypanosoma cruzi* targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy. *Science Signalling*, 2, ra74, 2009.

Condorelli G, Morisco C, Latronico MV, Claudio PP, Dent P, Tsihchlis P, Conorelli G, Frati G, Drusco A, Croce CM, Napoli C. TNF-alpha signal transduction in rat neonatal cardiac myocytes: Definition of pathways generating from the TNF-alpha receptor. *FASEB Journal* 16, 1732-1737, 2002.

Copeland SE, Ladd LA, Gu XQ, Mather LE. The effects of general anesthesia on the central nervous and cardiovascular system toxicity of local anesthetics. *Anesthesia and Analgesia*, 106, 1429-1439, 2008.

Cunha SR, Mohler PJ. Cardiac ankyrins: essential components for development and maintenance of excitable membrane domains in heart. *Cardiovascular Research*, 71, 22-29, 2006.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, Messias E, Stolf N, Bellotti G, PAtarrovo ME, Pilleggi F, Kalil J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 3541-3545, 1995.

Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalit J, Liew CC. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in chagas' Disease cardiomyopathy. *American Journal of Pathology*, 167, 305-313, 2005.

Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, 259, 1739-1742, 1993.

Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet*, 363, 1365–1367, 2004.

Das S, Babick AP, Xu YJ, Takeda N, Rodriguez-Levy D, Dhalla NS. TNF-alpha-mediated signal transduction pathway is a major determinant of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Journal of Cell and Molecular Medicine*, 14, 1988-1997, 2010.

Dawson D, Lygate CA, Zhang MH, Hulbert K, Neubauer S, Casadei B. nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation*, 112, 3729–3737, 2005.

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*, 70, 733-742, 1992.

Del Corso C, de Carvalho AC, Martino HF, Varanda WA. Sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy decrease I<sub>Ca</sub> in cardiomyocytes isolated from rabbits. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 287, H1928-1936, 2004.

Denvir MA, MacFarlane NG, Cobbe SM, Miller DJ. Sarcoplasmic reticulum and myofilament function in chemically-treated ventricular trabeculae from patients with heart failure. *Cardiovascular Research*, 30, 377-385, 1995.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called 'cruzi' complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 1-12, 2003.

Dias FA, Urboniene D, Yuzhakova MA, Biesia decki BJ, Pena JR, Goldpink PH, Geenen DL, Wolska BM. Ablation of iNOS delays cardiac contractile dysfunction in chronic hypertension. *Frontiers in Bioscience*, 1, 312-324, 2010.

dos Santos PV, Roffe E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. 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*, 3, 971-984, 2001.

Duncan DJ, Hopkins PM, Harrison SM. Negative inotropic effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are ameliorated by alfentanil in rat ventricular myocytes. *British Journal of Pharmacology*, 150, 720-726, 2007.

Egman DM, Leon JS Pathogenesis of Chagas' heart disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica*, 81, 123–132, 2002.

Eickhoff CS, Lawrence CT, Sagartz JE, Bryant LA, Labovitz AJ Gala SS, Hoft DF. ECG detection of murine chagasic cardiomyopathy. *Journal of Parasitology*, 96, 758-764, 2010.

Federici EF, Abelman WE, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis in CH3 mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 13, 272-280., 1964.

Fernandez-Culasso A, Pagline-Olivia P, Palma JA, Lacuara JL. Isometric developed tension and histopathology of myocardium of chagasic mice: part 1. *APPTLA* 41, 397–404, 1991.

Fernandez-velasco M, Ruiz-Hurtado G, Hurtado O, Moro MA, Delgado C. TNF- $\alpha$  downregulates transient outward potassium current in rat ventricular myocytes through iNOS overexpression and oxidant species generation. *American Journal of Physiology: Heart and Circulation Physiology*. 293, H238-245, 2007.

Ferron L, Capuano V, Ruchon Y, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JP. Angiotensin II signaling pathways mediate expression of cardiac T-type calcium channels. *Circulation Research*, 93, 1241-1248, 2003.

Fischmeister R, Castro L, Abi-Gerger A, Rochais F, Vandecasteele. Species- and tissue-dependent effects of NO and cyclic GMP on cardiac ion channels. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 142, 136-143, 2005.

Fisher AB. Redox Signaling across cell membrane. *Antioxidants and Redox Signalling*, 11, 1349-1356, 2009.

Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signalling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 2867, C246-C556, 2004.

Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and distribution of Ca<sup>2+</sup> release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophysical Journal*, 77, 1528-1539, 1999.

Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A, and Hoebeke J. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 1964–1968, 1993.

Fukai MU. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11, 1289-1299, 2009.

Fuster V, Alexander RW, O'Rourke R, Roberts R, King SB, Prystowsky EN, Nash I. *Hurst's the heart*, 9th edition, Hardcover, 1998.

Gao WG, Liu Y, Marban E. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation*, 94, 2597-2604, 1996.

Garcia SB, Paula JS, Giovannetti GS, Zenha F, Ramalho EM, Zucoloto S, Silva JS, Cunha FQ. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*, 93, 191-197, 1999.

Gargia-Alvarez A, Sitges M, Pnazo MJ Regueiro-Cueva A, Posda E, Poyatos S, Ortiz-Perez JT, Heraz M, Azqueta M, Gascon J, Sanz G. Chagas cardiomyopathy: the potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, 826, 2010.

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

Goldhaber JJ, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, Weiss JN. Effects of TNF-alpha on  $[Ca^{2+}]_i$  and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 271, H1449–H1455, 1996.

Gomez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannel MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*, 276, 800-806, 1997.

Gomez R, Nunez I, Vaquero M, Amoros I, Barana A, de Prata T, Macaya C, Maroto I, Rodrigues E, Caballero R, Lopez-Farre A, Tamargo J, Delpon E. Nitric oxide inhibits Kv 4.3 and human cardiac transient outward potassium current (Ito1). *Cardiovascular Research*, 80, 375-384, 2008

Gonzalez DR, Fernandez IC, Ordenes PP, Treuer AV, Eller G, Boric MP. Differential role of S-nitrosylation and the NO-cGMP-PKG pathway in cardiac contractility. *Nitric Oxide*, 18, 157-167, 2008.

Grandy AS, Trepanier-Boulay V, Fiset C. Postnatal development has a marked effect on ventricular repolarization in mice. *American Journal of Physiology: Heart and Circulation Physiology*, 293, H2168-2177, 2007

Gutierrez FRS, Guedes PMM, Gazzinelli RT, Silva JS. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*, 31, 673-685, 2009.

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

Gwathmey JK, Copelas L, Mackinnon R, Schoen FJ, Feldman MD, Grossman W, Morgan JP. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circulation Research*, 61, 70-76, 1987.

Haghighi K, Gregory KN, Kranias EG. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase-phospholamban interactions and dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 322, 1214-1222.

Hamid T, Gu Y, Ortines RV, Bhattacharya C, Wang G, Xuan YT, Pabhy D. Divergent tumor necrosis factor receptor related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kB and inflammatory activation. *Circulation*, 119, 1386-1397, 2009.

Hanft LM, Korte FS, McDonal KS. Cardiac function and modulation of sarcomeric function by length. *Cardiovascular Research* 77, 627-636, 2008.

Hang H, Chang J, Wittner M, Jelicks LA, Morris SA, Factor SM, Weiss LM, Braunstein VI, Bacchi CJ, Yarlett N, Chandra M, Shirani J, Tanowitz HB. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 31, 75-88, 1999.

Hansefuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*, 99, 641-648, 1999.

Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, Mann DL. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 2692-2701, 2007.

Hawkins BJ, Madesh M, Kirkpatrick CJ, Fisher AB. Superoxide flux in endothelial cells via the chloride channel-3 mediates intracellular signaling. *Molecular Biology of the Cell* 18, 202-212, 2007.

He X, Liu, Y, Sharma V, Dirksen RT, Waugh R, Sheu SS, Min. ASK1 associates with troponin T and induces troponin T phosphorylation and contractile dysfunction in cardiomyocytes. *American Journal of Pathology*, 163, 243-251, 2003.

Heineke J, Kempf T, Kraft T, Hilfiker A, Morawietz H, Scheubel RJ, Caroni P, Lohmann SM, Drexler H, Wollert KC. Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide. Impact on cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation*, 107, 1424-1432, 2003.

Heineke J, Molketin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 589-600, 2006.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 150-166, 2005.

Higuchi Y, Chan TO, Brown MA, Zhang J, DeGeorge BR, Funakoshi H, Gibson G, Mctierman CF, Toru K, Jones WK, Feldman AM. Cardioprotection afforded by NF-kB ablation is associated with activation of Akt in mice overexpressing TNF- $\alpha$ . *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, H590-H598, 2006.

Hille B. *Ionic channel of excitable membranes*. 3 ed, university of Washington, 2001.

Hiraoka E, Kawashima S, Takahashi T, Rikitake Y, Kitamura T, Ogawa W, Yokoyama M. TNF- $\alpha$  induces protein synthesis through PI3-kinase-akt/PKB pathway in cardiac myocytes. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 280, H1861-H1868, 2001.

Howard M, Mchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *Journal of Experimental Medicine*, 177, 1205-1208, 1993.

Ito H, Miller SC, Billingham ME, Akimoto H, Torti SV, Wade R, Gahlmann R, Lyons G, Kedes L, Torti FM. Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4275-4279, 1990.

Janczewski AM, Kadokami T, Lemster B, Frye CS, Mctiernan CF, Feldman AM. Morphological and functional changes in cardiac myocyte isolated from mice overexpressing TNF- $\alpha$ . *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 284, H960-H969, 2003.

Jansses S, Pokreisz P, Schoonjans L, Pellens M, Vermeersch P, Tjwa M. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation Research*, 94, 1256-62, 2004.

Jobe LJ, Melendez GC, Levick SP, Du Y, Brower GL, Janicki JS. TNF- $\alpha$  inhibition attenuates adverse myocardial remodeling in a rat model of volume overload. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 297, H1462-H1468, 2009.

Katz AM. *Physiology of the heart*. 2th edition, Raven Press, 1992.

Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*, 104, 569-580, 2001.

Knollmann BC, Knollmann-Ritschel BE, Weissman NJ, Jones LR, Morad M. Remodelling of ionic current in hypertrophied and failing heart of transgenic mice overexpressing calsequestrin. *Journal of Physiology*, 525, 483-498, 2000.

Kobayashi T, Jin L, Tombe PP. Cardiac thin filament regulation. *Pflugers Arch*, 457, 37-46, 2008.

Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, Gordillo G, Klenotic S, Orosz C, Parker-Thornburg J. Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. *American Journal of Pathology*, 152, 101-111, 1998.

Kontogeorgis A, Li X, Kang EY, Feig JE, Ponzio M, Kang G, Kaba RA, Wit AL, Fisher EA, Morley GE, Peters NS, Coetzee WA, Gutstein DE. Decreased connexin43 expression in the mouse heart potentiates pacing induced remodeling of repolarizing currents. *American Journal of Physiology: Heart and Cellular Physiology*, 295, H1905-H1916, 2008.

Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> current and Ca<sup>2+</sup> transients. *FEBS Letters*, 376, 24–30, 1995.

Kubota T, McTieman CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster Bh, Koretsky AP, Demetrius AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circulation Research*, 81, 627-635, 1997.

Kumar R, Kline IK, Abelmann WH. Experimental *Trypanosoma cruzi* myocarditis: relative effects upon the right and left ventricles. *American Journal of Pathology*, 57 (1), 31-48, 1969.

Kuo HC, Chng CF, Clark RB, Lin JJC, Lin JLC, Hoshijima M, Nguyen-Tran VTB, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of Ito and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell*, 107, 801-813, 2001.

Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FAF, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Jhanewise J, Solomon S, Spencer KT, Sutton MSTJ, Stewart W. Recommendations for chamber quantification. *European Journal of Echocardiography*, 7, 79-108, 2006.

Lara A, Damasceno DD, Pires R, Gros R, Gomes ER, Gavioli M, Lima RF, Guimarães D, Lima P, Bueno CR Jr, Vasconcelos A, Roman-Campos D, Menezes CA, Sirvente RA, Salemi VM, Mady C, Caron MG, Ferreira AJ, Brum PC, Resende RR, Cruz JS, Gomez MV, Prado VF, de Almeida AP, Prado MA, Guatimosim S. Dysautonomia due

to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. *Molecular and Cell Biology*, 30, 1746-1756, 2010.

Laucella S, Salcedo R, Castanos-Velez E, Riarte A, De titto EH, Patarrovo M, Orn A, Rottenberg ME. Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*, 18, 227-239, 1996.

Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers L, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinase (Akt and extracellular signal regulated kinase). *Circulation*, 112, 3911-3918, 2005.

Letari O, Nicosia S, Chiavaroli C, Vacher P, Schlegel W. 1991. Activation by bacterial lipopolysaccharide causes changes in the cytosolic free calcium concentration in single peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*, 147, 980–983, 1991.

Li J, Mclerie M, Lopatin NA. Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *American Journal of Physiology: Heart and Circulation Physiology*, 287, H2790-H2802, 2004.

Lips DJ, De Windt LJ, van Kraaij JW, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *European Heart Journal*, 24, 883– 96, 2003.

Liu YH, Carretero OA, Cingolani OH, Liao TD, Sun Y, Xu J, Li LY, Pagano PJ, Yang JJ, Yang XP. Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction. *American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 289, H2616-23, 2005.

Lopatin AN e Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: An update on IK1. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33, 625-638, 2001.

Lopatin NA, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature*, 372, 366-369, 1994.

Louch WE, Mark HK, Sexton J, Stromme TA, Laake P, Sjaastad I, Sejersted OM. T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca<sup>2+</sup> release in murine cardiomyocyte following myocardial infarction. *Journal of Physiology*, 574, 519-533, 2006.

Lowe JS, Palygin O, Bhasin N, Hund TJ, Hund TJ, Boyden PA, Shibata E, Anderson ME, Mohler PJ. Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-g-dependent cellular pathway. *Journal of Cell Biology*, 180, 173-186, 2008.

Macao LB, Wilhelm-Filho D, Pedrosa RC, Pereira A, Backes P, Torres MA, Frode TS. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. *International Journal of Cardiology*, 123, 43-49, 2007.

Machado CRS, Gomez MV, Machado ABM. Changes in choline cetyltransferase activity of rat tissue during Chagas' disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 20, 697-702, 1987.

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

Machado CRS, Caliar MV, Lana M, Tafuri Wl. Heart autonomic innervation during the acute phase of experimental american tripanosomiasis in the dog. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 492-496, 1998.

Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, 102, 3003-3008, 2000.

Magnusson Y, Marullo S, Hoyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahlne A, Guillet JG, Strosberg AD, Hjalmarson A, and Hoebeke J. Mapping of a functional autoimmune epitope on the beta 1-adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 86, 1658–1663, 1990.

Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand J-L. Nitric oxide and cardiac function: ten years after and continuing. *Circulation Research*, 93, 388-98, 2003.

Matta JR, Camargos ERS, Chiari E, Machado CRS. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction of parasitism. *Brain Research Bulletin*, 53, 153-162, 2000.

McCall E, Ginsburg KS, Bassani RA, Shannon TR, Qi M, Samarel AM, Bers DM. Ca flux, contractility, and excitation-contraction coupling in hypertrophic rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology*, 274, H1348-H1360, 1998.

McLerie M, Lopatin A. Dominant-negative suppression of  $I_{K1}$  in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35, 367-378, 2003.

Meadowns LS, Isom LL. Sodium channels as macromolecular complexes: Implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovascular Research*, 67, 448-458, 2005.

Melo RCN, Machado CRS. Depletion of radiosensitive leukocytes exacerbates the heart sympathetic denervation and parasitism in experimental Chagas' disease in rats. *Journal of Neuroimmunology*, 84, 151-157, 1998.

Mewes T, Ravens U. L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26, 1307-1320, 1994.

Miake J, Marban E, Nuss B. Functional role of inward rectifier current in heart probe by Kir 2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1529-1536, 2003.

Ming M, Ewen ME, Pereira ME. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF-beta signaling pathway. *Cell*, 82, 287-296, 1995.

Ming Z, Nordin C, Sri F, Aronson RS. Reduced calcium current density in single myocytes isolated from hypertrophied failing guinea pig hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26, 1133-1143, 1994.

Moffa PJ, Sanches PCS. *Eletrocardiograma: normal e patológico*. Editora Roca, 2001.

Moreno SN, Silva J, Vercesi AE, Docampos R. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. Moreno SN, Silva J, Vercesi AE, Docampos R. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 1535-1540, 1994.

Morimoto S. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiovascular Research*, 77, 659-666, 2008.

Morris AS, Tanowitz H, Factor SM, Bilezikian JP, Wittner M. Myocardial adenylate cyclase activity in acute murine Chagas' disease. *Circulation Research*, 62, 800-810, 1988.

Morris SA, Tanowitz H, Hatcher V, Bilezikian JP, Wittner M. Alterations in intracellular calcium following infection of human endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 29, 213-221, 1988.

Morris SA, Tanowitz H, Makman M, Hatcher VB, Bilezikian JP, Wittner M. *Trypanosoma cruzi*: alteration of cAMP metabolism following infection of human endothelial cells. *Experimental Parasitology* 74(1), 69-76, 1992.

Mukherjee R, Hewett KW, Walker JD, Basler CG, Spinale FG. Changes in L-type calcium channel abundance and function during the transition to pacing-induced congestive heart failure. *Cardiovascular Research*, 37, 432-444, 1998.

Nakayama H, Bodi I, Correll Rn, Chen X, Lorenz J, Houser SR, Robbins J, Schwartz A, Molkentin JD. Alpha1G-dependent T-type Ca<sup>2+</sup> current antagonizes cardiac hypertrophy through a NOS3-dependent mechanism in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119, 3787-3796, 2009.

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

Nishio M, Habuchi Y, Tanaka H, Morikawa J, Okanoué T, Kashima K. Tyrosine kinase-dependent modulation by interferon-alpha of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in rabbit ventricular myocytes. *FEBS letters*, 445, 87-91, 1999.

Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) expression and regulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 12-25, 2010.

Norenberg W, Gebicke-Haerter PJ, Illes P. Inflammatory stimuli induce a new K<sup>+</sup> outward current in cultured rat microglia. *Neuroscience Letters*, 147, 171-174, 1992.

Oliveria AC, de Alencar BC, Tzelpis F, Klezewsky W, da Silva RN Never FS, Cavalcanti GS, Boscardin S, Nunes MP, Santiago MF, Nobrega A, Rodrigues MM, Bellio M. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8<sup>+</sup>T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathology*, 6, e1000870, 2010.

Owczuk R, Wujtewicz MA, Sawuica W, Polak-Krzeminska A, Suszynska-Mosiewics A, Racznska K, Wuitewicz M. Effect of anaesthetic agents on p-wave dispersion on the electrocardiogram: comparison of propofol and desflurane. *Clinical and Experimental Pharmacological Physiology*, 35, 1071-1076, 2008.

Pacioretty LM, Barr SC, Han WP, Gilmour RF Jr. Reduction of the transient outward potassium current in a canine model of Chagas' disease. *The American Journal of Physiology*, 268, H1258-1264, 1995.

Percoco G, Borges R, Guevara P, Ramirez JS. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 726-732, 1999.

Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT. Calmodulin is the Ca<sub>v</sub>2.1 sensor for Ca<sub>v</sub>2.1-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron*, 22, 549–558, 1999.

Peterson BZ, Lee JS, Mulle JG, Wng Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within and EF-hand motif of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biophysical Journal* 78, 1906-1920, 2000.

Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *American Journal of Physiology*, 93, C1073-1081, 2007.

Pittella JEH. Central nervous system involvement in Chagas' disease. An updating. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35, 111-116, 1993.

Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinauer MC. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, and inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nature Genetics*, 9, 202-209, 1995.

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*, 80, 50-55, 1986.

Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim HG, Rossato JI, Koenen J, Quan H, Cota VR, Moraes MF, Gomes MV, Guatimosim C, Wetsel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo I, Caron MG, Prado MA. Mice deficient for vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* 51, 601-612, 2006.

Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, Barletta MR, Gudapakkan S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circulation Research*, 96, 800-8006, 2005.

Reddy VS, Harskamp RE, vanGinkel MW, Calhoon J, Baisden CE, Kim IS, Valente AJ, Chandrasekar B. Interleukin-18 stimulates fibronectin expression in primary human cardiac fibroblast via PI3K-akt-dependent NF-kappaB activation. *Journal of Cell Physiology*, 215, 697-707, 2008.

Reppel M, Fleischmann BK, Reuter H, Pillekamp F, Schunkert H, Hescheler R. Regulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchange Current in the Normal and Failing Heart. *Annual Review of New York Academy of Science*, 1099, 361–372, 2007.

Ribeiro-dos-Santos R, Hudson L. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clinical and Experimental Immunology*, 44, 349-354, 1981.

Rimoldi MT, Sher A, Hieny S, Lituchy A, Hammer CH, Joiner K. Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 193-197, 1988.

Rodriguez A, Rioult MG, Ora A, Andrews NW. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *Journal of Cell Biology*, 129, 1263-1273, 1995.

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*, 84, 817-824, 2009.

Roman-Campos D, Duarte HL, Gomes ER, Castro CH, Guatimosim S, Natali AJ, Almeida AP, Pesquero JB, Pesquero JL, Cruz JS. Investigation of cardiomyocyte dysfunction in bradykinin type 2 receptor knockout mice. *Life Science*, 87, 715-728, 2010.

Roman-Campos D, Duarte HL, Sales PA JR, Natali AJ, Ropert C, Gazzinelli RT, Cruz JS. Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Basic Research in Cardiology*, 104, 238-246, 2009.

Rota M, Hosoda T, De Angelis A, Arcarese ML, Esposito G, Rizzi R, Tillmanns J, Tugal D, Musso E, Rimoldi O, Bearzi C, Urbanek K, Anversa P, Leri A, Kajstura J. The Young mouse heart is composed of myocytes heterogeneous in age and function. *Circulation Research*, 101, 387-399, 2007.

Sakmann BFAS, Spindler AJ, Bryant SM, Linz KW, Noble D. Distribution of a persistent sodium current across the ventricular wall in guinea pig. *Circulation Research*, 87, 910-914, 2000.

Scanavacca M, Sosa E. Estudo eletrofisiológico na cardiopatia chagásica crônica. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, 4, 168-176, 1994.

Schaub MC, Hefti MA, Zuellig RA, Morano I. Modulation of contractility in human hypertrophy by myosin essential light isoforms. *Cardiovascular Research*, 37, 381-404, 1998.

Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*, 104, 1286-91, 2001.

Seabra V, Stachlewitz RF, Thurman RG. Taurine blunts LPS-induced increases in intracellular calcium and TNF- $\alpha$  production by Kupffer cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 64, 615–621, 1998.

Selvetella G, Lembo G. Mechanisms of Cardiac Hypertrophy. *Heart Failure Clinical*, 1, 263 – 273, 2005.

Song LS, Pi Y, Kim SJ, Yatani A, Guatimosim S, Kudei RK, Zhang Q, Cheng H, Hittinger L, Ghaleh B, VAtner DE, Lederer WJ, Vattner SF. Paradoxical cellular Ca<sup>2+</sup> signaling in severe but compensated canine left ventricular hypertrophy. *Circulation Research*, 97, 457-464, 2005.

Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho, Cunha FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunctions in sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care in Medicine*, 2010, ahead of print.

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*, 91, 217-224, 1996.

Souza MM, Andrade SG, Barbosa Jr AA, santos RTM, Alves VAF, Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* strains and antonomic nervous stem pathology in experimental Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91, 217-224, 1996.

Stern MD, Pizarro G, Rios E. Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Journal of General Physiology*, 110, 415-440, 1997.

Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR, Kim YM, Salama G. Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium*, 21, 19–29, 1997.

Sun X, Delbridge LM, Dusting GJ. Cardiodepressant effects of interferon-gamma and endotoxin reversed by inhibition of NO synthase 2 in rat myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30, 989-897, 1998.

Sun Y, Carretero OA, Xu J, Rhaleb NE, Yang JJ, Pagano PJ, Yang XP. Deletion of inducible nitric oxide synthase provides cardioprotection in mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension*, 53, 49-56, 2009.

Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Delpon E. Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide. *Cardiovascular Research*, 87, 593-600, 2010.

Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> transients. *Journal of Experimental Medicine*, 179 (3), 1017-1022, 1994.

Tarone G, Lembo G. Molecular interplay between mechanical and humoral signaling in cardiac hypertrophy. *Trends in Molecular Medicine*, 9, 376– 82, 2003.

Terracciano CM, Hardy J, Birks EJ, Khaghani A, Banner NR, Yacoub MH. Clinical recovery from end-stage heart failure using left-ventricular assist device and pharmacological therapy correlates with increased sarcoplasmic reticulum calcium content but not with regression of cellular hypertrophy. *Circulation*, 109, 2263-2265, 2004

Thielmann M, Dorge H, Martin C, Belosjorow S, Schwanke U, de Sand AV, Konietzka I, Buchert A, Kruger A, Schulz R, Heusch G. Myocardial dysfunction with coronary microembolization. *Circulation Research* 90, 807–813, 2002.

Todorov AG, Einicker-Lamas M, Castro SL, Oliveira MM, Guilherme A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Biochemistry*, 275, 32182-32186, 2000.

Tsuji Y, Opthof T, Kamiya K, Yasui K, Liu W, Lu Z, Kodama I. Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle. *Cardiovascular Research*, 48, 300-309, 2000.

Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, Simmons WW, Okada I, Kobzik L, Lowenstein CJ, Kunkel SL, Michel T, Kelly RA, Smith TW. Induction of nitric oxide synthase activity by cytokines in ventricular myocytes is necessary but not sufficient to decrease contractile responsiveness to beta-adrenergic agonist. *Circulation Research*, 77, 494-502, 1995.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, Reis DA, Macedo AM, Adad SJ, Tostes S, Moreira MCV, Filho GB, Pena SDJ. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* from tissues of patients with chronic Chagas disease. *American Journal of Pathology*, 156, 1805-1809, 2000.

Vanderheyden M, Mullens W, Delrue L, Goethals M, Bruyne B, Wijns W, Geelen P, Verstreken S, Wellens F, Bartunek J. Myocardial gene expression in heart failure patients treated with cardiac resynchronization therapy: Responders versus nonresponders. *Journal of American College of Cardiology*, 51, 129-136, 2008.

Visentin S, Agresti C, Patrizio M, Levi G. Ion channel in rat microglia and their different sensitivity to lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Journal of Neuroscience Research*, 42, 439-451, 1995.

Vyatkina G, Bhatia V, Gerstner A, Papaconstantinou J, Garg N. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1689, 162-173, 2004.

Waghbi MC, Coutinho-Silva R, Feige JJ, Higuch ML, Becker D, Bursnstock G, Araujo-Jorge TC. Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor – b treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1083-1090, 2009.

Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveria GM, Keramidas M, Feige JJ Araujo-Jorge TC, Bailly S. Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signalling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 53, 4694-4701, 2009.

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

Willians IA, Allen DG. The role of reactive oxygen species in the heart of dystrophin-deficient mdx mice. *American Journal Physiology: Heart and Circulation Physiology*, 293, H1969-H1977, 2007.

World Health Organization (OMS). Factsheet on Chagas disease, 2010.

Yang L, Liu G, Zakharov SI, Bellinger AM, Mongillo M, Marx SO. Protein Kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha 1C and beta2 subunits. *Circulation Research*, 101, 465-474, 2007.

Zahradnikova A, Minarovic I, Venema RC, Meszaros LG. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *Cell Calcium*, 22, 447-454, 1997.

Zalk RZ, Lehnart SE, Marks AR. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 367-385, 2007.

Zhang L, Benson DW, Tristani-Firouzi M, Ptacek LJ, Tawil R, Schartz PJ, George AL, Horie M, Andelfinger G, Snow GL, Fu YH, Ackerman MJ, Vicent M. Electrocardiographic features in Andersen-Tawil Syndrome patients with KCNJ2 mutations: Characteristic T-U-wave better predict the KCNJ2 genotype. *Circulation*, 111, 2720-2726, 2005.

Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: Lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *European Journal of Immunology*, 26, 102-109, 1996.

Zhang P, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y. Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Circulation Research*, 100, 1089-98, 2007.

Zhang P, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y. Inducible nitric oxide synthases deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Circulation Research*, 100, 1089-1098, 2007.

Zhang T, Feng Q. Nitric oxide and calcium signaling regulate myocardial tumor necrosis factor- $\alpha$  expression and cardiac function in sepsis. *Can J Physiol Pharmacol*, 88, 92-104, 2010.

Zheng M, Wang Y, Kang L, Shimaoka T, Mami F, Ono K. Intracellular  $Ca^{2+}$ - and PKC- dependent upregulation of T-type  $Ca^{2+}$  channels in LPC-stimulated cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, 131-139, 2010.

Zhou C, Ziegler C, Birder LA, Stewart AF, Levitan ES. Angiotensin II and stretch activate NADPH oxidase to destabilize cardiac Kv 4.3 channel mRNA. *Circulation Research*, 98, 1040-1047, 2006.

Zimer T, Surber R. SCN5A channelopathies – an update on mutations and mechanisms. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 98, 120-136, 2008.

Zipes DP, Libby P, Bonow RO. Braunwald – Tratado de doenças cardiovasculares, Editora Elsevier, 2006, vol 1 e 2.



## **ANEXOS**

## **Anexo 1 - Tabelas**

**Tabela 1:** Parâmetros de máxima taxa de contração da célula cardíaca

	<b>Máxima taxa de contração (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>			
	<b>CT</b>	<b>15 dpi</b>	<b>30 dpi</b>	<b>45 dpi</b>
VD	114,8 $\pm$ 14,8 (23)	61,7 $\pm$ 8,4 (30)*	69,1 $\pm$ 4,8 (47)**	69,7 $\pm$ 5,1 (31)***
VE	112,6 $\pm$ 12,7 (28)	53,7 $\pm$ 5,1 (32)*	77,1 $\pm$ 4,5 (50)**	66,3 $\pm$ 5,7 (41)***

\*, \*\*, \*\*\* comparando CTR (VE ou VD) com e CTR 15, 30 e 45 dpi \*, \*\*, \*\*\*  
 $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 2:** Parâmetros de máxima taxa de relaxamento da célula cardíaca

	<b>Máxima taxa de relaxamento (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>			
	<b>CT</b>	<b>15 dpi</b>	<b>30 dpi</b>	<b>45 dpi</b>
VD	99,5 $\pm$ 10,7	49,7 $\pm$ 7,6*	63,1 $\pm$ 4,8**	51,9 $\pm$ 4,9***
VE	130,4 $\pm$ 18,1	44,5 $\pm$ 4,3*	73,5 $\pm$ 4,5**	53,9 $\pm$ 5,2***

\*, \*\*, \*\*\* comparando CTR (VE ou VD) com e CTR 15, 30 e 45 dpi \*, \*\*, \*\*\*  
 $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 3:** Parâmetros do potencial de ação do ventrículo esquerdo da cepa colombiana

<b>Parâmetros PA</b>		
	<b>Overshoot (mV)</b>	<b>DV/DT (mV/ms)</b>
CTR VE	52,1 $\pm$ 1,2	267,1 $\pm$ 13,8
CTR 15 dpi VE	50,7 $\pm$ 2,2	212,8 $\pm$ 15,8
CTR 30 dpi VE	48,7 $\pm$ 2,9	183,1 $\pm$ 18,1*

\* comparando CTR VE com CTR VE 30 dpi, \* $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 4:** Parâmetros do potencial de ação do ventrículo direito da cepa colombiana

<b>Parâmetros PA</b>		
	<b>Overshoot (mV)</b>	<b>DV/DT (mV/ms)</b>
CTR VD	49,2 $\pm$ 1,5	238,1 $\pm$ 14,6
CTR 30 dpi VD	55,2 $\pm$ 2,2*	225,9 $\pm$ 17,2

\* comparando CTR VD com CTR VD 30 dpi, \* $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 5:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{to}$  no ventrículo esquerdo da cepa colombiana

$I_K$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR VE	28,6 ± 3,6	-6,8 ± 6,3
CTR VE 15 dpi	17,7 ± 2,7	0,3 ± 2,9*
CTR VE 30 dpi	17,53 ± 2,2	3,7 ± 4,2**

\* comparando CTR VE com CTR VE 15 dpi, \*\* comparando CTR VE com CTR VE 30 dpi, \*, \*\*  $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 6:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{to}$  no ventrículo direito da cepa colombiana

$I_K$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR VD	17,9 ± 1,1	-0,2 ± 3,5
CTR VD 30 dpi	17,1 ± 1,8	11,5 ± 2,9*

\* comparando CTR VD com CTR VD 30 dpi, \*  $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 7:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{Ca(L)}$  no ventrículo esquerdo da cepa colombiana

$I_{Ca(L)}$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR VE	3,7 ± 0,3	-11,8 ± 0,9
CTR VE 15 dpi	3,7 ± 0,4	-14,2 ± 1,2
CTR VE 30 dpi	5,3 ± 0,2*	-8,9 ± 0,6*

\* comparando CTR VE com CTR VE 15 dpi, \*\* comparando CTR VE com CTR VE 30 dpi, \*  $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 8:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{Ca(L)}$  no ventrículo direito da cepa colombiana

$I_{Ca(L)}$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR VD	5,4 ± 0,2	-5,1 ± 0,9
CTR VD 15 dpi	5,8 ± 0,6	-6,8 ± 0,9
CTR VD 30 dpi	6,3 ± 0,3	-5,2 ± 0,6

**Tabela 9:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{Ca(L)}$  no ventrículo esquerdo da cepa colombiana via óxido nítrico/PI3Kinase

$I_{Ca(L)}$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR + LNMMA	4,80 ± 0,2	-8,1 ± 0,4
CTR + LY	5,7 ± 0,4	-8,1 ± 0,9
30 dpi + LNMMA	5,7 ± 0,3	-6,3 ± 0,7
30 dpi + LY	6,9 ± 0,7	-4,8 ± 0,5
30 dpi	5,1 ± 0,3	-7,6 ± 0,5

**Tabela 10:** Parâmetros do potencial de ação do ventrículo esquerdo da cepa Y

Parâmetros PA		
	Overshoot (mV)	DV/DT (mV/ms)
CTR	53,7 ± 1,5	218,2 ± 10,2
CTR 15 dpi	49,9 ± 0,9	189,5 ± 4,7
CTR 30 dpi	53,1 ± 2,3	198,4 ± 7,2
CTR 55 dpi	51,3 ± 1,3	246,7 ± 10,4

**Tabela 11:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{to}$  no ventrículo direito da cepa Y

$I_K$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR	18,9 ± 2,4	-14,9 ± 4,5
CTR 15 dpi	16,4 ± 1,5	-0,3 ± 1,7*
CTR 30 dpi	19,9 ± 3,2	4,9 ± 3,8**
CTR 45 dpi	31,4 ± 2,9***	21,7 ± 4,1***

\* comparando CTR e CTR 15 dpi, \*\* comparando CTR e 30 dpi, \*\*\* comparando CTR e 45 dpi, \*, \*\*, \*\*\*  $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 12:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{Ca(L)}$  no ventrículo esquerdo da cepa Y

$I_{Ca(L)}$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR	5,3 ± 0,3	-9,2 ± 0,5
CTR 15 dpi	5,8 ± 0,2	-7,9 ± 0,4
CTR 30 dpi	5,7 ± 0,2	-7,7 ± 0,9
CTR 45 dpi	5,2 ± 0,3	-9,7 ± 0,7

**Tabela 13:** Parâmetros do potencial de ação do ventrículo esquerdo da cepa Y- $PHOX^{-/-}$

Parâmetros PA		
	Overshoot (mV)	DV/DT (mV/ms)
CTR	51,6 ± 1,2	222,1 ± 8,8
CTR 15 dpi	50,3 ± 0,9	201,3 ± 6,4*
$PHOX^{-/-}$	50,9 ± 1,6	201,3 ± 7,5
$PHOX^{-/-}$ 15 dpi	50,3 ± 0,9	262,7 ± 8,3*

\* comparando CTR 15 dpi e  $PHOX^{-/-}$  15 dpi, \*\* comparando  $PHOX^{-/-}$  e  $PHOX^{-/-}$  15 dpi, \*,\*\* p<0,05 para one-way anova.

**Tabela 14:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{to}$  no ventrículo esquerdo da cepa Y -  $PHOX^{-/-}$

$I_k$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR	-10,4 ± 2,7	16,9 ± 2,2
CTR 15 dpi	-0,9 ± 1,6*	17,6 ± 1,1
$PHOX^{-/-}$	-4,2 ± 1,9	17,9 ± 1,3
$PHOX^{-/-}$ 15 dpi	2,7 ± 1,8	17,9 ± 1,5

\* comparando CTR e CTR 15 dpi, \* p<0,05 para one-way anova.

**Tabela 15:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{Ca(L)}$  no ventrículo esquerdo da cepa Y -  $PHOX^{-/-}$

$I_{Ca(L)}$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR	5,2 ± 0,2	-9,2 ± 0,5
CTR 15 dpi	5,5 ± 0,3	-9,5 ± 0,9
$PHOX^{-/-}$	4,5 ± 0,2	-9,4 ± 0,6
$PHOX^{-/-}$ 15 dpi	5,6 ± 0,4*	-9,6 ± 0,5

\* comparando  $PHOX^{-/-}$  e  $PHOX^{-/-}$  15 dpi, \* p<0,05 para one-way anova.

**Tabela 16:** Parâmetros do potencial de ação do ventrículo esquerdo -  $VACHT^{KD}$

Parâmetros PA		
	Overshoot (mV)	DV/DT (mV/ms)
CTR	53,9 ± 1,4	281,4 ± 12,7
$VACHT^{KD}$	48,9 ± 1,8*	247,3 ± 14,6

\* comparando CTR e  $VACHT^{KD}$ ; \* p<0,05 para Test T de student

**Tabela 17:** Parâmetros médios para ativação da  $I_{Ca(L)}$  no ventrículo esquerdo - VACHT<sup>KD</sup>

$I_{Ca(L)}$		
	Slope factor (mV)	Vmeio (mV)
CTR	$5,3 \pm 0,2$	$-11,3 \pm 0,5$
CTR + ISO	$4,9 \pm 0,3$	$-19,5 \pm 1,3^*$
VACHT <sup>KD</sup>	$5,1 \pm 0,2$	$-10,3 \pm 0,7$
VACHT <sup>KD</sup> + ISO	$4,4 \pm 0,4$	$-16,7 \pm 1,4^{**}$

\* comparando CTR e CTR + ISO; \*\* comparando VACHT<sup>KD</sup> e VACHT<sup>KD</sup> + ISO;  
\*, \*\*  $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 18:** Potencial de repouso para cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de animais infectados com a cepa colombiana.

	PR (mV)
CTR	$-65,9 \pm 0,76$
CTR + ISO	$-68,8 \pm 0,38^*$
VACHT <sup>KD</sup>	$-68,5 \pm 0,51^*$

PR, potencial de repouso, \*,  $p < 0,05$  para one-way anova.

**Tabela 19:** Capacitância celular

CEPA	Grupo	Capacitância (pF)
Colombiana		
	CT VD	130,9±5,9 (29)
	CT VE	169,3±5,9 (44)
	15 dpi VD	144,5±15,1(10)
	30 dpi VD	120,9±6,2(31)
	15 dpi VE	150,3±9,1(26)
	30 dpi VE	148,5±5,4(53)
Cepa Y		
	CT	140,3±6,1 (36)
	15 dpi	124,2±5,5 (40)
	30 dpi	115,1±5,8 (21)
	45 dpi	126,3±6,1(27)
Cepa Y PHOX <sup>-/-</sup>		
	CT	145,6±4,5 (48)
	CT 15 dpi	139,5±6,1 (48)
	PHOX <sup>-/-</sup>	157,5±5,2 (50)
	PHOX <sup>-/-</sup> 15 dpi	142,5±4,7 (35)
VACHT <sup>KD</sup>		
	CT	150,1±9,9 (20)
	VACHT <sup>KD</sup>	160,5±12,6(14)

## **Anexo 2 – Figuras adicionais**

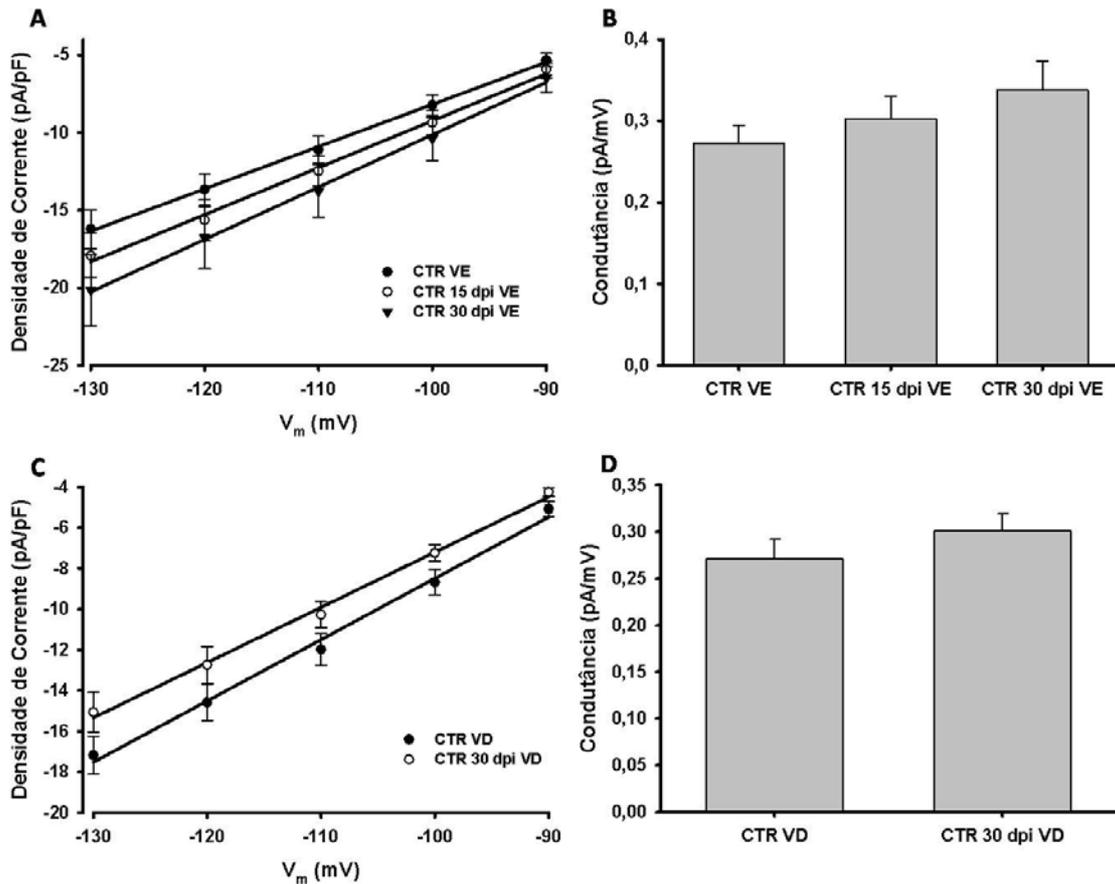


Figura 1. Curva de condutância para corrente de potássio retificadora de entrada ( $I_{K1}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e direito - CEPA Colombiana. Os círculos e barras representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 6. (A) e (C) representam a regressão linear obtida de acordo com a equação 6 para o ventrículo esquerdo e direito respectivamente. (B) e (D) são os coeficientes angulares obtidos segundo a equação 6, para a regressão linear apresentada em (A) e (C), respectivamente. Cardiomiócito controle ventricular direito e esquerdo (CTR VD n=17 e CTR VE n=12), cardiomiócito infectado do ventrículo esquerdo e direito a 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 (n=8) e 30 (n=15) dpi VE; CTR 30 (n=15) dpi VD).

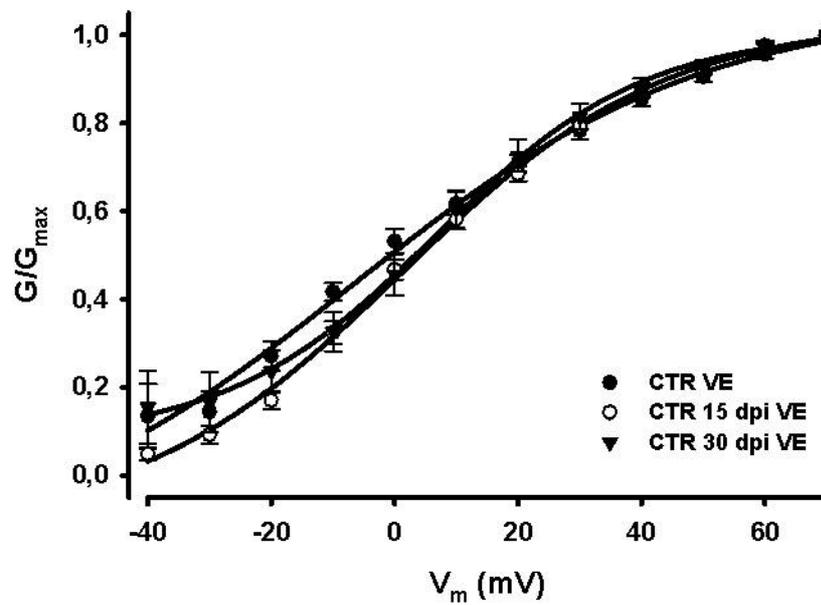


Figura 2. Dependência de voltagem para ativação da corrente de transiente rápida de potássio ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Colombiana. Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 5. Cardiomiócito controle ventricular esquerdo (CTR VE  $n=15$ ), cardiomiócito infectado do ventrículo esquerdo aos 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 ( $n=10$ ) e 30 ( $n=13$ ) dpi VE).

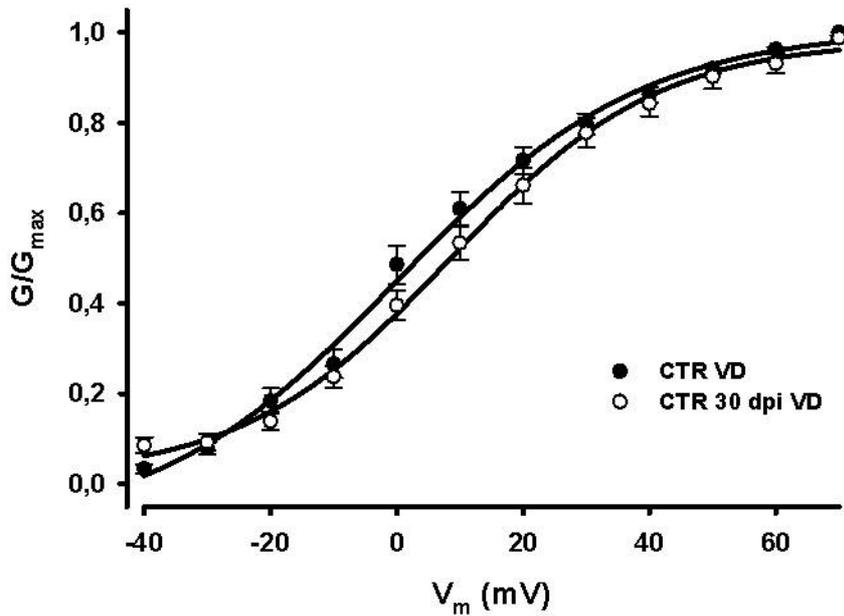


Figura 3. **Dependência de voltagem para ativação da corrente de transiente rápida de potássio ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo direito - CEPA Colombiana.** (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo a equação 5. Cardiomiócito controle ventricular direito (CTR VD n=17), cardiomiócito infectado do ventrículo direito aos 30 dias pós-infecção (CTR 30 dpi VD n=15).

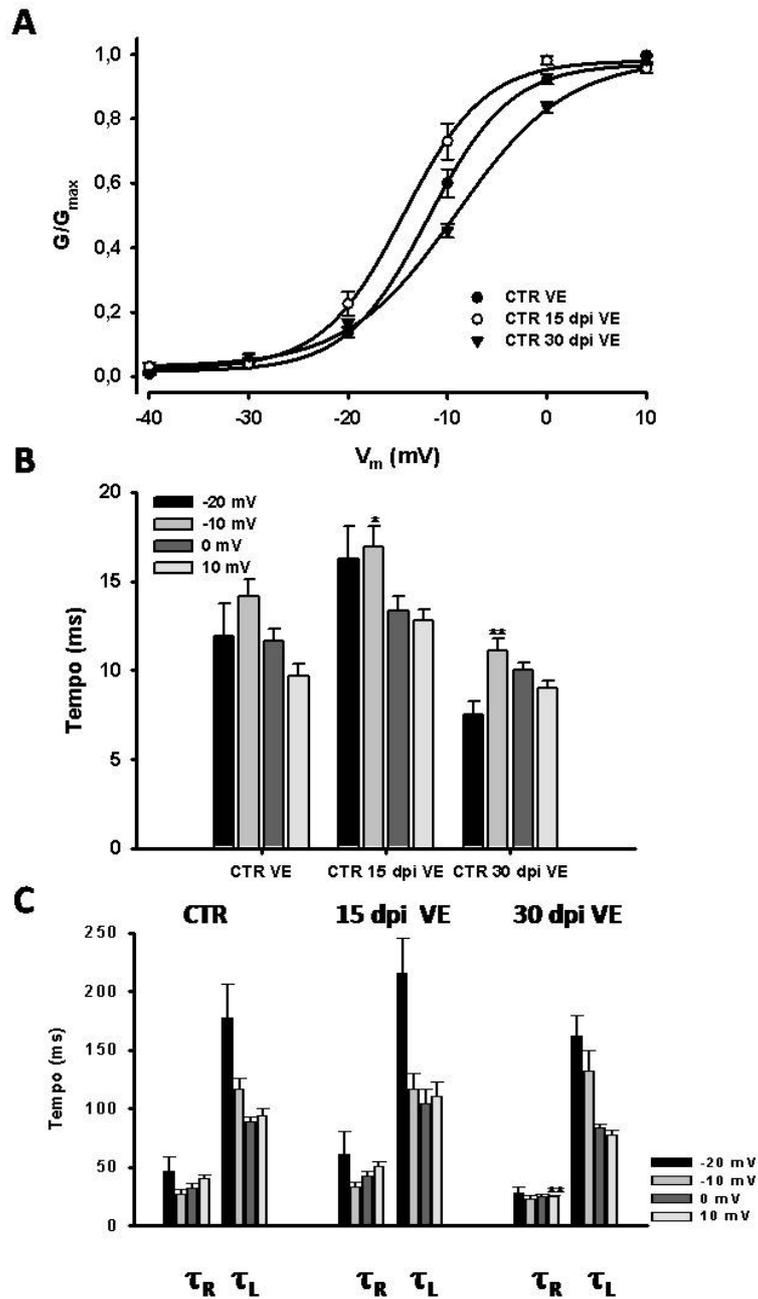


Figura 4: **Parâmetros da Corrente de Cálcio ( $I_{Ca(L)}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Colombiana.** Parâmetros avaliados para  $I_{Ca(L)}$  de cardiomiócitos ventricular esquerdo no controle (CTR VE n=17), 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 (n=8) e 30 (n=25) dpi VE) em -20, -10, 0 e 10 mV. Os círculos e barras representam média  $\pm$  EPM. (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 5. (B) Tempo para o pico da  $I_{Ca(L)}$  (ms). (C) Constante de tempo rápida ( $\tau_R$ ) e lenta ( $\tau_L$ ) para a inativação (ms). \* comparando CT com 15 dpi; \*\* comparando CT com 30 dpi. \*,\*\* p<0,05 para one-way anova.

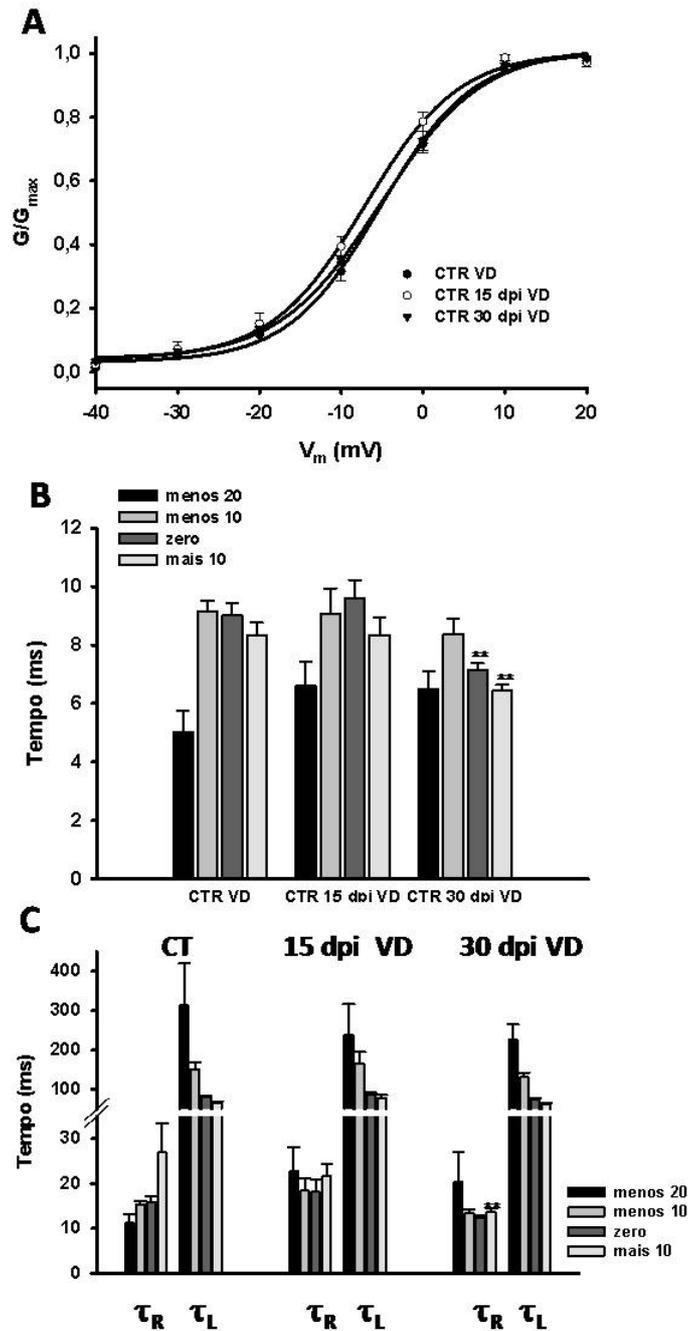


Figura 5: **Parâmetros da Corrente de Cálcio ( $I_{Ca(L)}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo direito - CEPA Colombiana.** Parâmetros avaliados para  $I_{Ca(L)}$  de cardiomiócitos ventricular direito no controle (CTR VD n=12), 15 e 30 dias pós-infecção (CTR 15 (n=10) e 30 (n=16) dpi VD) em -20, -10, 0 e 10 mV. Os círculos e barras representam média  $\pm$  EPM. (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 5. (B) Tempo para o pico da  $I_{Ca(L)}$  (ms). (C) Constante de tempo rápida ( $\tau_R$ ) e lenta ( $\tau_L$ ) para a inativação (ms). \*\* comparando CT com 30 dpi. \*\*  $p < 0,05$  para one-way anova.

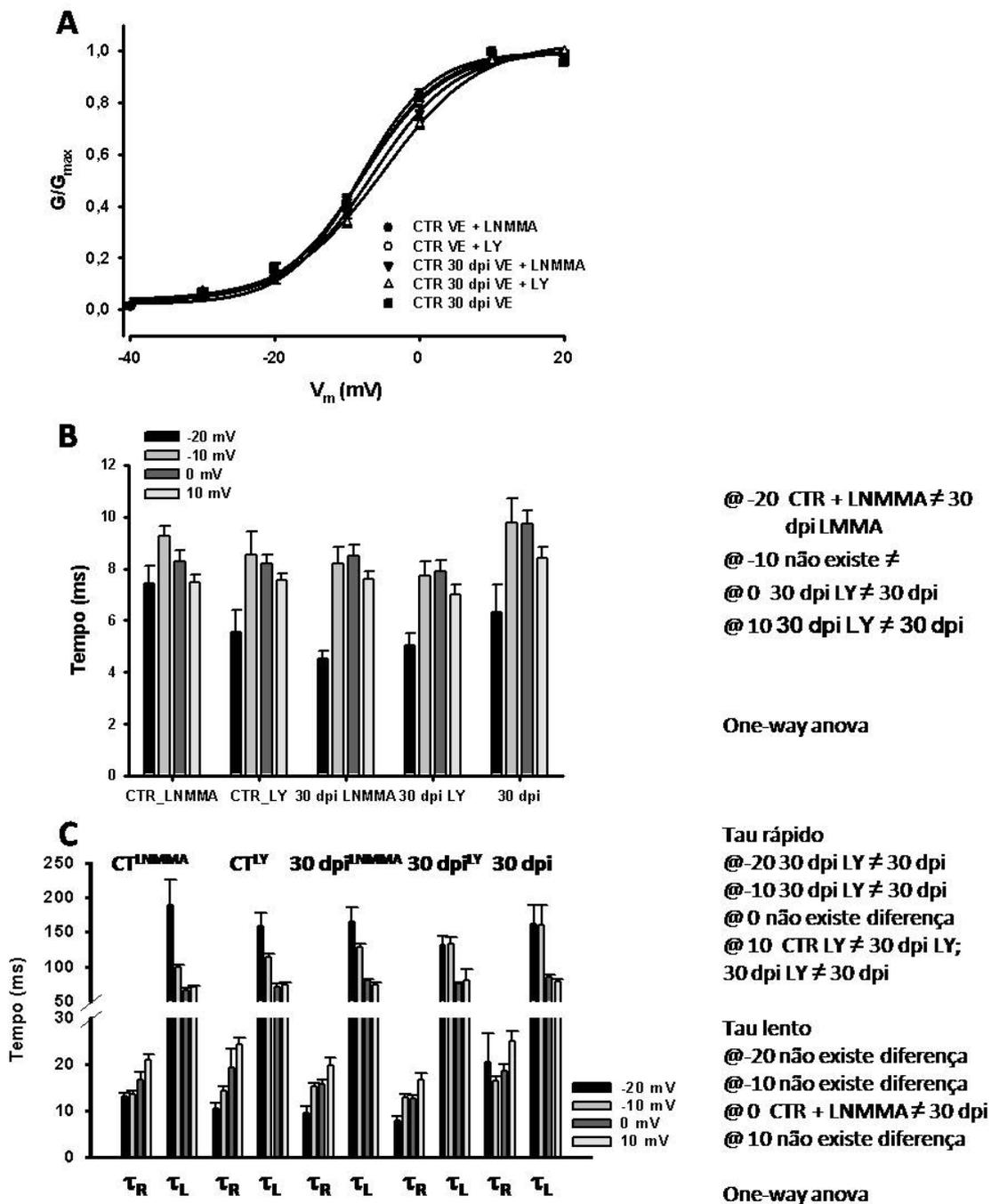


Figura 6: Parâmetros da Corrente de Cálcio ( $I_{Ca(L)}$ ) da via óxido nítrico/PI3Kinase em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Colombiana. Parâmetros avaliados para  $I_{Ca(L)}$  de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de controle (CT); 30 dias pós-infecção (30 dpi) (n=14); CT + LNMMA (n=12); 30 dpi + LNMMA (n=14); CT + LY (n=10) e 30 dpi + LY (n=17) em -20, -10, 0 e 10 mV. Os círculos e barras representam média  $\pm$  EPM (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 5. (B) Tempo para o pico da  $I_{Ca(L)}$  (ms). (C) Constante de tempo rápida ( $\tau_R$ ) e lenta ( $\tau_L$ ) para a inativação (ms).

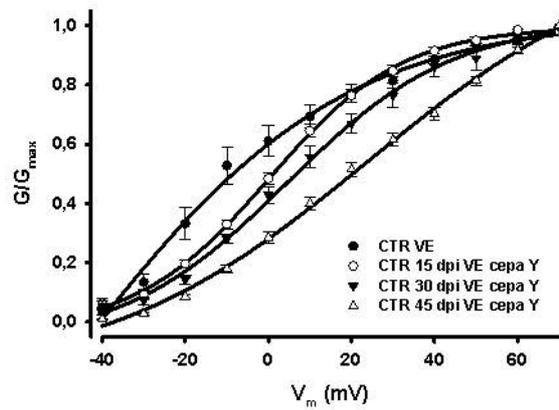


Figura 7. Dependência de voltagem para ativação da corrente de transiente rápida de potássio ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y. (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 5. Cardiomiócito controle ventricular esquerdo (CTR VE  $n=18$ ), cardiomiócito infectado do ventrículo esquerdo aos 15 ( $n=18$ ), 30 ( $n=9$ ) e 45 (13) dias pós-infecção (CTR 15, 30 e 45 dpi VE).

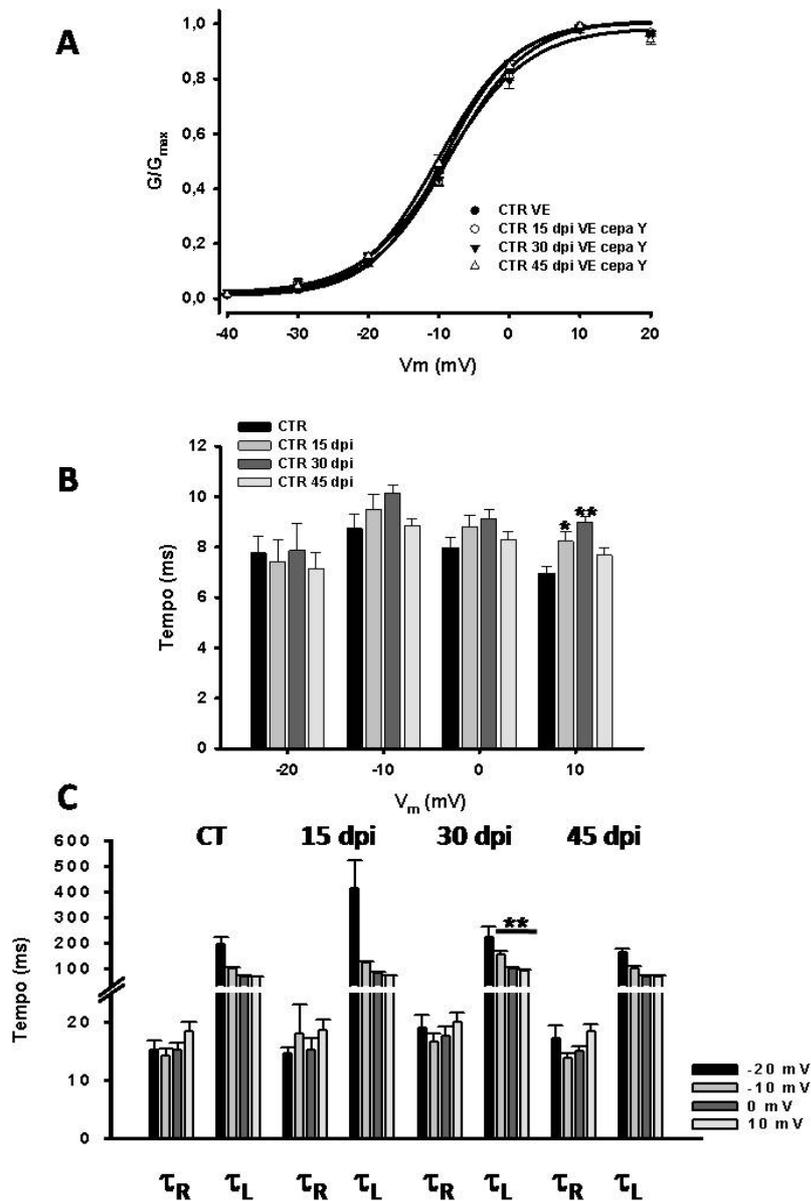


Figura 8: **Parâmetros da Corrente de Cálcio ( $I_{Ca(L)}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y.** Parâmetros avaliados para  $I_{Ca(L)}$  de cardiomiócitos ventricular esquerdo no controle (CTR VE n=18), 15 (n=22), 30 (n=12) e 45 (n=14) dias pós-infecção (CTR 15 e 30 dpi VE) em -20, -10, 0 e 10 mV. Os círculos e barras representam média  $\pm$  EPM. (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 5. (B) Tempo para o pico da  $I_{Ca(L)}$  (ms). (C) Constante de tempo rápida ( $\tau_R$ ) e lenta ( $\tau_L$ ) para a inativação (ms). \* comparando CT com 15 dpi; \*\* comparando CT com 30 dpi. \*,\*\* p<0,05 para one-way anova.

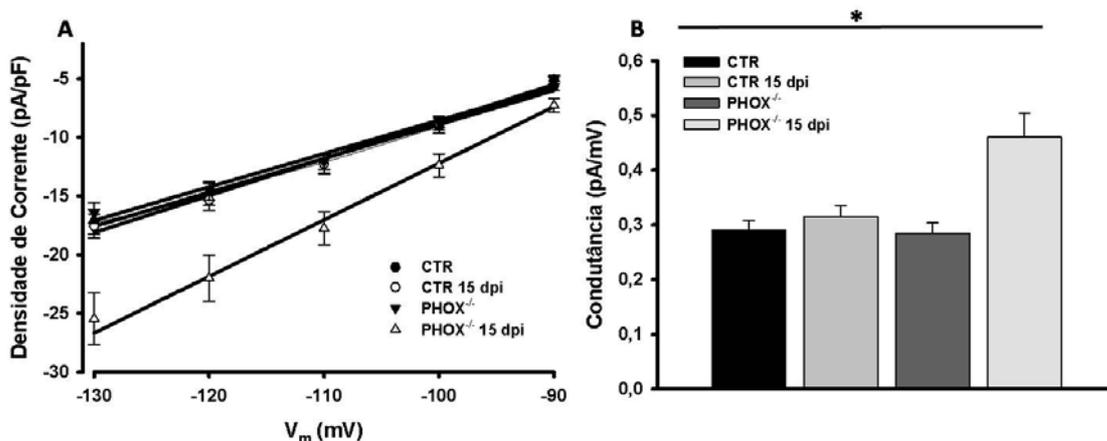


Figura 9: Curva de condutância para corrente de potássio retificadora de entrada ( $I_{K1}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e direito - CEPA Y PHOX2<sup>-/-</sup>. Os círculos e barras representam média  $\pm$  EPM. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 6. (A) representa a regressão linear obtida de acordo com a equação 6. (B) e o coeficiente angular obtidos segundo equação 6, para a regressão linear apresentada em (A). Cardiomiócito controle ventricular esquerdo (CTR n=18), cardiomiócito infectado do ventrículo esquerdo a 15 dias pós-infecção (CTR 15 dpi n=18), cardiomiócito do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para PHOX2<sup>-/-</sup> (PHOX<sup>-/-</sup> n=20) e cardiomiócito do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para PHOX2<sup>-/-</sup> infectado a 15 dpi (PHOX<sup>-/-</sup> 15 dpi n=16). \* comparando PHOX<sup>-/-</sup> 15 dpi com CTR, CTR 15 dpi e PHOX<sup>-/-</sup>.

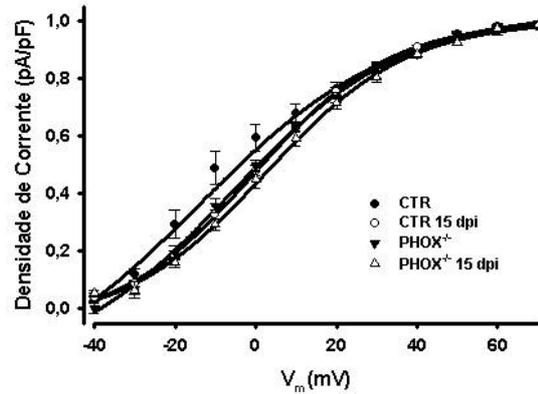


Figura 10. **Dependência de voltagem para ativação da corrente de transiente rápida de potássio ( $I_{to}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y PHOX2<sup>-/-</sup>.** (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 5. Cardiomiócito controle ventricular esquerdo (CTR n=23), cardiomiócito infectado do ventrículo esquerdo a 15 dias pós-infecção (CTR 15 dpi n=23), cardiomiócito do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para PHOX2<sup>-/-</sup> (PHOX<sup>-/-</sup> n=14) e cardiomiócito do ventrículo esquerdo de animal *knockout* para PHOX2<sup>-/-</sup> infectado a 15 dpi (PHOX<sup>-/-</sup> 15 dpi n=16).

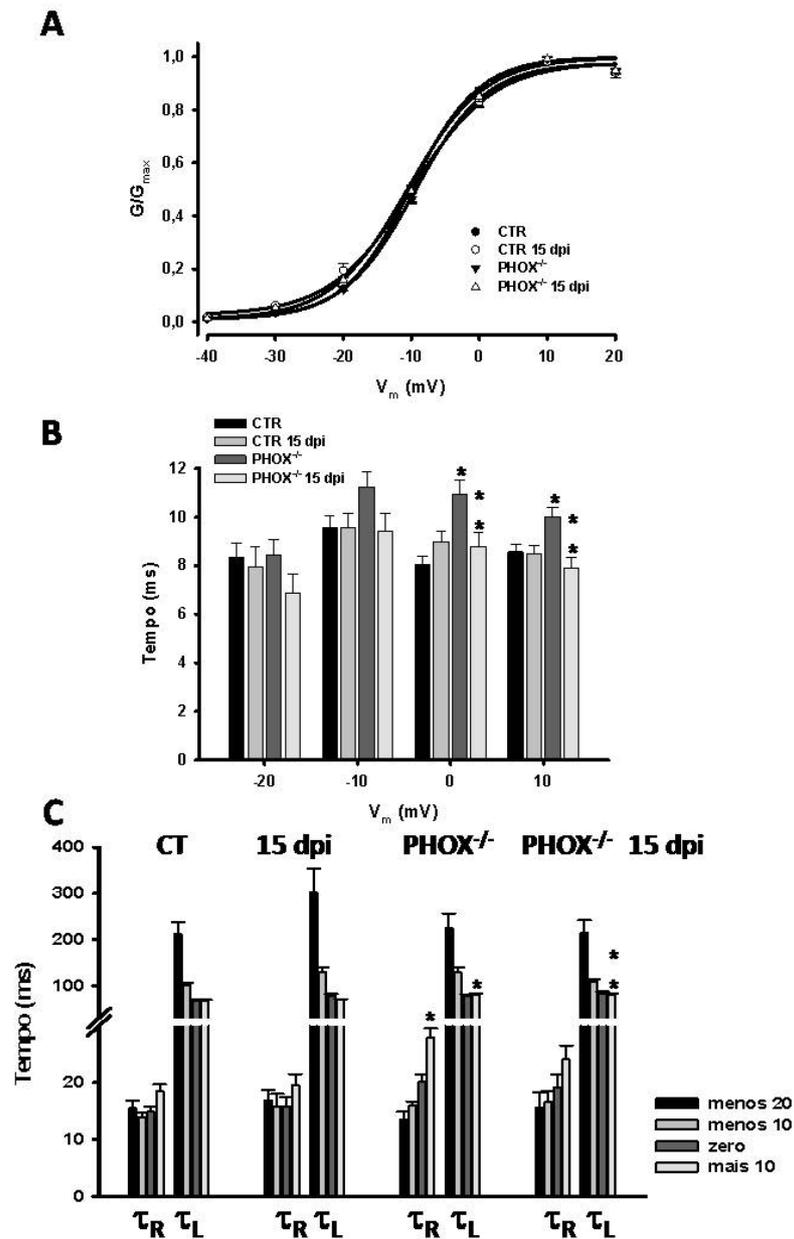


Figura 11: **Parâmetros da Corrente de Cálcio ( $I_{Ca(L)}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo - CEPA Y  $PHOX2^{-/-}$ .** Parâmetros avaliados para  $I_{Ca(L)}$  de cardiomiócitos ventricular esquerdo no controle (CTR n=25), 15 dias pós-infecção (CTR 15 dpi n=25), animal *knockout* para  $PHOX2^{-/-}$  (n=26) e  $PHOX2^{-/-}$  a 15 dpi ( $PHOX^{-/-}$  15 dpi n=19) em -20, -10, 0 e 10 mV. Os círculos e barras representam média  $\pm$  EPM. (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 5. (B) Tempo para o pico da  $I_{Ca(L)}$  (ms). (C) Constante de tempo rápida ( $\tau_r$ ) e lenta ( $\tau_L$ ) para a inativação (ms). \* comparando CT com  $PHOX^{-/-}$ ; \*\* comparando  $PHOX^{-/-}$  com  $PHOX^{-/-}$  15 dpi. \*,\*\*  $p < 0,05$  para one-way anova.

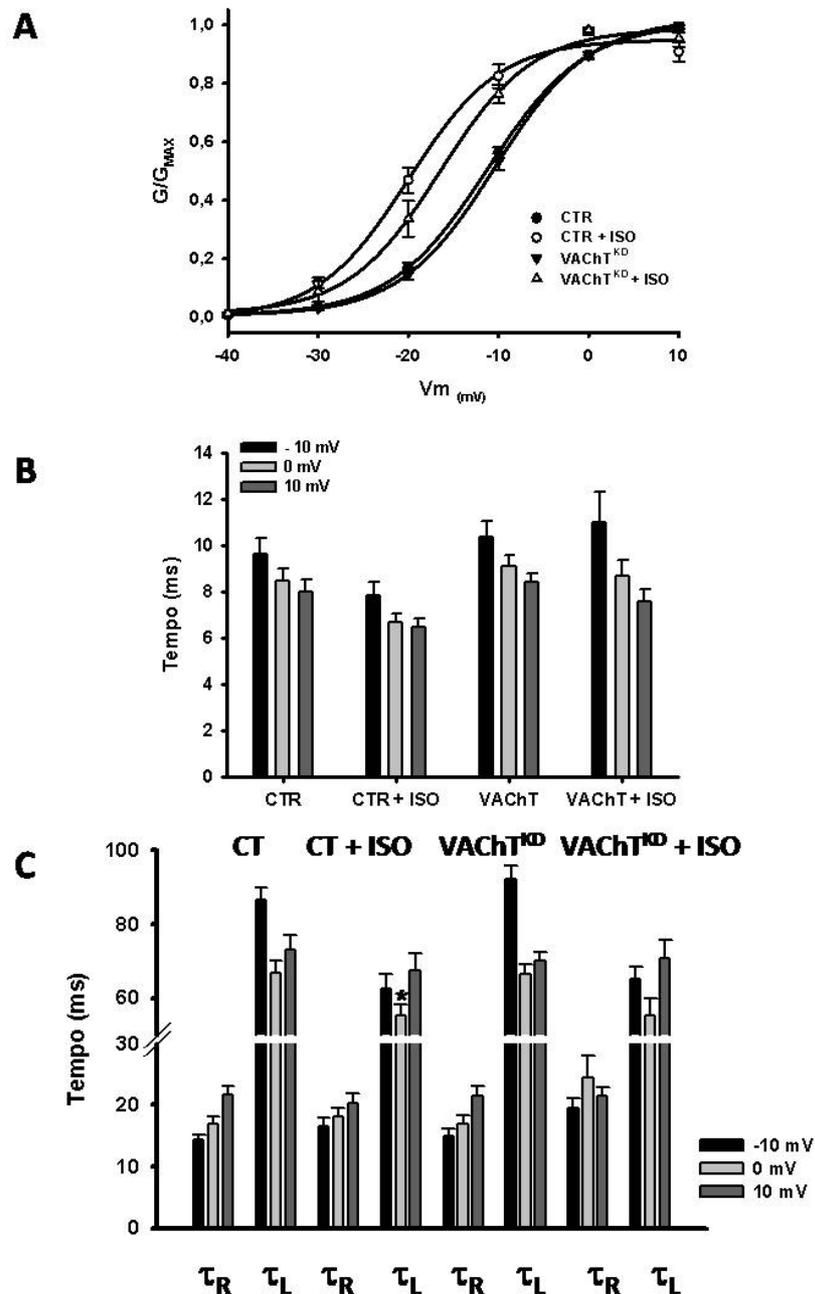


Figura 12: **Parâmetros da Corrente de Cálcio ( $I_{Ca(L)}$ ) em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo em VACHT<sup>KD</sup>.** Parâmetros avaliados para  $I_{Ca(L)}$  de cardiomiócito controle ventricular esquerdo (CTR) (n=14), cardiomiócito do ventrículo esquerdo do animal *knockdown* para o transportador de acetilcolina (VACHT<sup>KD</sup>) (n=20), CTR + Isoproterenol (ISO) (n=9) e VACHT<sup>KD</sup> + ISO (n=14) em -20, -10, 0 e 10 mV. Os círculos e barras representam média  $\pm$  EPM. (A) Dependência de voltagem para ativação. As linhas contínuas representam os ajustes segundo equação 5. (B) Tempo para o pico da  $I_{Ca(L)}$  (ms). (C) Constante de tempo rápida ( $\tau_R$ ) e lenta ( $\tau_L$ ) para a inativação (ms). \* comparando CTR e CTR + ISO. \*  $p < 0,05$  para one-way anova.

### **Anexo 3 – Programa de análise de contratilidade celular**

O programa de contratilidade celular bem como a interface gráfica foi desenvolvido pelos seguintes motivos principais:

1 - falta de programas gratuitos disponíveis para análise de dados de contratilidade celular

2 - possibilitar que pessoas não familiarizadas com ambiente de programação analisem dados de contratilidade celular

Abaixo é apresentada uma seqüência de figuras que ilustra a interface gráfica apresentada ao usuário, bem como os passos envolvidos na análise. A explicação de cada uma das partes é fornecida na legenda das figuras.



Figura 1: Janela inicial do programa. Essa janela oferece duas opções ao usuário: a seleção dos resultados para serem analisados, pelo botão “Process your data”; e exportar os resultados finais em uma tabela excel, pelo botão ‘Export your results’.

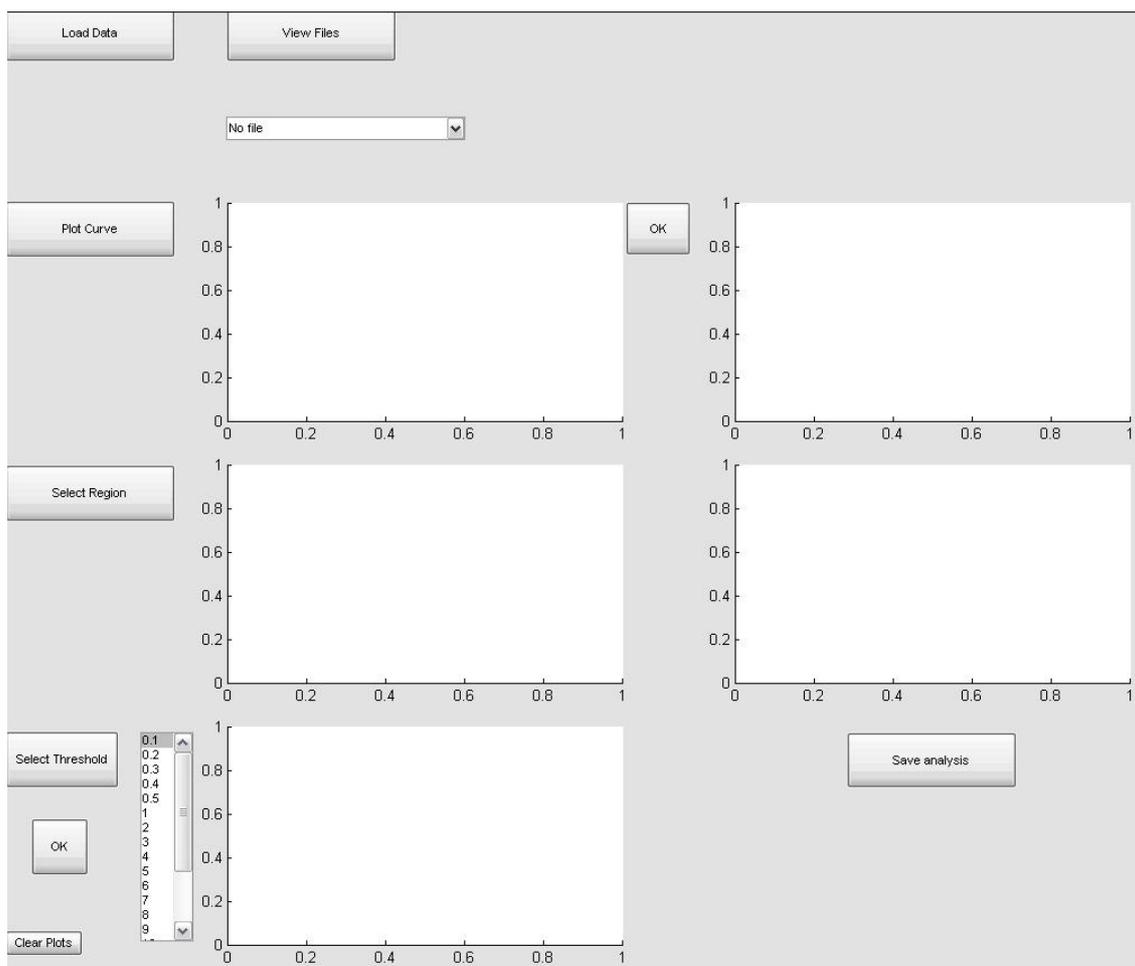


Figura 2: Figura originada após pressionar o botão ‘Process your data’. Uma vez pressionado o botão ‘Process your data’, apresentado na Figura 1 desse anexo, é originada essa figura, onde o usuário irá selecionar seus resultados para análise. Para iniciar a análise o usuário deve pressionar o botão ‘Load Data’.



Figura 3: Uma vez pressionado o botão ‘Load Data’ apresentado na Figura 2 desse anexo, o usuário deve selecionar a pasta contendo os arquivos a serem analisados. Nesse caso os arquivos então armazenados na pasta denominada ‘arquivos exemplos’.

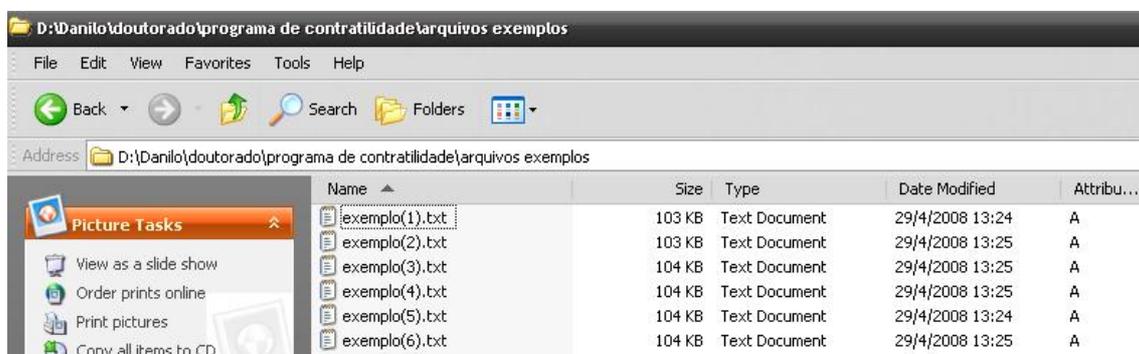


Figura 4: Arquivos utilizados como exemplos. Nesse caso, nossa pasta “arquivos exemplos” contém seis arquivos. Os arquivos devem estar em formato txt e ordenados em duas colunas com n linhas, sendo n=número de pontos. Na primeira coluna devem estar o eixo do tempo, a na segunda coluna o eixo da contração.

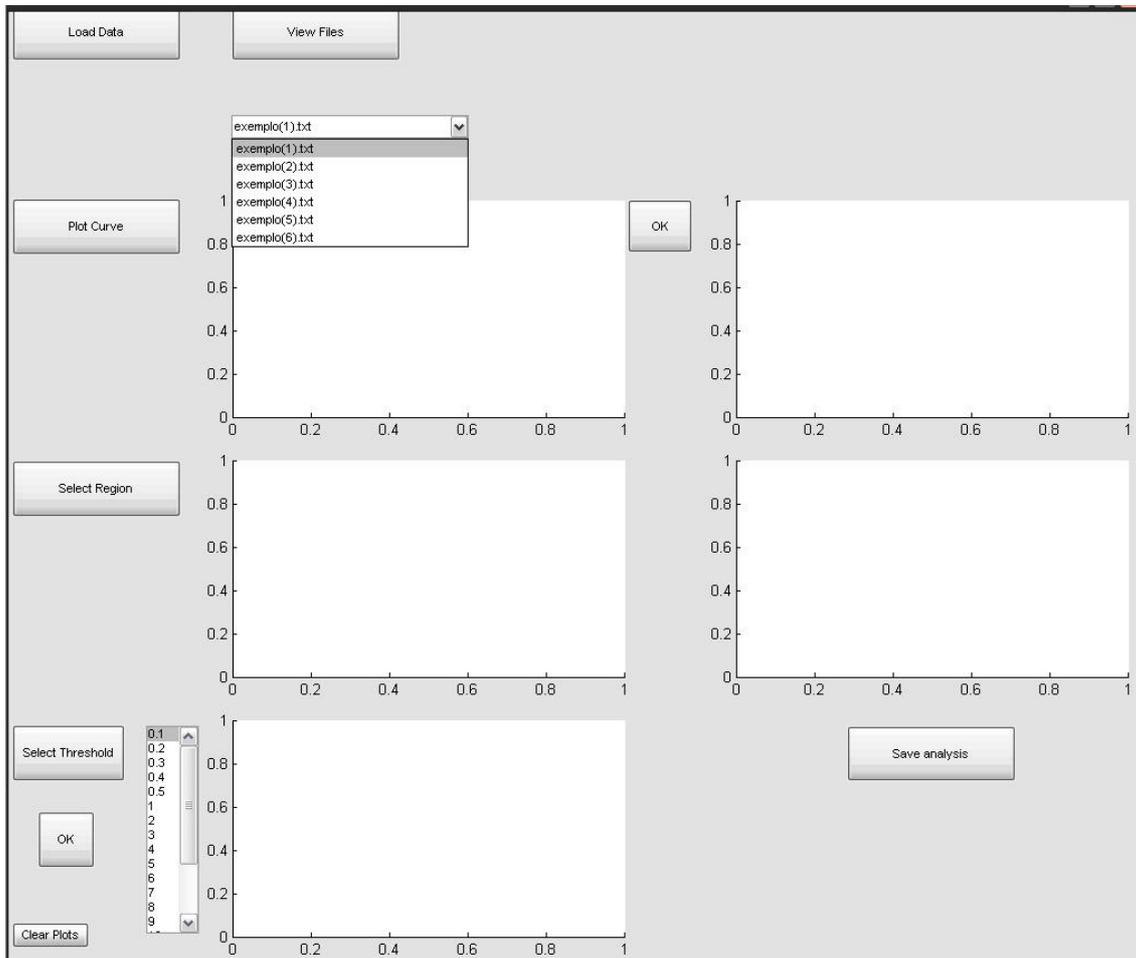


Figura 5: Uma vez selecionado os dados, o usuário deve pressionar o botão ‘View files’, e os arquivos serão carregados para análise. Observe na Figura 2, logo abaixo do botão ‘View Files’ aparece a escrita ‘No file’. Após pressionar o botão ‘View files’ os arquivos serão carregados, armazenados na memória do computador, permitindo a análise. Como pode ser visto na presente figura, a escrita ‘No files’ observada na Figura 2 não é mais observada, sendo agora possível visualizar os arquivos a serem analisados.

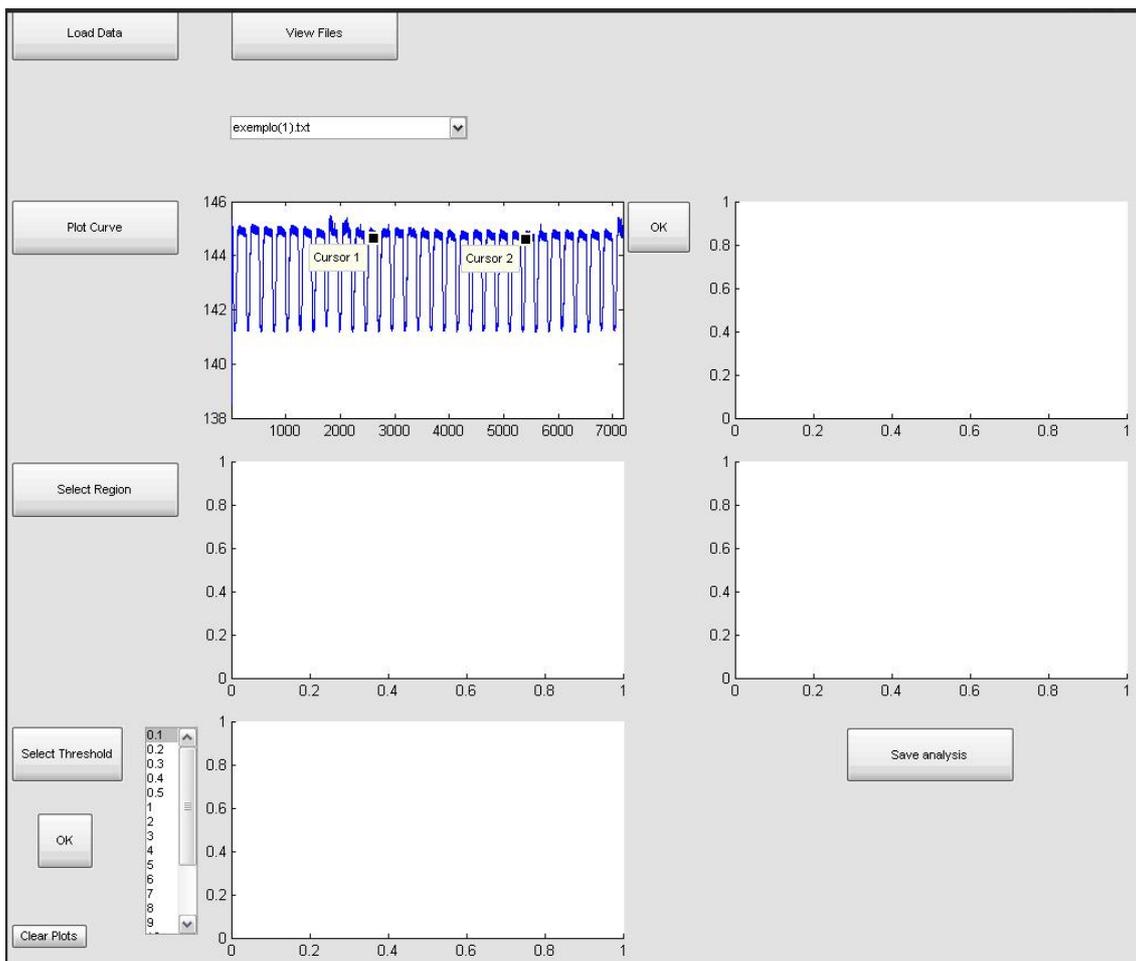


Figura 6: Após ter sido carregados os dados, o usuário necessita escolher um arquivo para iniciar a análise, nesse caso escolhemos o arquivo exemplo(1).txt como exemplo. Após selecionar o arquivo, conforme explicado na Figura 5, o usuário deve pressionar o botão 'Plot Curve'. A curva de contratilidade será plotada, conforme visualizado no primeiro gráfico a esquerda. O usuário deve selecionar o trecho da curva que deseja realizar a análise. Nesse caso, o trecho é delimitado pelo 'Cursor 1' e 'Cursor 2'.

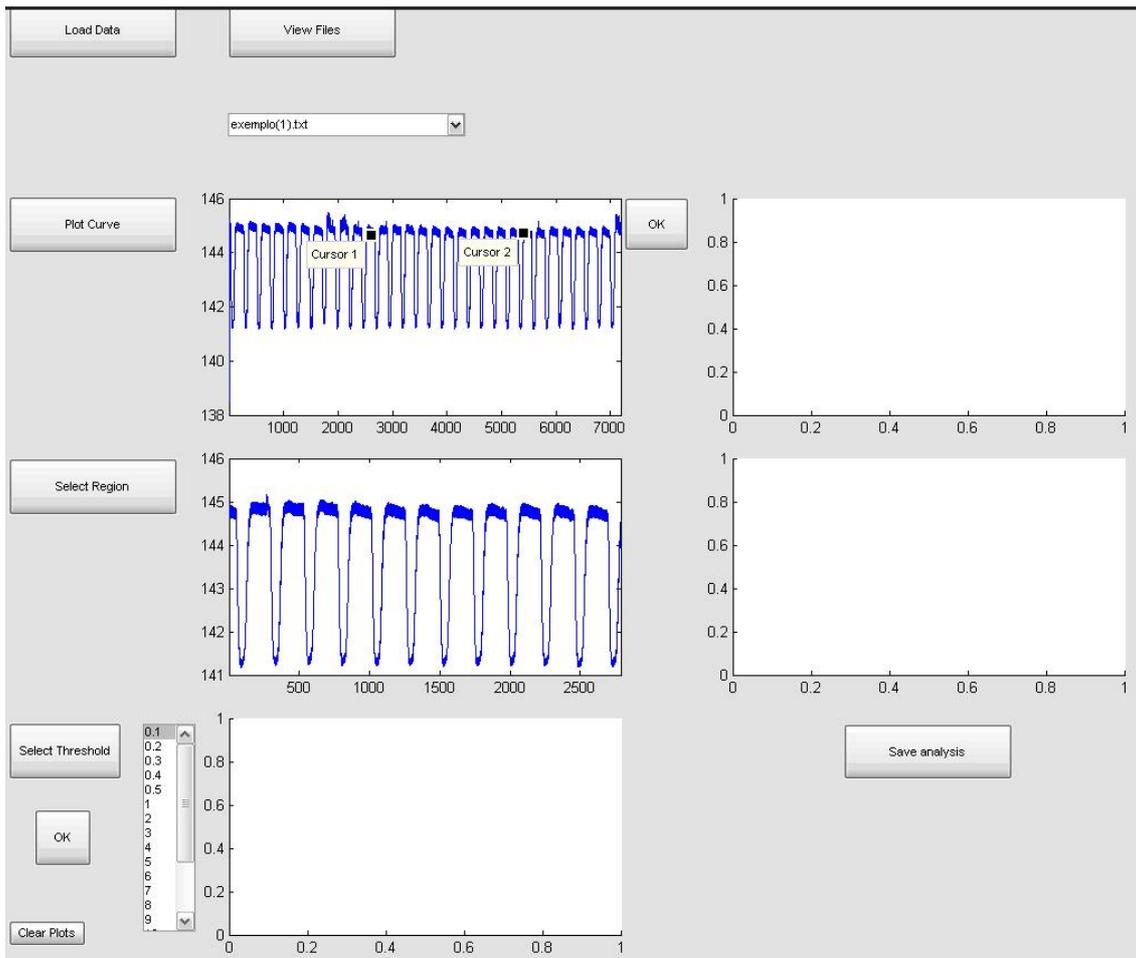


Figura 7: Após selecionado o trecho de interesse da curva, como apresentado na Figura 6, o usuário deve pressionar o botão ‘Select Region’. No segundo gráfico a esquerda será plotado a região que será levada em consideração para análise.

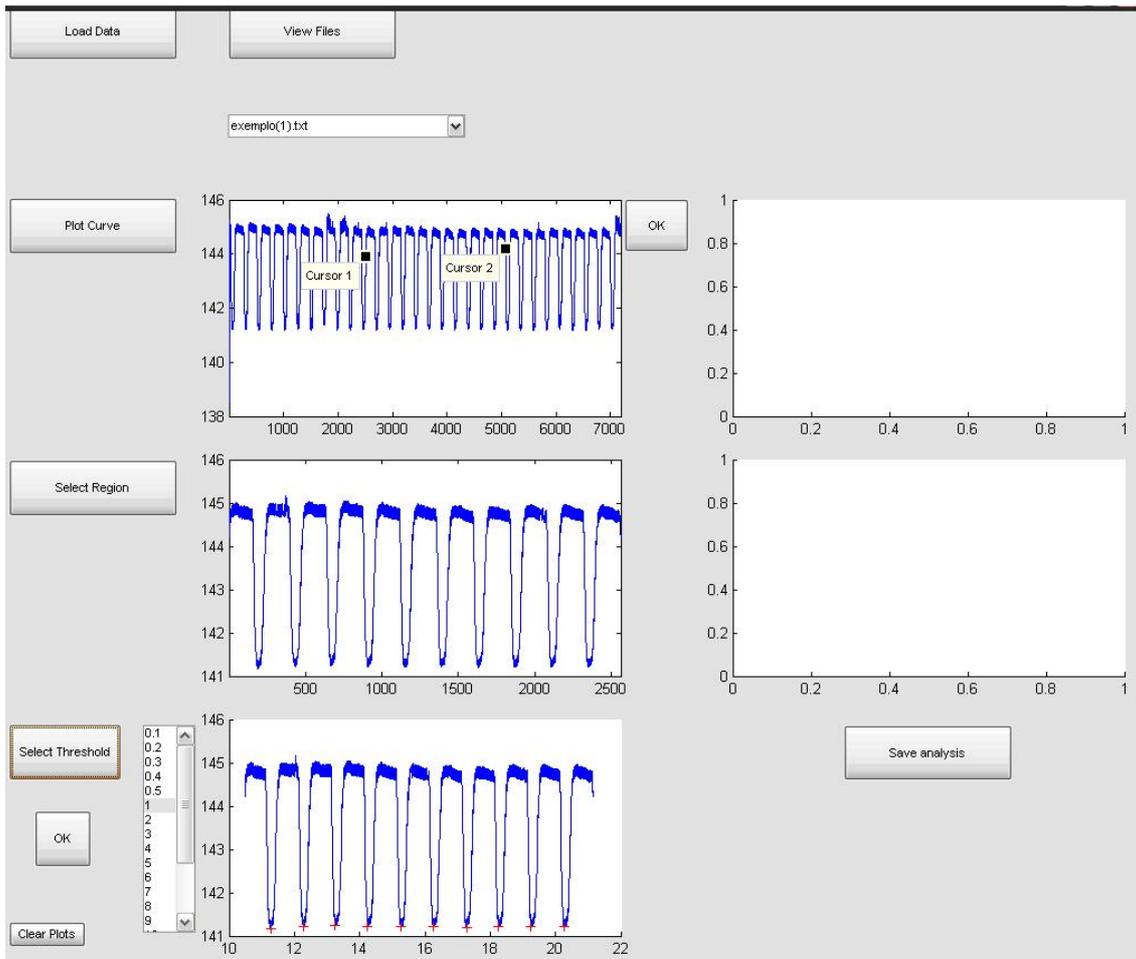


Figura 8: Selecionado a região de interesse, conforme demonstrado na Figura 7, o usuário deve selecionar um valor de ‘threshold’, para que apenas os picos referente a contração celular sejam considerados, nessa figura representado pelas cruces em vermelho (terceiro gráfico a esquerda), já que o ‘threshold’ correto foi selecionado, após pressionar a tecla ‘Selec threshold’. Caso o usuário não selecione o threshold correto, pontos não devidos serão selecionados e o programa irá avisar o usuário para selecionar um outro valor. Um exemplo demonstrando pontos não corretos são apresentados nas figuras 9 e 10.

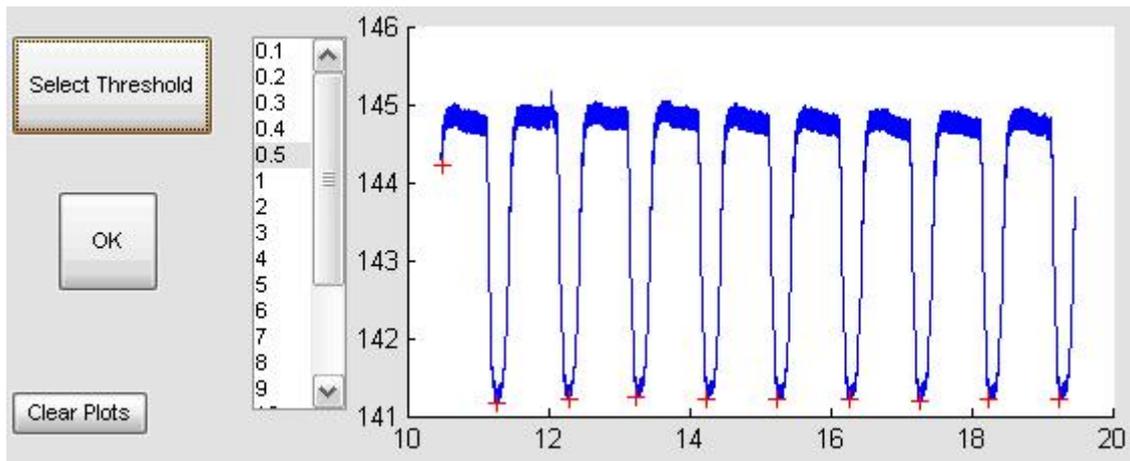


Figura 9. Mesmo traçado apresentado na figura 8. Nesse caso nota-se que o primeiro ponto selecionado como pico de contração, não se refere a um pico de contração celular. Nesse caso utilizamos um threshold menor do que o da Figura 8, sendo o valor de 1 e 0,5, para a primeira e segunda situação respectivamente.

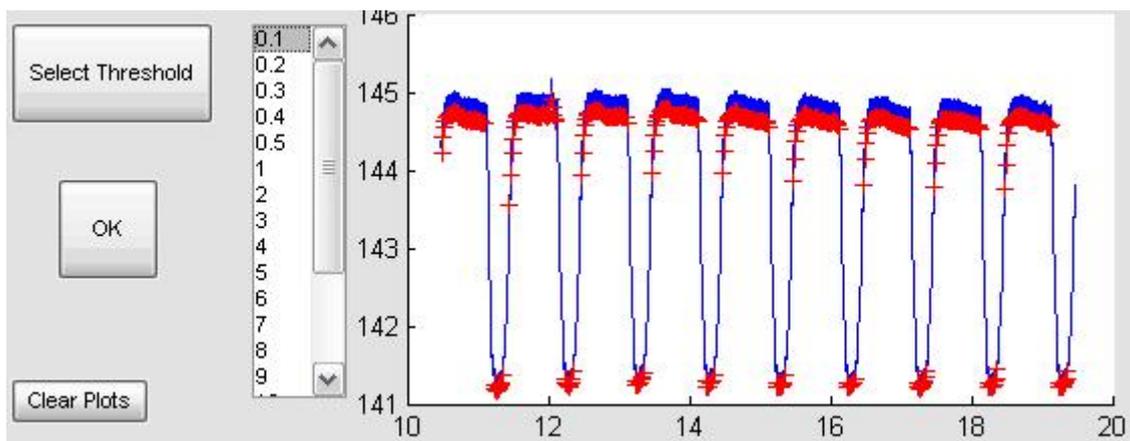


Figura 10. Mesmo traçado apresentado na Figura 8 e 9. Nota-se que agora foi selecionado um threshold extremamente baixo, de 0,1. Nota-se que muitos pontos que não se refere a um ponto de contração celular foram selecionados. Assim o usuário deve mudar o valor, até obter um padrão similar ao da Figura 8.

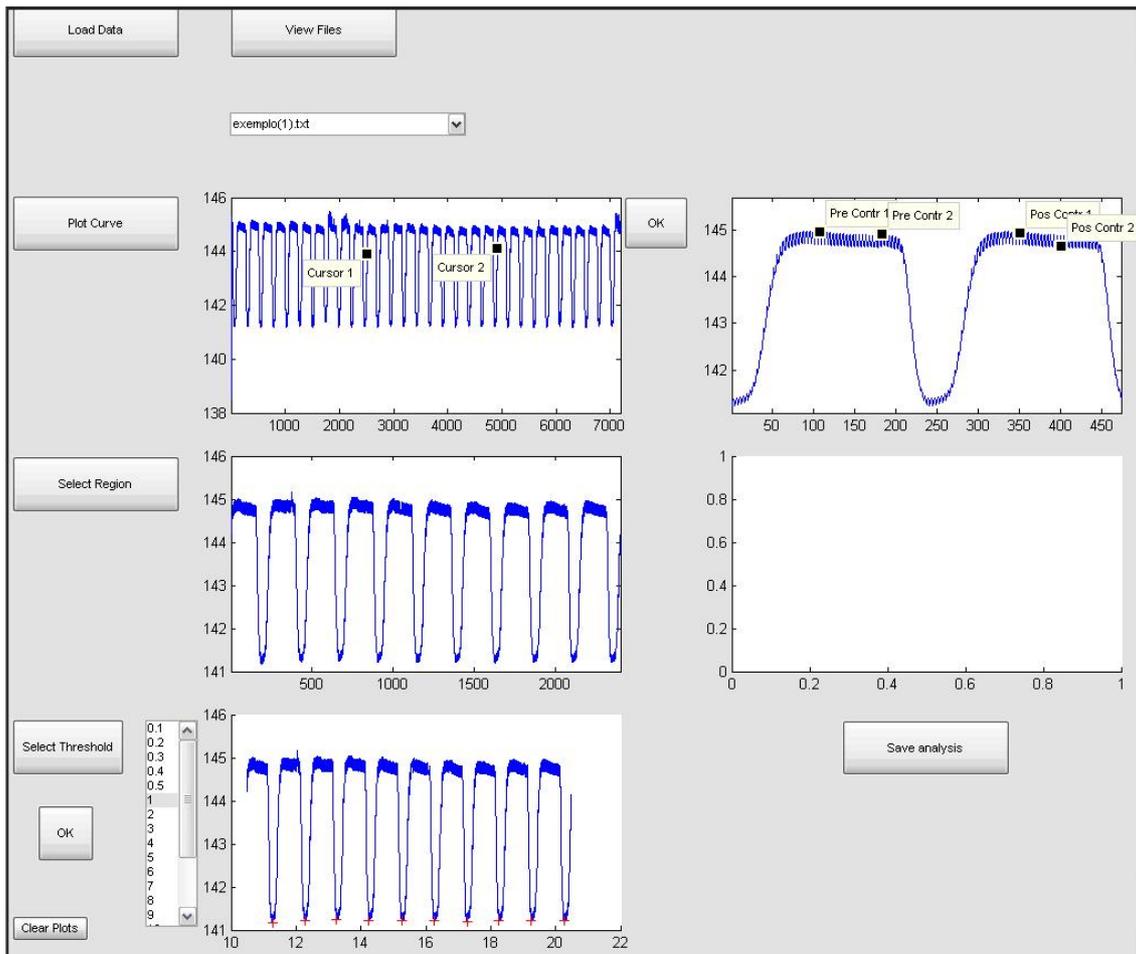


Figura 11: Após realizar o procedimento apresentado na Figura 8, o usuário deve selecionar a região de repouso do comprimento celular (primeiro gráfico a direita), posicionando os cursores Pre contr 1 e 2 na posição de repouso antes da contração celular, e os cursores Pos contr 1 e 2, após a contração celular. Em seguida, deve pressionar o botão OK.

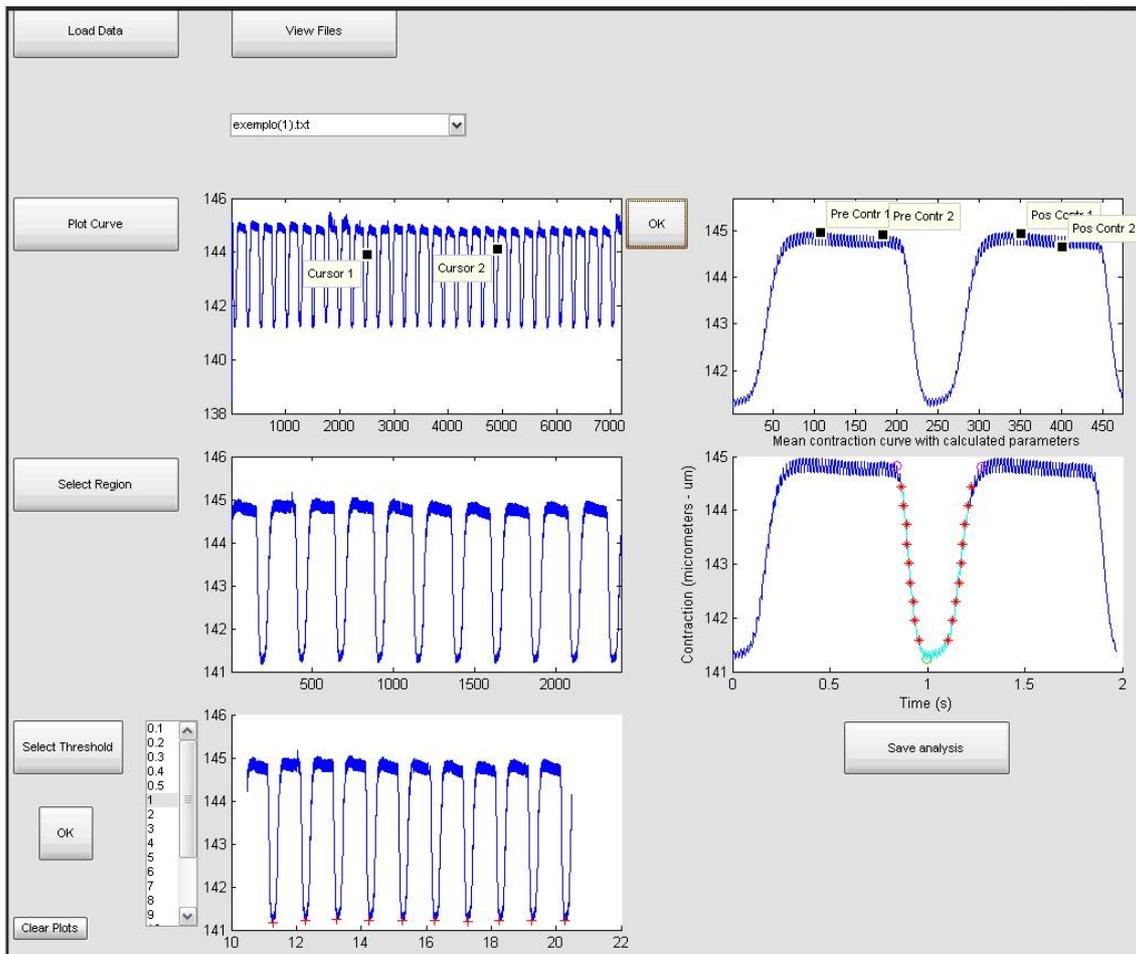


Figura 12: Depois de pressionado o botão ‘OK’, conforme apresentado a Figura 12, os principais parâmetros analisados são plotados no segundo gráfico a direita. No caso é plotado: o tempo considerado como início da contração e relaxamento (círculo rosa); tempo para 10-90% da contração e relaxamento (cruz em vermelho); pico da contração (círculo verde); curva considerada para avaliar a taxa máxima de contração e relaxamento (traçado em azul claro). Caso o usuário esteja satisfeito com os resultados obtidos ele deve pressionar o botão ‘Save analysis’ e os parâmetros analisados serão salvos em formato matlab, e posteriormente exportados em formato excel, conforme explicado a seguir.

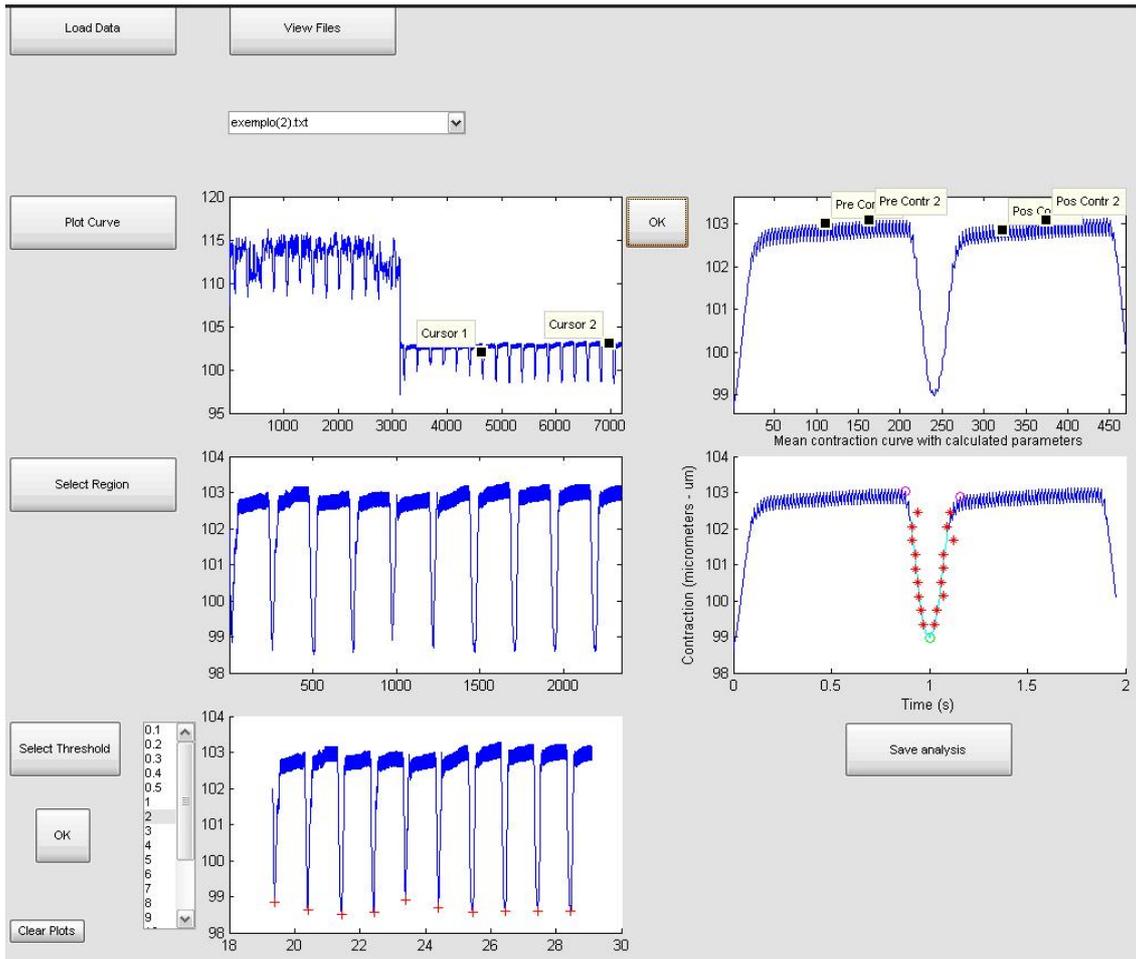


Figura 13: Exemplo demonstrando que, dentro de um arquivo de contratilidade não é necessário que todo o arquivo apresente uma boa qualidade de registro para que o sinal seja analisado.

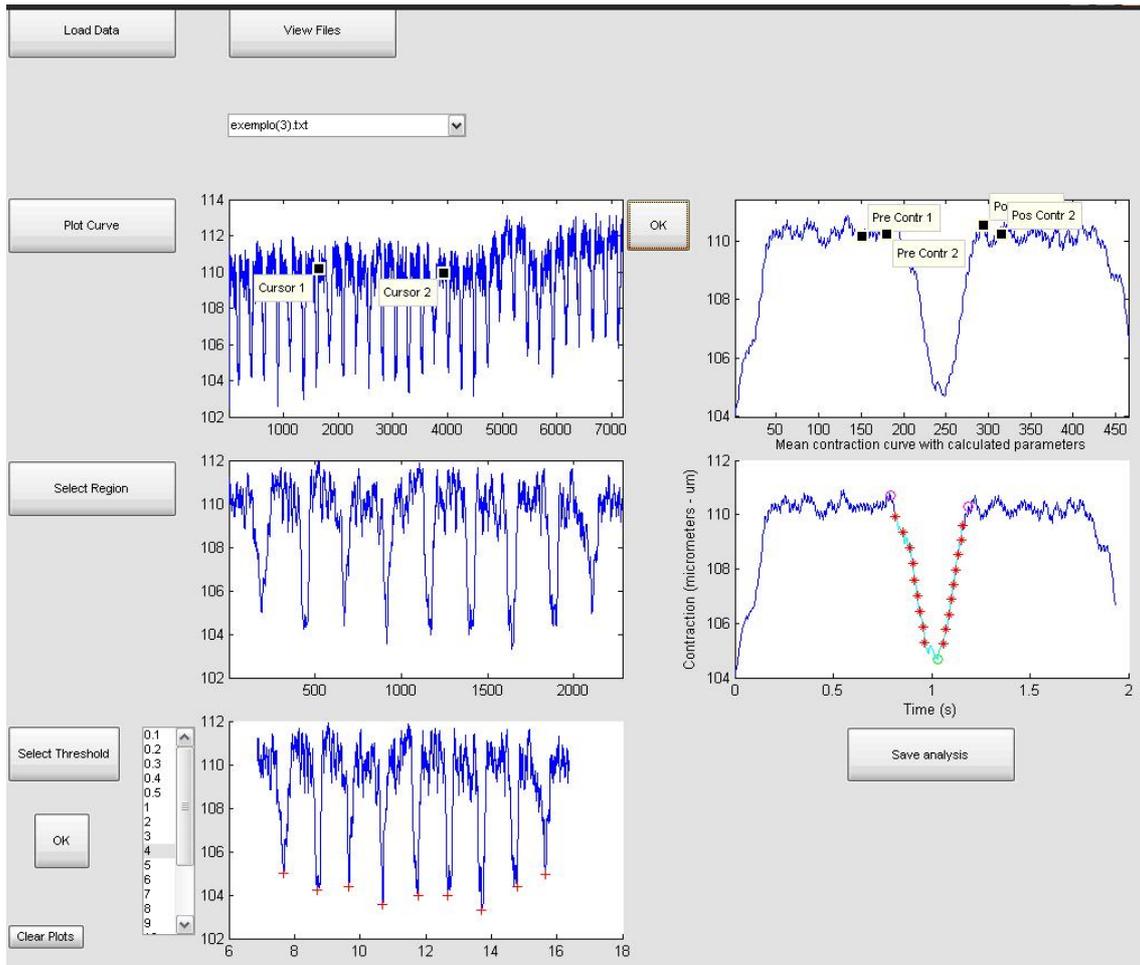


Figura 14: exemplo ilustrando que o programa é capaz de analisar curvas mesmo em condições não ideais, cabendo ao usuário o censo crítico quanto a qualidade de seus experimentos.

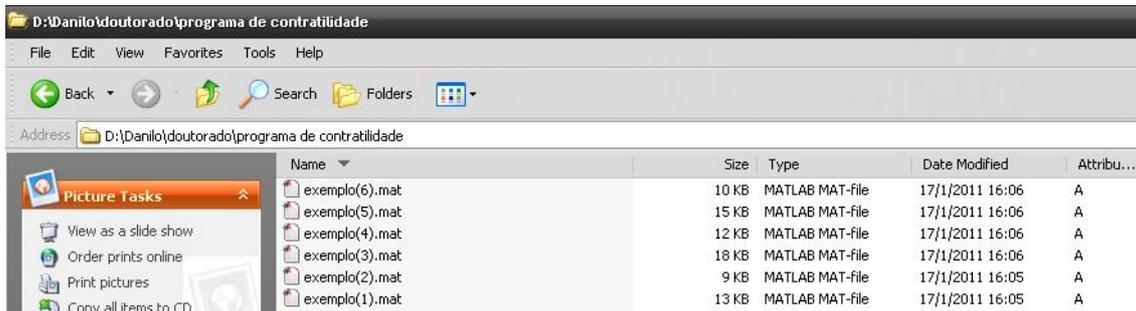


Figura 15: Depois de terminada a análise, e realizado o procedimento apresentado na Figura 12, todos os arquivos analisados estarão presentes em um diretório acima da pasta ‘arquivos exemplos’. Nesse caso, os arquivos originados são os exemplo(1)-(6).mat. O usuário deve criar uma pasta denominada Analysis e colocar todos os arquivos exemplo(1)-(6).mat dentro dessa pasta, conforme Figura 16.

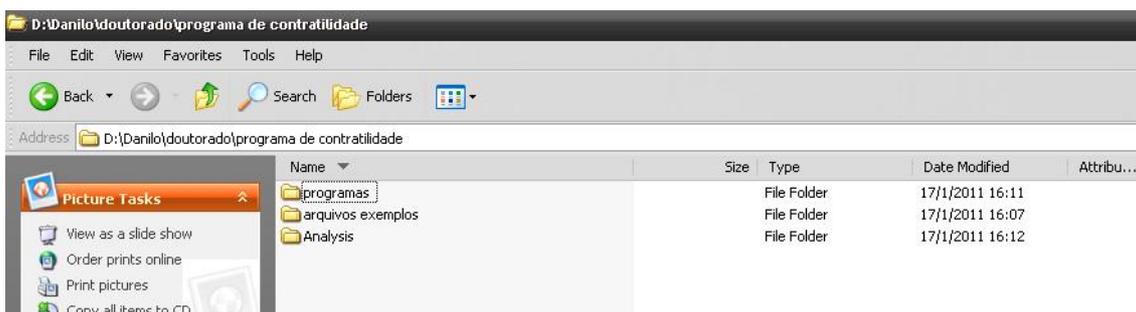


Figura 16: Como pode ser visto, nesse caso foi criada a pasta ‘Analysis’ (NECESSARIAMENTE DEVE TER ESSE NOME). Os arquivos exemplo(1)-(6).mat originados após a análise foram colocados dentro dessa pasta. Conforme apresentado na Figura 1, o layout inicial do programa apresenta dois botões. ‘Process data’ e ‘Export your results’. Após criar a pasta ‘Analysis’ o usuário deve pressionar o botão ‘Export your results’. Ele deverá navegar até a pasta ‘Analysis’, selecionando-a. Após esse procedimento, irá aparecer uma barra de espera avisando o usuário que os dados estão sendo processados. Quando terminado, uma nova pasta será originada no mesmo diretório da pasta ‘Analysis’, conforme Figura 17.

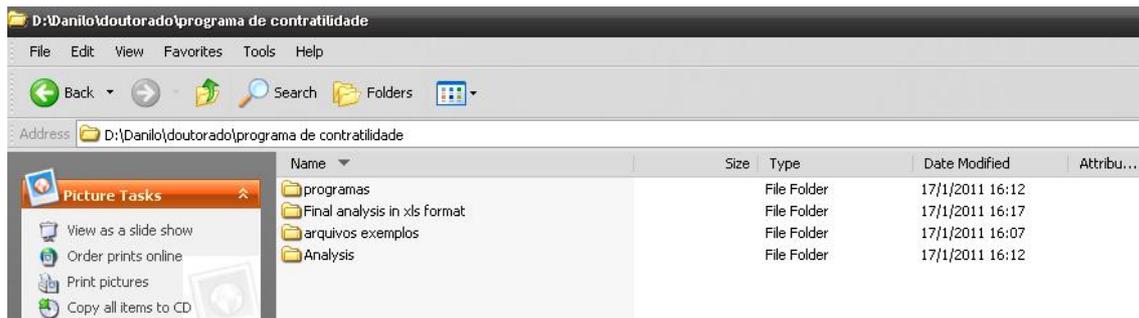


Figura 17: Depois de selecionado o folder ‘Analysis’ e esperado o programa exportar os resultados a pasta ‘Final analysis in xls format’ será gerada, contendo os diferentes arquivos exel, os quais cada um possui um diferente parâmetro. Abaixo eles serão especificados.

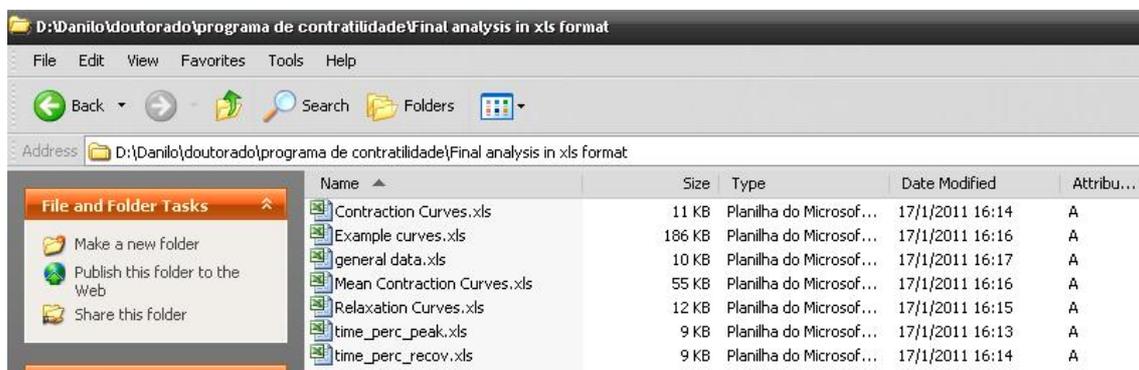


Figura 18: Arquivos gerados após os dados terem sido exportados. Nesse caso são gerados 7 arquivos em formato exel, sendo: Contraction Curves, Example curves, general data, Mean contraction curves, Relaxation curves, time\_perc\_peak e time\_perc\_recov. Abaixo, cada um dos arquivos serão explicados.

A

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		baseline (um)	peak (um)	Time_to_peak (seconds)	Time_to_relax (seconds)	peak_height (um)	perc_peak	perc_peak_height (fractional shortening)	maximal_velocity_contraction (um/seconds)
2	exemplo(1).txt	144,8018681	141,2314286	0,154123783	0,274923505	3,57043956	97,53425863	2,465741365	74,42070117
3	exemplo(2).txt	102,8901923	98,6525	0,141666667	0,141666667	4,237692308	95,88134475	4,11865525	74,4
4	exemplo(3).txt	110,2822222	105,0941667	0,195833333	0,2375	5,188055556	95,29565559	4,704344409	85,8
5	exemplo(4).txt	132,7582143	130,4571429	0,058333333	0,1125	2,301071429	98,26672011	1,733279889	64,11428571
6	exemplo(5).txt	160,0143333	157,372	0,079166667	0,204166667	2,642333333	98,3486896	1,651310403	66,96
7	exemplo(6).txt	107,1678022	104,3814286	0,108333333	0,158333333	2,786373626	97,39998995	2,600010049	59,65714286
8									

B

	J	K	L	M	N
1	maximal_velocity_relaxation (um/seconds)	Max_rate_contra_base	Max_rate_contra_peak	Max_rate_relaxation_peak	Area
2	75,79251133	0,513948488	0,523422193	21,22778163	-0,700391432
3	97,8	0,723100991	0,950527915	23,07859866	-0,434151042
4	96	0,778003909	0,870493884	18,50404241	-0,840038194
5	41,82857143	0,482940254	0,315073321	18,17786745	-0,183113095
6	67,92	0,418462513	0,424461975	25,70455406	-0,3301875
7	63,42857143	0,556670396	0,591862202	22,76384288	-0,297979167
8					

Figura 19: Arquivo “General data”. Na coluna A (Fig. 19 A) é plotado o nome de cada arquivo e nas colunas de B a N os diferentes parâmetros. Coluna (B) baseline: tamanho da célula no repouso; Coluna (C) peak: tamanho da célula na contração máxima; Coluna (D) time to peak: tempo necessário para a célula sair do tamanho de repouso e ir para o tamanho de máxima contração; Coluna (E) Time\_to\_relax: tempo necessário para a célula sair do tamanho máximo de contração e recuperar o tamanho de repouso; Coluna (F) peak\_height: encurtamento da célula em micrômetros; Coluna (G) perc-peak: porcentagem da célula (peak/baseline); Coluna (H) perc\_peak\_height: porcentagem de encurtamento da célula; Coluna (I) maximal velocity contraction : taxa máxima de variação do comprimento ao longo do tempo durante a contração; Coluna (J) maximal velocity relaxation: taxa máxima de variação do comprimento ao longo do tempo durante o relaxamento. Col(K,L,M) parâmetros não utilizados; Col (N) Area: área da curva de contração.

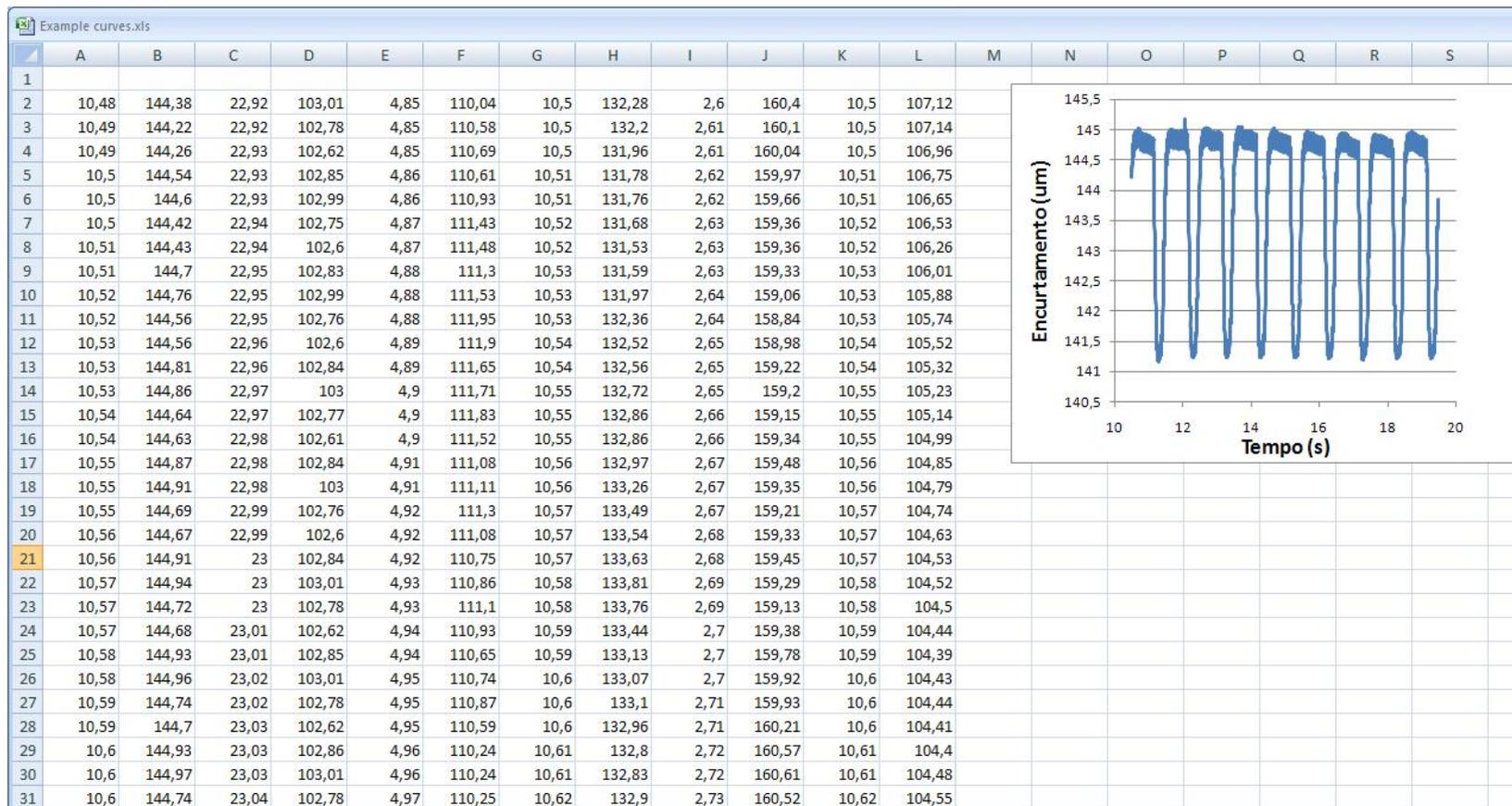


Figura 20: Arquivo “Example curves”. O Arquivo apresenta os trechos dos arquivos utilizados para a análise. Col (A) eixo tempo e Col (B) eixo da contração, referente ao arquivo ‘exemplo(1).txt’. Os demais arquivos são apresentados sucessivamente na mesma ordem. O gráfico ilustra o arquivo originado pelos pontos das Col(A,B).

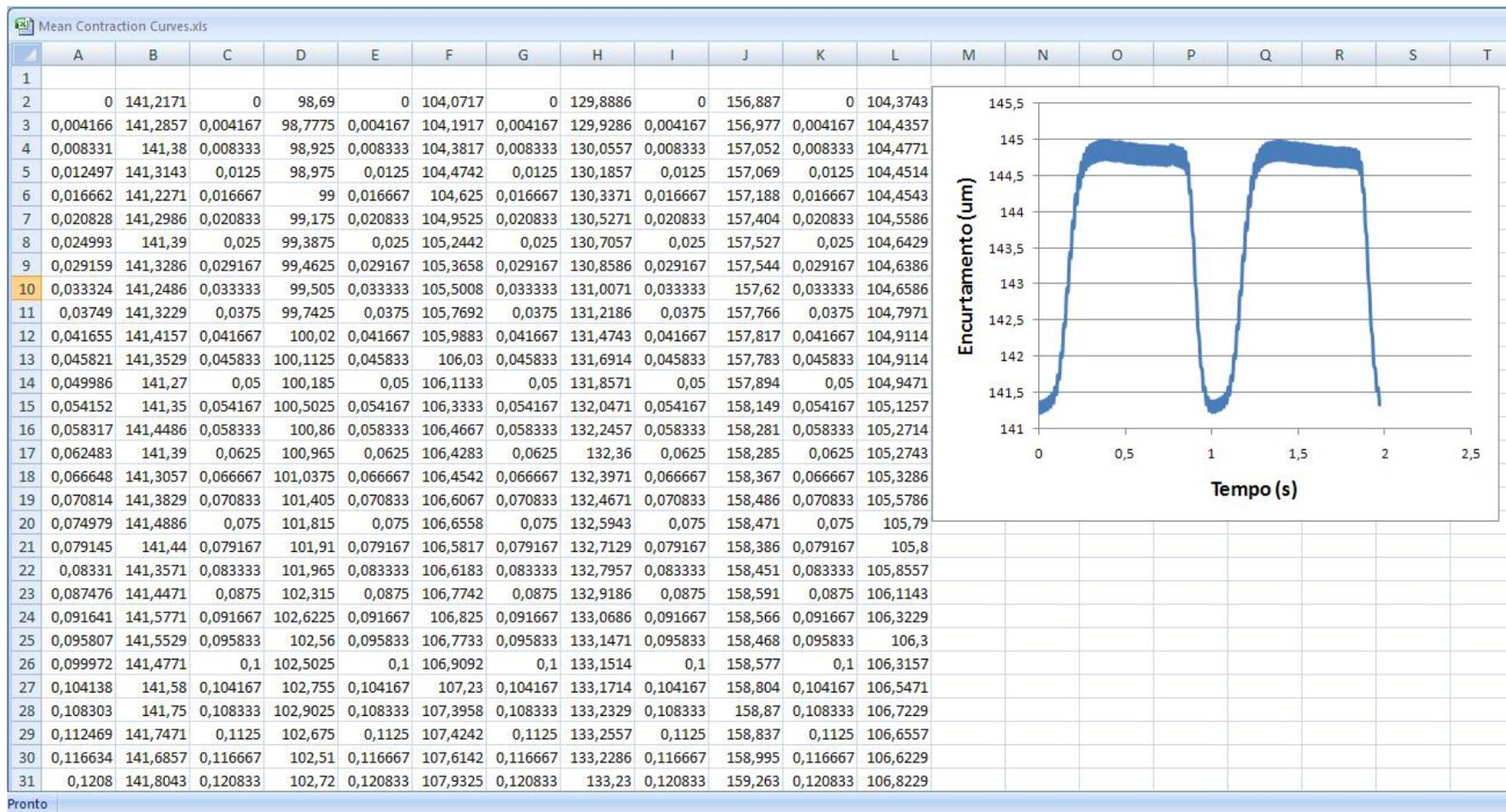


Figura 21: Arquivo ‘Mean Contraction Curves’. O arquivo armazena as curvas médias utilizadas para o cálculo dos parâmetros de contratilidade celular. Col (A) eixo tempo e Col (B) eixo da contração, referente ao arquivo ‘exemplo(1).txt’. Os demais arquivos são apresentados sucessivamente na mesma ordem. O gráfico ilustra o arquivo originado pelos pontos das Col(A,B)

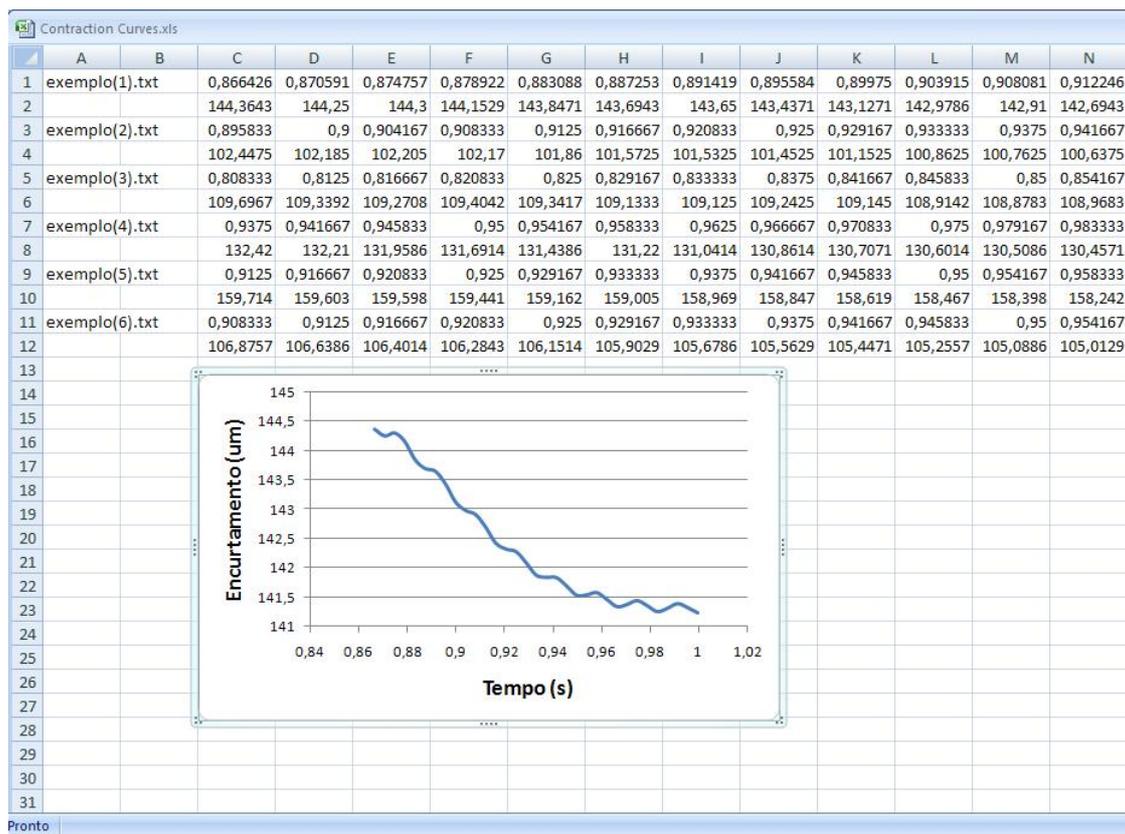


Figura 22: Arquivo ‘Contraction Curves’. Contem as curvas utilizadas para o cálculo da máxima taxa de contração. Col(A) o nome dos arquivos.

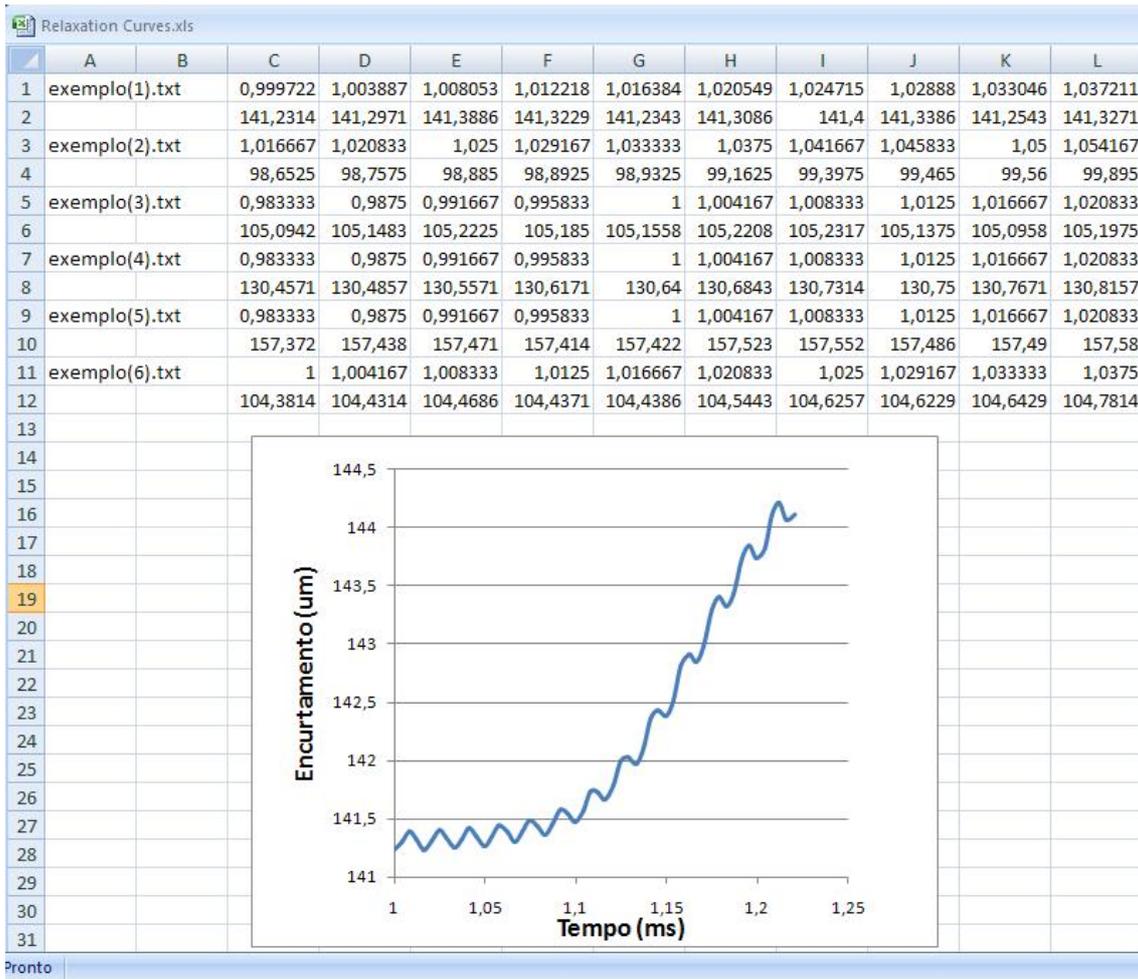


Figura 23: Arquivo ‘Relaxation Curve’. Contém as curvas utilizadas para o cálculo da máxima taxa de relaxamento. Col(A) o nome dos arquivos.

**A**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	exemplo(1).txt	0,136231726	0,123191819	0,11589724	0,106884708	0,098119734	0,09309165	0,075544893	0,074476319	0,009444488	
2	exemplo(2).txt	0,1211337	0,106813824	0,104831731	0,08811229	0,079461538	0,077035647	0,059145749	0,054531773	0,050264423	
3	exemplo(3).txt	0,175777972	0,209805556	0,134025206	0,089548346	0,072831499	0,057321111	0,040644693	0,025016926	0,014827061	
4	exemplo(4).txt	0,047978316	0,043125	0,039205102	0,035745056	0,032390387	0,028676667	0,023287864	0,018177083	0,012184295	
5	exemplo(5).txt	0,072188438	0,059003385	0,055749292	0,043684211	0,039533077	0,029992877	0,024888716	0,019486639	0,01467963	
6	exemplo(6).txt	0,091902997	0,090770794	0,080659636	0,073627307	0,07012504	0,059396288	0,057086357	0,041670847	0,029674359	
7											

**B**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	exemplo(1).txt	0,225538407	0,218348337	0,199111266	0,175987986	0,171975959	0,158643802	0,143488444	0,126254553	0,104911286	
2	exemplo(2).txt	0,087881513	0,075169414	0,089590774	0,064634354	0,054261631	0,049082181	0,038024831	0,031880511	0,032107515	
3	exemplo(3).txt	0,206622999	0,172756119	0,154758747	0,128771107	0,134048267	0,122608509	0,107898205	0,092550277	0,066830183	
4	exemplo(4).txt	0,104177669	0,093080726	0,0874959	0,078168873	0,072408888	0,063136977	0,056046864	0,04441925	0,023807899	
5	exemplo(5).txt	0,187680887	0,172745862	0,138640318	-0,009487179	0,120237306	0,119573427	0,104457846	0,100639487	0,067752404	
6	exemplo(6).txt	0,122386018	0,105651434	0,108055556	0,100430403	0,080952381	0,081763784	0,057018931	0,051795635	0,036955782	
7											

Figura 24. Arquivo time\_perc\_peak (A) e time\_perc\_recov. Col(A) nome dos arquivos. Col(B,C,D,E,F,G,H,I,J) tempo para 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 e 10 (%) da contração (A) e relaxamento (B).

## **Anexo 4 – Artigos Publicados**

Danilo Roman-Campos  
Hugo Leonardo L. Duarte  
Policarpo A. Sales Jr  
Antonio J. Natali  
Catherine Ropert  
Ricardo T. Gazzinelli  
Jader S. Cruz

## Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice

Received: 6 November 2008  
Returned for 1. Revision: 19 November 2008  
1. Revision received: 25 November 2008  
Accepted: 17 December 2008  
Published online: 3 February 2009

D. Roman-Campos and H.L.L. Duarte  
contributed equally.

D. Roman-Campos · H.L.L. Duarte  
P.A. Sales Jr · R.T. Gazzinelli  
J.S. Cruz  
Dept. of Biochemistry and Immunology  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte (MG), Brazil

Dr. J.S. Cruz (✉)  
Laboratory of Excitable Membranes and  
Cardiovascular Biology  
Dept. of Biochemistry and Immunology  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte (MG), Brazil  
Tel.: +55-31/3409-2668  
E-Mail: jcruz@icb.ufmg.br

P.A. Sales Jr · C. Ropert · R.T. Gazzinelli  
Laboratory of Immunopathology  
René Rachou Institute  
Fiocruz (MG), Brazil

P.A. Sales Jr  
Hospital Santa Casa de Misericórdia de  
Belo Horizonte  
Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa  
Belo Horizonte (MG), Brazil

A.J. Natali  
Universidade Federal de Viçosa  
Belo Horizonte (MG), Brazil

■ **Abstract** *Trypanosoma cruzi*, an intracellular protozoan parasite infecting a wide variety of vertebrates, is the agent responsible for Chagas' disease. This pathology often results in severe inflammatory heart condition and it is one of the major causes of dilated cardiomyopathy leading to heart failure in Latin America. Nevertheless, little is known about the changes in isolate cardiac myocytes contractility during the development of this pathology. Here we report a relationship between cytokines profile of mice infected with *T. cruzi* and the modifications in the cellular contractility pattern. We found that cellular contractility, measured as fractional shortening, showed a complex behavior. The changes were evaluated during the acute phase (15, 30 and 45 dpi) and chronic phase (>90 dpi). The time to half contraction and relaxation were lengthier despite the number of days after infection or the heart region evaluated. The maximal contraction and relaxation velocities were significantly slower. The observed changes in cellular contractility were correlated with the presence of circulating IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and MCP-1/CCL2 during the course of infection. Together, our data demonstrate that cellular contractility is altered in the three heart regions studied, and these alterations are observed at the very beginning of the parasitism and they remained until the chronic phase has been reached. Indeed, we propose a role for IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and MCP-1/CCL2 in the mechanical heart remodeling during experimental Chagas' disease.

■ **Key words** *Trypanosoma cruzi* – chagas' disease – cellular contractility – cytokines – chemokines – cardiac chambers – heart failure

### Introduction

Chagas' disease, caused by the intracellular haemoflagellate protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is

one of the most common determinants of congestive heart failure and sudden death in Latin America, where it represents a serious health problem, affecting more than 18 million people [7]. Chagas' disease is a multifactorial illness that can evolve in different

consecutive phases (acute, asymptomatic and chronic). Approximately 20%–40% of patients go on to develop cardiomyopathy, characterized by intense myocarditis and multiple arrhythmias, and/or the pathological dilations of organs from the digestive tract [4]. The mechanism responsible for the development of cardiomyopathy is still controversial and several hypotheses have been raised including the persistence of the parasite or parasite antigens at the inflammatory site, or an important role of an autoimmune process [12, 38, 39]. There is substantial evidence showing that cardiomyocytes, an important target of *T. cruzi* infection, produces marked amounts of cytokines and chemokines when infected with the parasite [27, 28]. Interestingly, cytokines and chemokines that are normally elicited during *T. cruzi* infection, such as IFN- $\gamma$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-10, IL-6, transforming growth factor (TGF)- $\beta$  and monocyte chemoattractant protein (MCP-1/CCL2), were shown to vary in their ability to regulate the function of different ion channels present on the cardiac myocytes membrane surface as well as proteins involved in the calcium homeostasis and cellular contractility machinery, [3, 14, 22, 25]. Furthermore, cytokines have been shown to be able to modulate different cells, such as endothelial cells [46]. Moreover, the most studied cytokine, concerning heart function is by far the TNF- $\alpha$ , which is believed to have a dual action on cardiomyocyte function [37]. The positive and negative effects of TNF- $\alpha$  on heart contraction are due to alterations in Ca<sup>2+</sup> dynamics and therefore would involve specific ion channels [1]. Many effects attributed to TNF- $\alpha$  in modulate cardiomyocyte contractility is thought to be due to its ability to stimulate cardiomyocyte to produce NO [14], which is an important modulator of different proteins involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis [35].

Contractile dysfunction is a prominent feature in heart failure, and there is an inverse relationship between cytokine levels and cardiac performance [45]. Until now, however, no comprehensive study has been done analyzing the functional alterations associated with the mouse model of Chagas' disease, correlating the time-course of cytokine production with the disruption of cellular contractility. In this work we investigated the putative association between the cardiac contractility adaptations and serum cytokine levels during acute and chronic stages of the *T. cruzi* infection in mice.

## Materials and methods

### ■ Mice and parasites

Eight-week-old male C57BL/6 mice were infected intraperitoneally with 50 bloodstream trypomastigote

forms of Colombian [15], a myotropic strain of *T. cruzi*. Parasitemia in the tail blood was assessed on different days post-infection by the method of Brener [6]. In each assay, mouse survival was monitored daily and cumulative mortality determined. The Colombian *T. cruzi* strain used was maintained by serial passages in mice at the Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Belo Horizonte, Brazil).

### ■ Serum cytokine measurements in *T. cruzi* infected mice

Mouse Inflammation Kit from BD™ (Cytometric Bead Array—CBA) was used to quantify MCP-1/CCL2, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  in serum. The assay was performed according to the manufacturer's instructions, with modifications. Briefly, capture beads (25  $\mu$ l) were added to the 96-well capture plates combined with 25  $\mu$ l of cytokine standard over a range of 5,000 to 20.57 pg/ml, in order to set up the standard curve, or with 25  $\mu$ l of test samples. PE-conjugated detection reagent (25  $\mu$ l) was added to each well and incubated for 2 h at room temperature protected from direct light exposure. Wash buffer was added to the plate and centrifuged at 200 $\times$ g for 5 min. Supernatant was removed, and bead pellets resuspended in 200  $\mu$ l of wash buffer. The fluorescence produced by the CBA beads was measured on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed with its software.

### ■ Cardiomyocytes isolation

Ventricular and atrial cardiomyocytes from age-matched mice were enzymatically isolated as previously described with few modifications [24]. Briefly, the hearts were mounted on a Langendorff system, perfused for 5 min with calcium-free solution containing (in mM): 130 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.33 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 pyruvate, 22 glucose and 25 HEPES (pH set at 7.4). Afterwards, the hearts were perfused for 10–15 min with a solution containing 1 mg/ml collagenase type II (Worthington, USA). The digested heart was then removed from the cannula, and the ventricles and right atrium were separated and cut into small pieces. Single cells were isolated by mechanical trituration and stored in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA). Only calcium-tolerant, quiescent, rod-shaped myocytes showing clear cross striations were studied. The isolated cardiac myocytes were used within 4 h after isolation.

### ■ Measurements of cell contractility

Cellular contractility was evaluated as previously described [33]. Briefly isolated cells were placed in a

chamber with a glass coverslip base mounted on the stage of an inverted microscope (Eclipse—TS 100—Nikon, Japan). The chamber was perfused with Tyrode's solution (in mM) 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucose (pH set at 7.4). Experiments were performed at room temperature (25–30°C). Myocytes were stimulated via platinum bath electrodes with voltage pulses with 5 ms duration and an intensity of 20 V. Stimulation frequency was set at 1 Hz. Cells were visualized on a PC monitor with a NTSC camera (Myo-CamCCD100V, Ionoptix, Milton, MA, USA) in partial scanning mode. This image was used to measure cell shortening (our index of contractility) in response to electrical stimulation, using a video motion edge detection system (Ionoptix, Milton, MA, USA). The cell image was sampled at 240 Hz. Cell shortening was calculated from the output of the edge detector using an IonWizard A/D converter (Ionoptix, Milton, MA, USA). From 8 to 16 consecutive contractions were averaged. Cell shortening contraction from stimulation (expressed as a percentage of resting cell length), maximal velocity of contraction and relaxation, time to half contraction and relaxation were calculated. Parameters were obtained using software developed by our group in MatLab<sup>®</sup> platform.

## ■ Statistics

All values were expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined by performing one-way

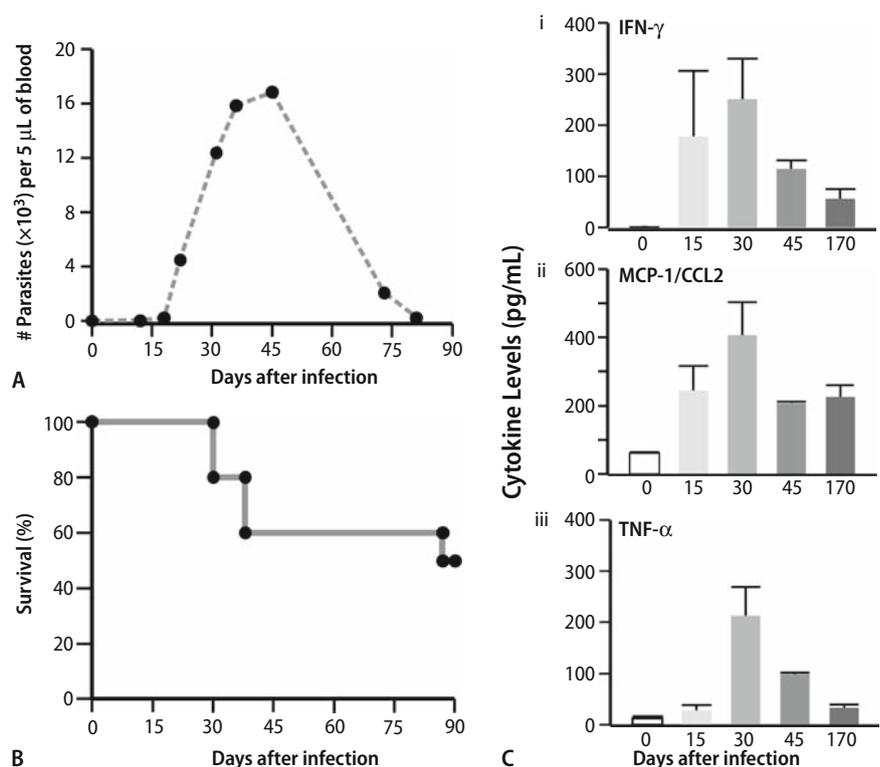
ANOVA. The analyses were done using ORIGIN v.8 (Northampton, MA, USA). In the case of contractility experiments we carried out Shapiro's normality test.  $P < 0.05$  was regarded as statistical significant.

## Results

### ■ Time-course of parasitemia and expression of cytokines

C57BL/6 mice were infected with the Colombian *T. cruzi* strain, and the course of infection was determined. The parasitemia peaked at 45 days after infection and was controlled thereafter (Fig. 1a) with practically undetectable circulating parasites at 90 days after infection. Survival was analyzed during the 90 days after infection (Fig. 1b) with expressive death rate between 30–45 days post-infection. Infection with *T. cruzi* induces an increase of the expression of inflammatory cytokines and chemokines [10, 41]. These immune mediators have been implicated in the control of parasitism. Our results demonstrated that, during the early acute phase of *T. cruzi* infection (15 days post-infection) the serum concentration of the cytokines IFN- $\gamma$  and MCP-1/CCL2 were significantly higher (20 and 3.6-fold, respectively) when compared to the baseline levels (Fig. 1ci and cii). The

**Fig. 1** C57BL/6 mice were challenged with 50 parasites of the Colombian strain. Parasitemia (a) and mortality curve (b) are shown. For each datum point presented in the parasitemia curve the average for six animals. Ten animals were used for the mortality study. (c) Quantification by CBA cytometric bead array of IFN- $\gamma$  (ci), MCP-1/CCL2 (cii) and TNF- $\alpha$  (ciii) in the serum from infected C57BL/6 mice with 50 parasites/animal (Colombian) at days 0 ( $n = 2$ ), 15 ( $n = 3$ ), 30 ( $n = 3$ ), 45 ( $n = 2$ ) and 170 ( $n = 5$ ) post-infection. The values shown represent the average plus standard error



serum concentration for both increased further to peak at 30 days after infection. We also measured TNF- $\alpha$  levels during the infection and as depicted in Fig. 1ciii at 30 days post-infection the serum concentration reached its maximum. From the 30th to the 170th day post-infection there was a progressive decrease in the cytokine levels but without reaching the baseline which indicates a sustained inflammation in agreement with previously published results [29, 37, 42]. MCP1/CCL2 showed a sustained high level even at day 170 post infection arguing in favor of a predominant effect during the chronic phase.

### ■ Cellular contractility varies during Chagas' disease

To ascertain whether the onset of circulating cytokines could be associated with cardiac contractility dysfunction, isolated cardiac myocytes contractility measurements from mice sacrificed at 15, 30, 45 and 90 days after infection were performed. It is well known that in hearts from adult mammals, the atria and ventricles have distinctive structural and contractile characteristics as well as heterogeneous electrophysiological properties [34]. Thus, we used isolated myocytes (non-infected and infected) from right atrium (RA), right ventricle (RV) and left ventricle (LV) to assess whether there may be differences in the unloaded shortening during the course of the disease.

Figures 2a–c and 3a–c shows typical experimental records of the load-free cell contraction under steady-

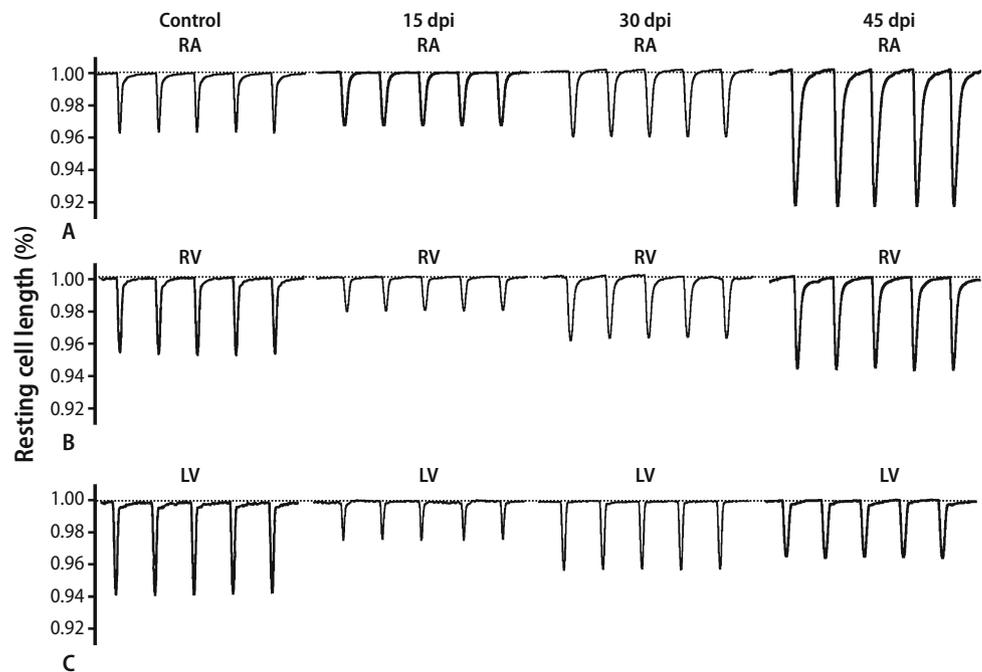
state field stimulation for the different heart regions used in the present study. Each cardiac myocyte was paced at a fixed frequency (1 Hz). In each case, measurements of sarcomere length shortening were made at steady-state and in Tyrode's solution containing 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>. It has been reported [32] that contractile properties of the myocardium may change with age.

We then decided to have two age-matched control groups (30 and 90 days). Our analysis is represented in Fig. 4 and Table 1 that summarizes average data. All parameters changed significantly with few exceptions depending on the region analyzed.

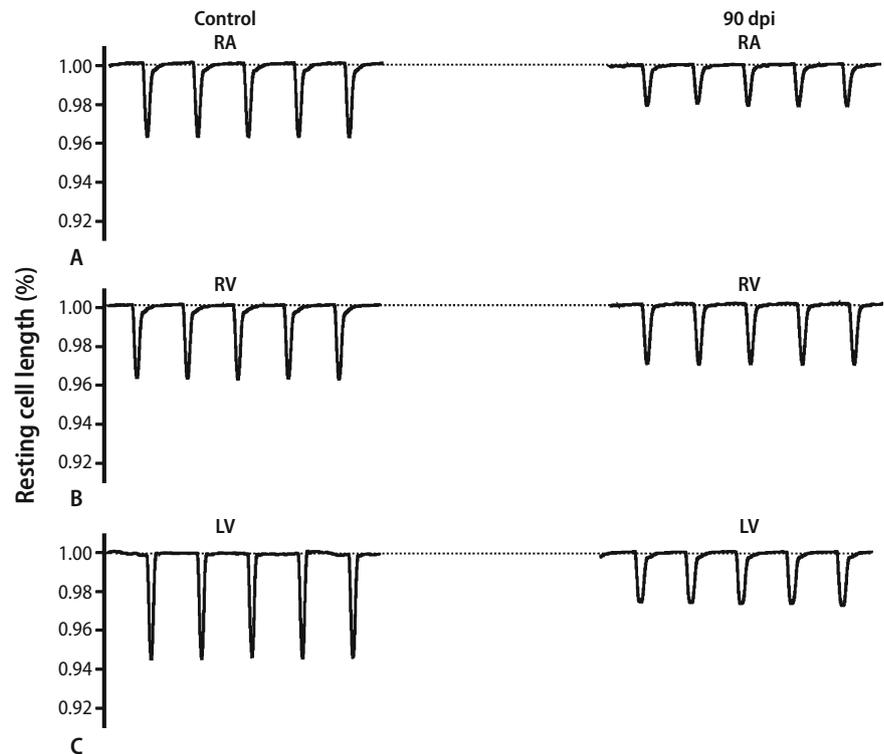
Of note is the observation that at day 15 after infection the differences are large and consistent among unloaded myocytes isolated from RA, RV and LV of the adult mouse heart.

Two important indexes of the phasic contraction of unloaded cardiac myocytes are the maximal velocity of contraction and relaxation. These parameters were calculated as the maximal absolute value of  $dL/dt$ , based on the averaged contractility curve, for each cell studied. Our analysis revealed that the maximal velocities of contraction and relaxation underwent, as the disease progressed, a significant decrease despite of the region or stage analyzed (Table 1). Important to note are the changes observed at 15 and 90 days post-infection. These findings are indicative for a possible connection between initial cytokine expression and the cardiac myocytes remodeling which persists during the chronic stage of the disease.

**Fig. 2** Cardiac cellular contractility in mice. Representative recordings from control mouse (non-infected, first column); 15 dpi (second column); 30 dpi (third column) and 45 dpi (last column). From top to down RA right atrium, RV right ventricle and LV left ventricle. First (a), second (b) and third (c) rows represent RA, RV and LV, respectively



**Fig. 3** Cardiac cellular contractility in mice. Representative recordings from control mouse (non-infected, first column) and 90 dpi (last column). From top to down RA right atrium, RV right ventricle and LV left ventricle. First (a), second (b) and third (c) rows represent RA, RV and LV, respectively



## Discussion

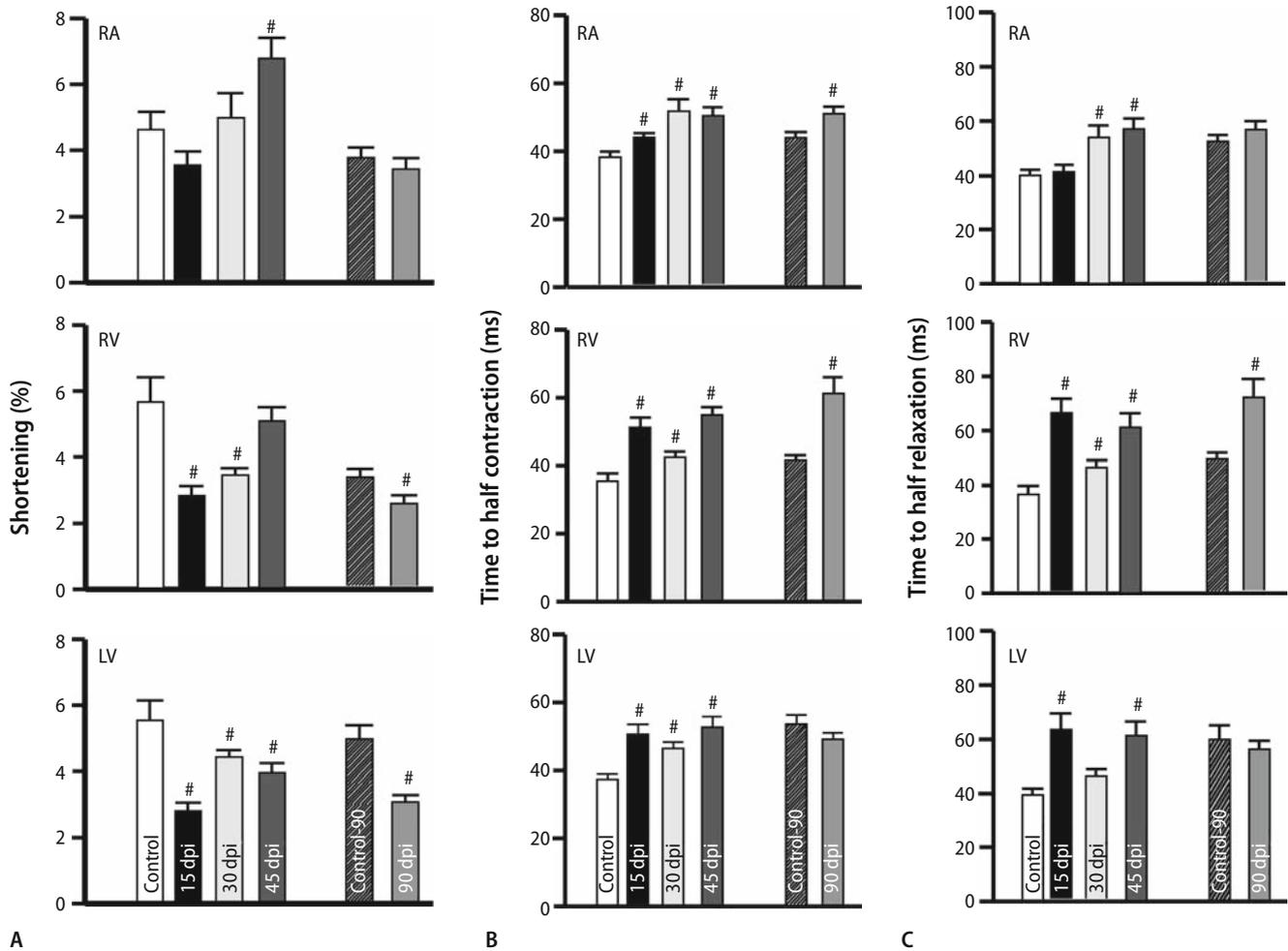
Cardiac malfunction is a serious and frequent complication related to Chagas' disease [13]. Two mechanisms have been postulated to explain the myocardial dysfunction during the course of the infection: (1) the presence of a local inflammatory reaction causing nervous system destruction and extensive heart fibrosis, and (2) which is more complex, consists of the immunological net events, including synergic action of various cytokines [10], generation of oxygen/nitrogen species [43, 44] and the time-dependent auto-immunity [2, 40]. All of these events correlate well with the presence of intracardiac CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and macrophages, which generate IFN- $\gamma$ , MCP-1/CCL2, TNF- $\alpha$ , IL-12, and provokes the induction of antimicrobial immunoglobulins and auto-antibodies [39, 41]. In fact, the autoimmunity hypothesis is strongly supported by the existence of circulating immunoglobulins which specifically react with cardiac  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 adrenergic receptors [23, 26] in chagasic patients and in experimental Chagas' disease [5]. Thus, the immune system appears to be an important subject of research to understand heart remodeling during *T. cruzi* infection.

Thus, the present study demonstrates a possible causal involvement of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and MCP-1/CCL2

as mediators in the signaling pathways that culminates in regional myocardial contractile dysfunction in response to Chagas' disease. Circulating MCP-1/CCL2 and IFN- $\gamma$  serum concentration increased suddenly at 15 dpi without a parallel increase in the number of parasites. Interestingly, the RV and LV contractility were significantly reduced (~50%) at this stage (15 dpi). These results imply a putative role for MCP-1/CCL2 and IFN- $\gamma$  in impairing cardiomyocyte contractility.

As reasoned by Thielmann and colleagues [42] and in line with our findings may be there is no monocausal sequence of events; as a matter of fact, the interaction of these cytokines may be much more complex and needs further investigation in more controlled conditions (e.g. using knock-out models to address specific issues related to the actual influence for each of these cytokines).

Another time-point that deserves attention is 30 dpi where TNF- $\alpha$  concentration rose to approximately 8 times that measured at 15 dpi. This large amount of circulating TNF- $\alpha$  will add up to the other cytokine levels maintaining the contractile dysfunction (see Figs. 1ciii and 4). These results confirm and extend other reports of substantial contractile depression due to TNF- $\alpha$  [42]. Somewhat interesting is the lack of effect (at least in cell shortening) in the RA at 15 and 30 dpi. At 45 dpi (end of acute phase) there was an increase in cell shortening by about 50%



**Fig. 4** Averaged parameters of cell contractility in mice. *Left panel* represents the fractional shortening from RA, RV and LV during the infection (15, 30, 45 and 90 dpi). *Middle panel* represents time to half contraction from RA, RV and LV during the course of the infection. *Right panel* represents the time to half relaxation. #*P* < 0.05 15, 30, 45 and 90 dpi Vs. Controls (30 or 90 days non-infected)

**Table 1** Maximal rate of contraction and relaxation measured during the progression of the Chagas' disease

	Control (30 days)	15 dpi	30 dpi	45 dpi	Control (90 days)	90 dpi
Maximal rate of contraction ( $\mu\text{m/s}$ )						
RA	92.8 $\pm$ 10.5 (22)	61.7 $\pm$ 7.2 (28)*	73.6 $\pm$ 9.7 (16)	90.2 $\pm$ 7.2 (28)	62.6 $\pm$ 4.4 (44)	50.3 $\pm$ 4.3 (40)*
RV	114.8 $\pm$ 14.8 (23)	61.7 $\pm$ 8.4 (30)*	69.1 $\pm$ 4.8 (47)*	69.7 $\pm$ 5.1 (31)*	78.6 $\pm$ 5.3 (41)	44.6 $\pm$ 7.3 (35)*
LV	112.6 $\pm$ 12.7 (28)	53.7 $\pm$ 5.1 (32)*	77.1 $\pm$ 4.5 (50)*	66.3 $\pm$ 5.7 (41)*	95.1 $\pm$ 8.1 (39)	57.7 $\pm$ 4.7 (47)*
Maximal rate of relaxation ( $\mu\text{m/s}$ )						
RA	84.5 $\pm$ 10.6	63.1 $\pm$ 8.5	63.7 $\pm$ 9.7	74.6 $\pm$ 6.9	58.6 $\pm$ 4.1	44.8 $\pm$ 4.1*
RV	99.5 $\pm$ 10.7	49.7 $\pm$ 7.6*	63.1 $\pm$ 4.8*	51.9 $\pm$ 4.9*	67.7 $\pm$ 5.1	39.6 $\pm$ 6.6*
LV	130.4 $\pm$ 18.1	44.5 $\pm$ 4.3*	73.5 $\pm$ 4.5*	53.9 $\pm$ 5.2*	98.5 $\pm$ 11.1	51.9 $\pm$ 4.6*

RA right atrium, RV right ventricle, LV left ventricle. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Number in parenthesis reports the number of different cells used from each heart region

\**P* < 0.05 when compared to Controls (30 and 90 days—non-infected)

a result that is difficult to explain at this moment. In the study of Skyschally and colleagues [37] they argue in favor of a “bidirectional” role attributed to TNF- $\alpha$

which could provide a plausible reason for the distinct RA behavior in our model. In general, RA was the least affected despite the disease stage.

Nowadays, many groups are studying the biological role of cytokines on heart function. However, very little is known about the role of these signaling molecules in the cardiac remodeling which is one important outcome of Chagas' disease. The results presented in Fig. 1 indicate that IFN- $\gamma$  and MCP-1/CCL2 are expressed earlier. These data in parallel with cellular contractility measurements (Fig. 4 and Table 1) it is possible to establish a role for MCP-1/CCL2 and IFN- $\gamma$  in the acute phase of Chagas' disease mainly at 15 days post-infection as we pointed out above. Alterations observed in this study could be due to a direct effect of cytokine in modulating heart physiology and/or due to their ability to directly stimulate cardiomyocytes to produce NO [28]. The hypothesis that cytokines are involved in the myocardium remodeling process is supported by various studies that specifically evaluated the acute and chronic cytokine effects on whole heart function [11, 20]. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  are the most studied cytokines concerning their action on the heart. There are experimental evidences indicating that acute and chronic exposure to these cytokines could depress heart and cardiomyocyte function. This depressive effect is assumed to be related to a reduction of the Ca<sup>2+</sup> transient through a mechanism that involves activation of iNOS that produces an increase in the intracellular NO concentration [1, 11, 31]. Another possibility that has been raised is the reduction of Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the contractile myofilaments [17]. In addition to that there are reports suggesting that IFN- $\gamma$  is able to decrease the production of the cytoskeleton-associated muscle LIM protein which has been described as an important protein involved on the control of cellular contractility machinery [19]. Thus, we showed for the first time that the changes in cardiomyocyte function could be explained by the increased levels of the three cytokines identified in this study.

Despite the fact that TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  have been well studied there are few reports about the MCP-1/CCL2 effects on heart tissue [30]. However, MCP-1/CCL2 participates in the recruitment of macrophages to the heart tissue leading to the stimulation of TGF- $\beta$ , IL-10, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  release [8, 9, 36]. Therefore, a likely conclusion is that MCP-1/CCL2 expression raises during the acute stage and this should signalize to the cardiac myocytes to produce other molecules

responsible for the control of the parasitemia. In fact, among all chemokines tested, MCP-1/CCL2 is an important inducer of iNOS activity in *T. cruzi* infected cardiomyocytes [27].

We hypothesized that MCP-1/CCL2 would have a distinct function in the chronic stage. In a model of myocarditis induced by antibody against myosin heavy chain it is proposed that MCP-1/CCL2 is the main effector to the establishment of the inflammatory process [16, 18, 21]. Our data suggest that MCP-1/CCL2 may have a pivotal role in the chronic stage of the disease especially concerning the cardiac cell dysfunction.

To the best of our knowledge this is the first report investigating in detail the changes in cellular cardiac contractility in isolated myocytes from different heart regions in response to infection with *T. cruzi*. Taken all data together we can conclude that in Chagas' disease, in addition to the classical function attributed to the cytokines that is the parasitemia control, these molecules may play an important role on the process of cardiac remodeling which is a remarkable feature of the chagasic cardiopathy. The detailed cellular mechanisms should be addressed in future studies to uncover the participation of each cytokine on the heart physiology during the development of Chagas' disease.

---

## Conclusion

This study provided new information about heart remodeling during experimental Chagas' disease. We found that cellular contractility was altered, with a significant reduction in fractional shortening in isolated cardiomyocytes from right atrium, left and right ventricles. These changes were observed throughout the disease stages and it is reasonable to suppose that TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and MCP-1/CCL2 production is somehow correlated with the reduced cardiomyocyte performance. Lastly, our data suggests an important role for cytokines to generate heart remodeling in Chagas' disease.

■ **Acknowledgments** This work was supported by Fapemig, CNPq and CAPES.

## References

1. Amadou A, Nawrocki A, Best-Belhomme M, Pavoine C, Pecker F (2002) Arachidonic acid mediates dual effect of TNF-alpha on  $Ca^{2+}$  transients and contraction of adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1339–C1347
2. Andrade ZA (1999) Immunopathology of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:71–80
3. Avila G, Medina IM, Jimenez E, Elizondo G, Aguilar CI (2007) Transforming growth factor-1 decreases cardiac muscle L-type  $Ca^{2+}$  current and charge movement by acting on the Cav1.2 mRNA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H622–H633
4. Bestetti RB, Rossi MA (1997) A rationale approach for mortality risk stratification in Chagas' heart disease. *Int J Cardiol* 58:199–209
5. Borda ES, Sterin-Borda L (1996) Anti-adrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 54:149–156
6. Brener Z (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop* 4:389–396
7. Control of Chagas' disease: Second Report of the WHO Expert Committee. Geneva, Switzerland: World Health Organization; (2002) Technical report series 905
8. Damas JK, Aukrust P, Ueland T, Odegaard A, Eiken HG, Gullestad L, Sejersted OM, Christensen G (2001) Monocyte chemoattractant protein-1 enhances and interleukin-10 suppresses the production of inflammatory cytokines in adult rat cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 96:345–352
9. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG (2005) CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 96:881–889
10. dos Santos PV, Roffe E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J (2001) Prevalence of CD8(+)/alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)/LFA-1(High)/VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microb Infect* 3:971–984
11. Duncan DJ, Hopkins PM, Harrison SM (2007) Negative inotropic effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are ameliorated by alfentanil in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 150:720–726
12. Egman DM, Leon JS (2002) Pathogenesis of Chagas' heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop* 81:123–132
13. Fernandez-Culasso A, Pagline-Olivia P, Palma JA, Lacuara JL (1991) Isometric developed tension and histopathology of myocardium of chagasic mice: part 1. *APPTLA* 41:397–404
14. Fernandez-Velasco M, Ruiz-Hurtado G, Hurtado O, Moro MA, Delgado C (2007) TNF-alpha downregulates transient outward potassium current in rat ventricular myocytes through iNOS overexpression and oxidant species generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H238–H245
15. Frederici EE, Albemann WH, Neva FA (1964) Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H Mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 13:272–280
16. Fuse K, Kodama M, Hanawa H, Okura Y, Ito M, Shiono T, Maruyama S, Horino S, Kato K, Watanabe K, Aizawa Y (2001) Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in myocarditis. *Clin Exp Immunol* 124:346–352
17. Goldhaber JJ, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, Weiss JN (1996) Effects of TNF-alpha on  $[Ca^{2+}]_i$  and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 271:H1449–H1455
18. Goser S, Ottl R, Brodner A, Dengler TJ, Torzewski J, Egashira K, Rose NR, Katus HA, Kaya Z (2005) Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1alpha in induction of experimental autoimmune myocarditis and effective anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy. *Circulation* 112:3400–3407
19. Heinele J, Kempt T, Kraft T, Hilfiker A, Morawietz H, Scheubel RJ, Caroni P, Lohmann SM, Drexler H, Wollert KC (2003) Downregulation of cytoskeletal muscle LIM protein by nitric oxide: impact on cardiac myocyte hypertrophy. *Circulation* 107:1424–1432
20. Janczewski AM, Kadokami T, Lemster B, Frye CS, McTiernan CF, Feldman AM (2003) Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice overexpressing TNF-alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H960–H969
21. Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, Gordillo G, Klenotic S, Orosz C, Parker-Thornburg J (1998) Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. *Am J Pathol* 152:101–111
22. Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, SAbbadini RA (1995) TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type  $Ca^{2+}$  current and  $Ca^{2+}$  transients. *FEBS Lett* 376:24–30
23. Labovsky V, Smulski CR, Gómez K, Levy G, Levin MJ (2007) Anti-beta1-adrenergic receptor autoantibodies in patients with chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol* 148:440–449
24. Lauton-Santos S, Guatimosin S, Castro CH, Oliveira FA, Almeida AP, Dias-Peixoto MF, Gomes MA, Pessoa P, Pesquero JL, Bader M, Cruz JS (2007) Kinin B1 receptor participates in the control of cardiac function in mice. *Life Sci* 81:814–822
25. Liu SJ, Zhou W, Kennedy R (1999) Suppression of b-adrenergic responsiveness of L-type  $Ca^{2+}$  current by IL-1b in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276:141–148
26. Lopez-Bergami P, Scaglione J, Levin MJ (2001) Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J* 15:2602–2612
27. Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS (2000) *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102:3003–3008
28. Machado FS, Souto JT, Rossi MA, Esper L, Tanowitz HB, Aliberti J, Silva JS (2008) Nitric oxide synthase 2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi* infected cardiac myocyte. *Microb Infect*. doi:10.1016/j.micinf.2008.09.009
29. Medina FA, Cohen AW, de Almeida CJ, Nagajothi F, Braunstein VL, Teixeira MM, Tanowitz HB, Lisanti MP (2007) Immune dysfunction in caveolin-1 null mice following infection with *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Microb Infect* 9:325–333

30. Morimoto H, Hirose M, Takahashi M, Kawaguchi M, Ise H, Kolattukudy PE, Yamada M, Ikeda U (2008) MCP-1 induces cardioprotection against ischaemia/reperfusion injury: role of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 78:554–562
31. Muller-Werdan U, Engelmann H, Werdan K (1998) Cardiodepression by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Eur Cytokine Netw* 9:689–691
32. Nair RR, Nair P (2001) Age-dependent variation in contractility of adult cardiac myocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 32:119–125
33. Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, Wire E (2001) Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocyte. *J Exp Biol* 204:1191–1199
34. Nerbonne JM, Kass RS (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85:1205–1253
35. Sheddon M, Shah AM, Casadei B (2007) Cardiomyocyte as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* 75:315–326
36. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Alberti JC, Cunha FQ (1995) Tumor necrosis factor  $\alpha$  mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 63:4862–4867
37. Skyschally A, Gres P, Hoffmann S, Haude M, Erbel R, Schulz R, Heusch G (2007) Bidirectional role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in coronary microembolization. *Circ Res* 100:140–146
38. Tarleton RL (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas' disease. *Int J Parasitol* 31:550–554
39. Tarleton RL (2007) Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* 19:430–434
40. Teixeira AR, Teixeira ML, Santos-Buch CA (1975) The immunology of experimental Chagas' disease. IV: production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am J Pathol* 80:163–180
41. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS (2002) Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol* 18:262–265
42. Thielmann M, Dorge H, Martin C, Belosjorow S, Schwanke U, de Sand AV, Konietzka I, Buchert A, Kruger A, Schulz R, Heusch G (2002) Myocardial dysfunction with coronary microembolization. *Circ Res* 90:807–813
43. Wen JJ, Vyatkina G, Garg N (2004) Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic Biol Med* 37:1821–1833
44. Wen JJ, Yachelini PC, Sembaj A, Manzur RE, Garg NJ (2006) Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radic Biol Med* 41:270–276
45. Yndestad A, Damas JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P (2007) Role of inflammation in the progression of heart failure. *Curr Cardiol Rep* 9:236–241
46. Zhang C (2008) The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 103:398–406

## Dysautonomia Due to Reduced Cholinergic Neurotransmission Causes Cardiac Remodeling and Heart Failure<sup>∇‡</sup>

Aline Lara,<sup>1†</sup> Denis D. Damasceno,<sup>1†</sup> Rita Pires,<sup>2†</sup> Robert Gros,<sup>2,8†</sup> Enéas R. Gomes,<sup>1</sup> Mariana Gavioli,<sup>1</sup> Ricardo F. Lima,<sup>1</sup> Diogo Guimarães,<sup>1</sup> Patricia Lima,<sup>3</sup> Carlos Roberto Bueno, Jr.,<sup>4</sup> Anilton Vasconcelos,<sup>5</sup> Danilo Roman-Campos,<sup>7</sup> Cristiane A. S. Menezes,<sup>2</sup> Raquel A. Sirvente,<sup>11</sup> Vera M. Salemi,<sup>11</sup> Charles Mady,<sup>11</sup> Marc G. Caron,<sup>6</sup> Anderson J. Ferreira,<sup>3</sup> Patricia C. Brum,<sup>4</sup> Rodrigo R. Resende,<sup>10</sup> Jader S. Cruz,<sup>7</sup> Marcus Vinicius Gomez,<sup>12</sup> Vania F. Prado,<sup>2,8,9</sup> Alvaír P. de Almeida,<sup>1</sup> Marco A. M. Prado,<sup>2,8,9\*</sup> and Silvia Guatimosim<sup>1\*</sup>

*Departments of Physiology and Biophysics,<sup>1</sup> Morphology,<sup>3</sup> Pathology,<sup>5</sup> and Biochemistry and Immunology,<sup>7</sup> Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil; Roberts Research Institute<sup>2</sup> and Department of Physiology and Pharmacology<sup>8</sup> and Department of Anatomy and Cell Biology,<sup>9</sup> Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, London, Ontario N6A 5K8, Canada; School of Physical Education and Sport<sup>4</sup> and Cardiomyopathy Unit, Heart Institute (InCor),<sup>11</sup> University of São Paulo, São Paulo, São Paulo CEP 05508-900, Brazil; Department of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710<sup>6</sup>; Department of Physics, Institute of Exact Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 31270-901, Brazil<sup>10</sup>; and Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP 30130-100, Brazil<sup>12</sup>*

Received 28 July 2009/Returned for modification 3 September 2009/Accepted 8 January 2010

**Overwhelming evidence supports the importance of the sympathetic nervous system in heart failure. In contrast, much less is known about the role of failing cholinergic neurotransmission in cardiac disease. By using a unique genetically modified mouse line with reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) and consequently decreased release of acetylcholine, we investigated the consequences of altered cholinergic tone for cardiac function. M-mode echocardiography, hemodynamic experiments, analysis of isolated perfused hearts, and measurements of cardiomyocyte contraction indicated that VACHT mutant mice have decreased left ventricle function associated with altered calcium handling. Gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase PCR and Western blotting, and the results indicated that VACHT mutant mice have profound cardiac remodeling and reactivation of the fetal gene program. This phenotype was attributable to reduced cholinergic tone, since administration of the cholinesterase inhibitor pyridostigmine for 2 weeks reversed the cardiac phenotype in mutant mice. Our findings provide direct evidence that decreased cholinergic neurotransmission and underlying autonomic imbalance cause plastic alterations that contribute to heart dysfunction.**

The role of sustained cholinergic tone in long-term cardiac function is poorly understood. Cardiac regulation by the parasympathetic nervous system is mediated primarily by acetylcholine (ACh) binding to the M<sub>2</sub> muscarinic ACh receptor (M<sub>2</sub>-AChR) (12). In addition, cholinergic tone also controls sympathetic activity, as preganglionic neurotransmission is cholinergic in the two branches of the autonomic nervous system. Reduced parasympathetic function occurs during aging (11) and has been observed for patients with several disorders that ultimately affect cardiac

function, such as heart failure (15), diabetes (29), and hypertension (13, 50). Moreover, excessive adrenergic activation in association with diminished parasympathetic activity is detrimental in cases of heart failure (35). Recent studies demonstrated that M<sub>2</sub>-AChR knockout (KO) mice exhibit impaired ventricular function and increased susceptibility to cardiac stress, suggesting a protective role of the parasympathetic nervous system in the heart (26). In support of this hypothesis, vagal stimulation has been shown to be of benefit in cases of heart failure (28). While most of these studies focus on possible protective actions of vagal activity and their relation to arrhythmogenesis, the mechanisms associated with the regulation of ventricular contractility by cholinergic neurotransmission are still unclear.

ACh-mediated signaling plays important roles in maintaining synaptic connections during development (5, 9, 32); hence, chronic disturbance of cholinergic tone, as observed in cases of dysautonomia, could contribute to altered myocardial function. Rich cholinergic innervations are found in the sinoatrial node (SAN), the atrial myocardium, the atrioventricular node, and the ventricular conducting system in many species (24).

\* Corresponding author. Mailing address for Silvia Guatimosim: Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG CEP 31270-901, Brazil. Phone: 55 (31) 3409-2952. Fax: 55 (31) 3409-2924. E-mail: guatimosim@icb.ufmg.br. Mailing address for Marco A. M. Prado: Roberts Research Institute, University of Western Ontario, P.O. Box 5015, 100 Perth Drive, London, ON N6A 5K8, Canada. Phone: (519) 663-5777, ext. 36888. Fax: (519) 663-3789. E-mail: mprado@robarts.ca.

† These authors contributed equally to this work.

‡ Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 1 February 2010.

Although less abundant, parasympathetic fibers are also found throughout the ventricles, where stimulation of  $M_2$ -AChR by ACh leads to L-type calcium channel inhibition and consequently reduced cardiomyocyte contractility (34).

Genetic disturbance of cholinergic neurotransmission in animal models is complicated, due to the requirement of ACh release to sustain motor function. Thus, the consequences of chronically reduced cholinergic neurotransmission for long-term cardiac function and molecular remodeling have not been studied in detail until now. Given the abundance of acetylcholine receptors, it is likely that genetic disturbance of individual receptors may not reveal all the consequences of decreased cholinergic tone. We have recently generated a mouse model of cholinergic dysfunction (VACHT knockdown, homozygous [VACHT  $KD^{HOM}$ ]) by targeting using homologous recombination for the vesicular ACh transporter (VACHT), a protein responsible for packaging ACh in secretory vesicles (41). VACHT  $KD^{HOM}$  mice have an approximately 70% reduction in the levels of VACHT (41). Here, we used this unique mouse model to investigate whether long-term reduction of cholinergic neurotransmission affects cardiac physiology.

The present studies demonstrate that autonomic imbalance, due to chronic decrease of cholinergic neurotransmission in VACHT mutant mice, is associated with altered gene expression that underlies a heart dysfunction phenotype. Additionally, we show that enhancement of cholinergic activity is beneficial in improving cardiac alterations in VACHT mutant mice. Our findings provide novel insights on mechanisms and compensatory changes found in hearts subjected to prolonged alterations in autonomic regulation. These data support the notion that the cholinergic system is an important pharmacological target in heart failure.

## MATERIALS AND METHODS

**Animal models and drug administration.** VACHT mutant mice (VACHT  $KD^{HOM}$ ) were described previously (41). VACHT mutant mice were generated by targeting the 5' untranslated region of the VACHT gene by homologous recombination in a mixed 129S6/SvEvTac  $\times$  C57BL/6J background and were backcrossed to C57BL/6Uni (from the University of Campinas) for 3 generations (N3), as further backcrossing into the C57BL/6 background caused infertility (data not shown). Heterozygous mice were intercrossed to generate the VACHT mutant and wild-type controls used in these experiments. Wild-type and mutant mice 1, 3, or 6 months old were used in this study for evaluation of cardiac function and myocyte  $Ca^{2+}$  transients. Pyridostigmine (Pyr; Sigma) administration to mice was performed twice daily by intraperitoneal injection for two weeks (1 mg/kg body weight).

VACHT-null mice (VACHT<sup>del/del</sup>), in which the VACHT open reading frame (ORF) was deleted by using Cre/loxP, were described previously (9). VACHT<sup>del/del</sup> mice die shortly after birth due to respiratory failure; therefore, experiments were performed with embryonic day 18.5 (E18.5) embryos. VACHT<sup>wtd/del</sup> mice were intercrossed to generate the VACHT-null mice.

Animals were housed in groups of three to five per cage in a temperature-controlled room with 12-h/12-h light/dark cycles in microisolator cages. Food and water were provided *ad libitum*.

Animals were maintained at the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil, and at the University of Western Ontario in accordance with NIH guidelines for the care and use of animals. Experiments were performed according to approved animal protocols from the Institutional Animal Care and Use Committee at the UFMG and at the University of Western Ontario.

**Hemodynamic measurements.** Invasive left ventricle (LV) hemodynamic measurements were made using a Millar Mikro-tip pressure transducer (Millar Instruments, Houston, TX) as previously described (20, 33, 51). LV parameters, according to the blood pressure module in Chart analysis software (PowerLab; AD Instruments), were obtained at the baseline and following the administration

of isoproterenol (ISO; 0.02  $\mu$ g or 0.5  $\mu$ g intraperitoneally [i.p.]) as previously described for anesthetized mice (17).

**M-mode echocardiography.** Cardiac function under noninvasive conditions was assessed by two-dimensional guided M-mode echocardiography of halothane-anesthetized mice as previously described (2). Heart rates (HRs) recorded under this condition were  $541.5 \pm 21.4$  beats per min (bpm) for the wild-type (WT) mice (8 mice),  $520.2 \pm 25.2$  bpm for the VACHT  $KD^{HOM}$  mice (5 mice), and  $549.0 \pm 23.4$  bpm for the VACHT  $KD^{HOM}$  mice with Pyr (5 mice).

**Electrocardiography.** A dorsally mounted radio frequency transmitter and wire leads (lead II configuration) were implanted subcutaneously under anesthesia. Chronic electrocardiogram (ECG) recordings from conscious mice were acquired with the Data Sciences International telemetry system (Transoma Medical, St. Paul, MN) as previously described (33). ECG recordings were initiated following a minimum of 7 days postimplantation. HR and HR variability (HRV) parameters were obtained and analyzed under basal (saline), atropine (1 mg/kg, i.p.), propranolol (1 mg/kg, i.p.), or atropine-plus-propranolol conditions by using the Dataquest A.R.T. software (Transoma Medical). The analysis for both HR and HRV was performed 15 min following administration of drugs.

**Cardiomyocyte isolation and  $Ca^{2+}$  recordings.** Adult ventricular myocytes were freshly isolated and stored in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) until they were used (within 6 h) as previously described (21). Intracellular  $Ca^{2+}$  imaging experiments were performed with Fluo-4 AM (10  $\mu$ M; Invitrogen, Eugene, OR)-loaded cardiomyocytes for 25 min, and these were subsequently washed with an extracellular solution that contained 1.8 mmol/liter  $Ca^{2+}$  to remove the excess dye. Cells were electrically stimulated at 1 Hz to produce steady-state conditions. The confocal line-scan imaging was performed with a Zeiss LSM 510META confocal microscope. The amplitude of the  $Ca^{2+}$  transient evoked by the application of a  $Ca^{2+}$ - and  $Na^{+}$ -free solution containing 10 mM caffeine was used as an indicator of the SR  $Ca^{2+}$  load (36). Cells were subjected to a series of preconditioning pulses (1 Hz) before caffeine was applied.  $Ca^{2+}$  spark frequencies in resting ventricular myocytes were recorded. Digital image processing was performed by using custom-devised routines created with the IDL programming language (Research Systems, Boulder, CO). The  $Ca^{2+}$  level was reported as  $F/F_0$  (or as  $\Delta F/F_0$ ), where  $F_0$  is the resting  $Ca^{2+}$  fluorescence.

**Langendorff preparation-perfused hearts.** Briefly, once removed from the animal, the heart was perfused with a Krebs-Ringer solution, which was delivered at 37°C with continuous gassing with 5%  $CO_2$  to yield a physiological pH of 7.4. Hearts were perfused with this solution for 50 min as previously described for mice and rats (6, 14).

**Histological assessment of cardiac fibrosis.** In both WT and VACHT  $KD^{HOM}$  groups, the fibrotic area in the LV and interventricular septum (IS) was evaluated by Masson's trichrome staining. Whole hearts were harvested, fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin, and cut into sections 6  $\mu$ m thick. Tissue sections were collected from atrial and ventricular regions, mounted on slides, and postfixed in Bouin's solution. After a series of xylene and alcohol washes were performed, slides were stained with Weigert's hematoxylin and Masson's trichrome staining solutions. Then, slides were subjected to increased concentrations of alcohol and xylene and mounted with Entellan.

**Quantitative PCR.** For RNA purifications, tissues were grounded in a potter with a pestle with liquid nitrogen, and total RNA was extracted using Trizol. For quantitative PCR (qPCR), total RNA was treated with DNase I (Ambion, Austin, TX), and first-strand cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA transcription kit (Applied Biosystems, CA) according to the manufacturer's instructions. After reverse transcription, the cDNA was subjected to qPCR on a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, CA) by using Power SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, CA). Briefly, amplification was carried out in a total volume of 20  $\mu$ l containing 0.5  $\mu$ M each primer, 10  $\mu$ l of Power SYBR green master mix (2 $\times$ ), and 1  $\mu$ l of cDNA. The PCRs were cycled 45 times after initial denaturation (95°C, 2 min) with the following parameters: 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. For each experiment, a nontemplate reaction was included as a negative control. In addition, the absence of DNA contaminants was assessed in reverse transcriptase-negative samples. Melting curve analysis of amplification products was performed by cooling the samples to 60°C and then increasing the temperature to 95°C at 0.1°C/s. The specificity of the PCRs was also confirmed by size verification of the amplicons in acrylamide gel. Relative quantification of gene expression was done with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, using the  $\beta$ -actin gene expression to normalize the data. Sequences of primers used are available upon request.

**Immunofluorescence.** Images were acquired with an Axiovert 200 M microscope coupled with the ApoTome system or a Leica SP5 confocal microscope to obtain optical sections of the tissue. Objectives used were 20 $\times$  dry, 40 $\times$  water immersion (1.2 numerical aperture [NA]), and 63 $\times$  oil immersion (1.4 NA). Adult VACHT  $KD^{HOM}$  and WT mice were anesthetized with ketamine and

xylazine (70 and 10 mg/kg i.p., respectively) and transcardially perfused with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, for 10 min, followed by an ice-cold solution of methanol containing 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 10 min. Immunofluorescence was performed as previously described (10). Slices were incubated for 15 to 18 h with primary antibodies anti-VACHT (rabbit polyclonal, 1:250; Sigma Chemical Co., São Paulo, Brazil) and CHT1 (rabbit polyclonal, 1:250; kindly provided by R. Jane Rylett, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada).

Immunofluorescence of adult ventricular cardiomyocytes was performed on cells fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized with 0.5% saponin. Anti- $\alpha$ -actinin antibody (Sigma) was used at a dilution of 1:200. Secondary antibody-conjugated to Alexa Fluor 488 or 543 (Molecular Probes) was used at a dilution of 1:1,000, and nuclear staining was performed using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) in a dilution of 1:1,000. Cardiomyocyte cellular area in  $\alpha$ -actinin-stained cells was measured.

**Cardiomyocyte morphometry.** The mice were anesthetized with 10% ketamine–2% xylazine (4:3, 0.1 ml/100 g, i.p.), and heartbeat was stopped in diastole by using 10% KCl (intravenous [i.v.]). Hearts were placed in 4% Bouin's fixative for 24 h at room temperature. The tissues were dehydrated by sequential washes with 70, 80, 90, and 100% ethanol and embedded in paraffin. Transversal sections (5  $\mu$ m) were cut starting from base area of the heart at intervals of 40  $\mu$ m and stained with hematoxylin-eosin for cell morphometry. Tissue sections (2 from each animal) were examined with a light microscope (BX 41; Olympus) at  $\times 400$  magnification, photographed (Q Color 3; Olympus), and analyzed with ImageJ software. Only digitized images of cardiomyocytes cut longitudinally with nuclei and cellular limits visible were used for analysis (an average of 40 cardiomyocytes for each animal). The diameter of each myocyte was measured across the region corresponding to the nucleus.

**Whole-heart morphometry.** Transversal heart sections (5  $\mu$ m) were cut starting from base area of the heart at intervals of 40  $\mu$ m and stained with hematoxylin-eosin. The area of cardiac mass was obtained by subtracting the left and right ventricle chamber areas from the total area of the heart and expressed as a percentage of the total area. Images with  $\times 20$  magnification were captured using a Q Color 3 camera (Olympus) to measure ventricular and total tissue areas.

**Whole-cell patch clamp and action potential recordings.** An EPC-9.2 instrument (HEKA Electronics) was used to patch clamp single ventricular cardiomyocytes in whole-cell voltage and current clamp configurations, using specific protocols according to the ionic conductance evaluated (8, 36, 42). Measurements started 5 min after breaking into the cell in order to attain equilibrium between the pipette solution and the cell cytoplasm. For action potential (AP) recordings, the pipette solution consisted of 130 mmol/liter K-aspartate, 20 mmol/liter KCl, 10 mmol/liter HEPES, 2 mmol/liter  $MgCl_2$ , 5 mmol/liter NaCl, and 5 mmol/liter EGTA (set to pH 7.2 with KOH). Modified Tyrode used as bath solution contained 140 mmol/liter NaCl, 5.4 mmol/liter KCl, 1 mmol/liter  $MgCl_2$ , 1.8 mmol/liter  $CaCl_2$ , 10 mmol/liter HEPES, and 10 mmol/liter glucose (set at pH 7.4). Current injections triggered action potentials at a constant rate (1 Hz).

For L-type  $Ca^{2+}$  current ( $I_{CaL}$ ) recordings, the pipette solution contained 120 mM CsCl, 20 mM tetraethylammonium chloride (TEACl), 5 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA (set to pH 7.2 with CsOH). The bath solution was modified Tyrode solution.  $I_{Ca}$  was elicited by depolarization steps from  $-40$  to  $50$  mV for 300 ms from a holding potential of  $-80$  mV at a frequency of 0.1 Hz and sample frequency of 10 kHz. To inactivate  $Na^+$  current ( $I_{Na}$ ), we used a prepulse from  $-80$  to  $-40$  mV with a duration of 50 ms.  $\beta$ -Adrenergic stimulation of cells was produced by the addition of 100 nmol/liter isoproterenol to modified Tyrode solution for 3 min. All experiments were carried out at room temperature (23 to 26°C).

**Western blotting.** Forty to 60  $\mu$ g of protein was separated by SDS-PAGE. Antibodies used were anti-SERCA2 and antiphospholamban (anti-PLN) (ABR), anti-phospho-PLN (Ser-16) (Upstate), anti-phospho-PLN (Thr-17) (Badrilla), anti-troponin I (TnI) and anti-phospho-TnI (Cell Signaling), and anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma Chemical Co.). Immunodetection was carried out using enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences). Protein levels were expressed as ratios of optical densities.  $\alpha$ -Tubulin was used as a control for any variations in protein loading.

**Statistical analysis.** All data are expressed as means  $\pm$  standard errors of the means (SEM), and the numbers of cells or experiments ( $n$ ) are shown. Significant differences between groups were determined with Student's  $t$  test or an analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post hoc test.  $P$  values of  $<0.05$  were considered to be statistically significant.

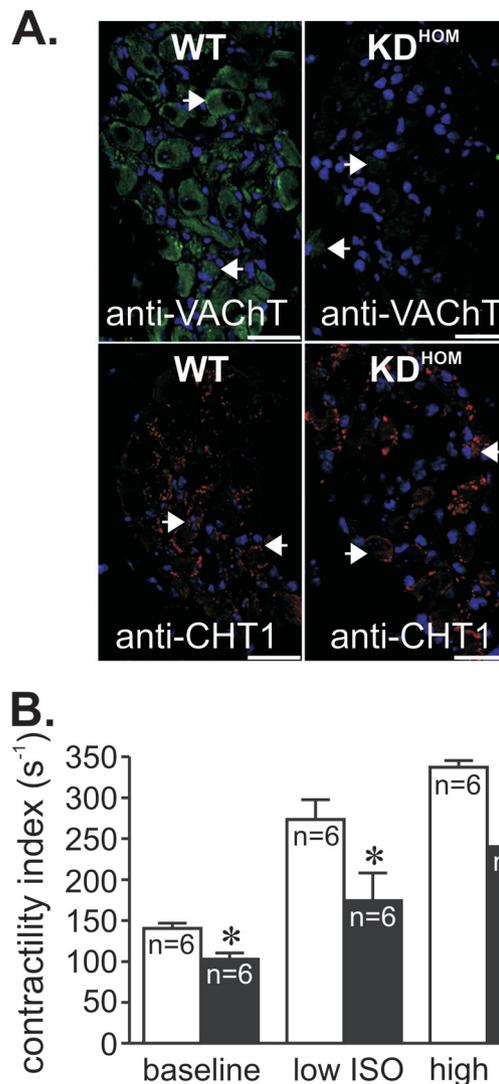


FIG. 1. VACHT mutant mice present heart failure. (A) VACHT and CHT1 immunoreactivity in neurons of adult WT and VACHT  $KD^{HOM}$  mouse intracardiac ganglia. Note the reduction in immunofluorescence for VACHT. There was no decrease in immunoreactivity in nodal ganglia of VACHT  $KD^{HOM}$  stained with an antibody against the high-affinity choline transporter (CHT1). Blue labeling corresponds to nuclei stained with DAPI that seem to predominantly label glial cells. Arrowheads indicate some of the neuronal cell bodies in the ganglia. Bar = 20  $\mu$ m. (B) Left ventricle function (as assessed by contractility index) in VACHT  $KD^{HOM}$  mice (black bars) and WT mice (white bars). VACHT mutant mouse hearts had decreased contractility indexes and lower absolute responses to ISO. n, number of mice; \*,  $P$  value of  $<0.05$  in comparison with the WT.

## RESULTS

**Decreased cholinergic neurotransmission in VACHT  $KD^{HOM}$  mice causes heart failure.** VACHT  $KD^{HOM}$  mice have previously been shown to have reduced VACHT expression and altered ACh release (41; R. F. Lima, V. F. Prado, M. A. Prado, and C. Kushmerick, submitted for publication). In agreement with these previous observations, hearts from 3-month-old VACHT  $KD^{HOM}$  mice had decreased VACHT immunoreactivity in intracardiac ganglia (Fig. 1A; arrowheads indicate some of the

TABLE 1. Hemodynamic parameters for WT and VACHT KD<sup>HOM</sup> mice under baseline and isoproterenol stimulation conditions<sup>a</sup>

Parameter	Baseline <sup>b</sup>		Isoproterenol <sup>b</sup>	
	WT	VACHT KD <sup>HOM</sup>	WT	VACHT KD <sup>HOM</sup>
HR (bpm)	277 ± 26	240 ± 15	621 ± 22	509 ± 43*
LVSP (mm Hg)	104.0 ± 2.4	86.2 ± 6.0*	111.8 ± 10.9	90.7 ± 4.4
LVEDP (mm Hg)	8.3 ± 1.7	11.8 ± 2.4	1.2 ± 1.2	7.5 ± 2.0*
+dP/dt <sub>max</sub> (mm Hg/s)	7,245 ± 388	4,640 ± 573*	16,615 ± 866	10,798 ± 1,295*
-dP/dt <sub>min</sub> (mm Hg/s)	6,739 ± 478	4,591 ± 637*	9,163 ± 436	6,448 ± 375*

<sup>a</sup> HR, heart rate; LVSP, left ventricle systolic pressure; LVEDP, left ventricle end diastolic pressure; +dP/dt<sub>max</sub>, maximum first derivative of the change in left ventricle pressure; -dP/dt<sub>min</sub>, minimum first derivative of the change in left ventricle pressure; \*, P value of <0.05 in comparison to the wild-type value.

<sup>b</sup> Values are means ± SEM (n = 6).

neuronal cell bodies) compared to the WT. In contrast, there was no decrease in immunoreactivity in VACHT KD<sup>HOM</sup> mouse nodal ganglia stained with an antibody against the high-affinity choline transporter (CHT1). These results confirm previous assessments of VACHT and CHT1 expression in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice (10, 41). We have shown previously that a constitutive lack of cholinergic tone affects skeletal muscle function and ability to perform exercise in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice (41). Moreover, the lack of VACHT in KO mice affects skeletal muscle development (9). In order to determine if the constitutive decrease in cholinergic tone could affect cardiomyocytes and, hence, heart physiology, we performed invasive hemodynamic assessments on anesthetized mice. These experiments revealed a reduced contractility index (maximum first derivative of the change in left ventricle pressure [dP/dt] divided by the LV pressure at the time of maximum dP/dt) in the hearts of 3-month-old VACHT KD<sup>HOM</sup> mice compared to that of WT controls (Fig. 1B). Peak left ventricle systolic pressure and the maximum rates of LV pressure rise and fall (peak +dP/dt and -dP/dt, respectively) were also significantly lower in VACHT mutants than in WT mice under baseline conditions (Table 1). Furthermore, an attenuated response to ISO by VACHT mutants was evident (Fig. 1B and Table 1). Although the absolute effect shows a decrease in the ISO-mediated response by VACHT mutants, the relative increases in contractility index were not significantly different between WT and VACHT mutants. In order to investigate the progression of cardiac dysfunction in VACHT mutants, we have also performed hemodynamic assessments of 1-month-old VACHT mutant mice. In contrast to 3-month-old mice according to the obtained data, younger mice did not show differences in the contractility index under either baseline (WT, 134 ± 22 s<sup>-1</sup> [n = 4]; VACHT KD<sup>HOM</sup>, 135 ± 6 s<sup>-1</sup> [n = 5]) or maximal ISO stimulation (WT, 251 ± 17 s<sup>-1</sup> [n = 4]; VACHT KD<sup>HOM</sup>, 303 ± 24 s<sup>-1</sup> [n = 5]) conditions. Therefore, all subsequent experiments were performed with 3-month-old mice.

To ascertain the extension of cardiac dysfunction in 3-month-old VACHT KD<sup>HOM</sup> mice “*in vivo*,” we performed two-dimensional M-mode echocardiography. As shown in Fig. 2A, VACHT KD<sup>HOM</sup> mice displayed reduced left ventricle fractional shortening, consistent with the heart dysfunction illustrated in Fig. 1B. To further confirm that the decreased baseline fractional shortening was indeed the result of altered cholinergic function *in vivo*, we treated VACHT KD<sup>HOM</sup> mice for 2 weeks with a cholinesterase inhibitor, with the rationale that pharmacological restoration of ACh at synapses might rescue the phenotype and improve cardiac function in mutant mice. Administration of pyridostigmine for 2 weeks signifi-

cantly increased fractional shortening of VACHT KD<sup>HOM</sup> mice toward control levels (Fig. 2A). To further assess directly the heart dysfunction in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice without the complication of extensive regulation by the autonomic nervous system, we used the Langerdorff isolated heart preparation. In agreement with the results obtained with echocardiography studies, isolated hearts from VACHT KD<sup>HOM</sup> mice had significantly decreased systolic tension compared to WT hearts (Fig. 2B). Pyridostigmine treatment of animals for 2 weeks also reversed the decreased systolic tension in isolated VACHT KD<sup>HOM</sup> hearts measured *in vitro*. Similarly, a contractile dysfunction was observed in isolated adult ventricular cardiomyocytes from VACHT KD<sup>HOM</sup> mice, which demonstrated reduced fractional shortening compared to cardiomyocytes from WT mice (see Fig. S1A in the supplemental material).

In agreement with the data showing heart dysfunction in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice, transcripts encoding atrial natriuretic factor (ANF), β-myosin heavy chain (β-MHC), and B-type natriuretic peptide (BNP), markers of cardiac stress, were also upregulated in cardiomyocytes from VACHT mutants. These changes were reversed by pyridostigmine treatment, suggesting that they are triggered by reduced cholinergic neurotransmission (Fig. 2C).

One possible reason for the alteration in cardiac function in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice might be related to an increase in blood pressure or HR. Contrary to this prediction, decreased cholinergic tone in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice was associated with reduced arterial pressure (see Fig. S1B in the supplemental material), with no significant alteration in basal HR using the tail-cuff system (715 ± 9 bpm for WT mice [n = 17] versus 698 ± 10 bpm for VACHT KD<sup>HOM</sup> mice [n = 16]). Similarly, no significant differences were observed in HR as determined by telemetry comparing WT and VACHT KD<sup>HOM</sup> mice (530 ± 45 bpm for WT mice [n = 3] versus 615 ± 26 bpm for KD<sup>HOM</sup> mice [n = 3]; P = 0.18). Additionally, HRs of VACHT KD<sup>HOM</sup> and WT mice under anesthesia were not significantly different (Table 1), and this contrasted with significantly reduced HRs recorded from *ex vivo* beating hearts from VACHT KD<sup>HOM</sup> mice compared to those from WT controls (Fig. 2D).

Importantly, heart dysfunction observed in VACHT mutant mice was not linked to cardiac fibrosis (see Fig. S1C in the supplemental material) and hypertrophy. Instead, cardiac mass (Table 2), morphometric analyses of cross-sectional area (see Fig. S1D in the supplemental material), and cellular area measurements (1,992.0 ± 78.5 μm<sup>2</sup> cell area in WT mice [29 cells] versus 1,318.0 ± 60.4 μm<sup>2</sup> in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice [40 cells]; P < 0.05) indicated that both the heart and cardiomyocytes

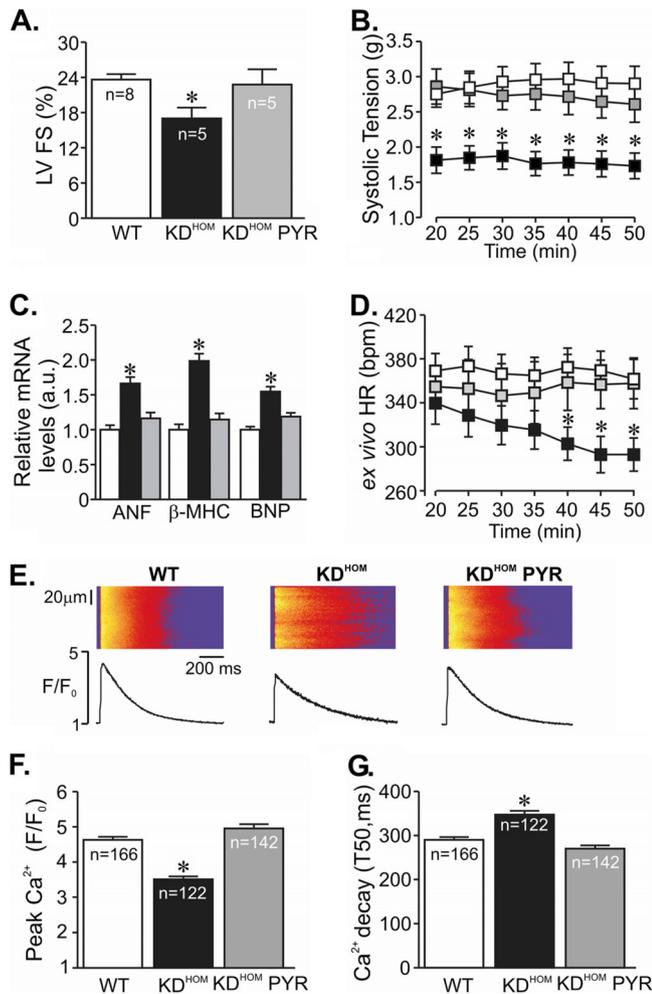


FIG. 2. Pyridostigmine treatment prevented cardiac dysfunction in VACHT  $KD^{HOM}$  mice. (A) Echocardiography analysis of left ventricle fractional shortening (FS) in VACHT mutant mice (black bars) and WT mice (white bars). Note the significant improvement in left ventricle performance after pyridostigmine treatment (gray bars). n, number of mice. (B) Time course of systolic tension in isolated perfused hearts from WT (white squares; 15 hearts) and VACHT  $KD^{HOM}$  (black squares; 16 hearts) mice. Pyridostigmine treatment improved systolic tension of hearts from mutant mice (gray squares; 4 hearts). (C) Gene expression of stress cardiac markers in cardiomyocytes from VACHT  $KD^{HOM}$  mice and WT mice. The bar graph shows data from at least 5 independent experiments. a.u., arbitrary units. (D) The HR measured in *ex vivo* beating hearts from VACHT  $KD^{HOM}$  mutants (black squares) was lower than that of WT hearts (white squares) after 40 min of perfusion. Pyridostigmine treatment for 2 weeks (gray squares) prevented the observed changes in HR. (E) (Top) Representative confocal images of electrically stimulated intracellular  $Ca^{2+}$  transient recordings in ventricular myocytes. (Bottom)  $Ca^{2+}$  transient line-scan profile. (F) Significant reduction in peak  $Ca^{2+}$  transient amplitude observed in freshly isolated adult VACHT  $KD^{HOM}$  ventricular cardiomyocytes compared to the amplitude for WT mice. Pyridostigmine treatment significantly prevented intracellular  $Ca^{2+}$  dysfunction in VACHT  $KD^{HOM}$  mice. n, number of ventricular cardiomyocytes analyzed. (G)  $Ca^{2+}$  transient kinetics of decay in VACHT  $KD^{HOM}$  cardiomyocytes and WT mice. Note that the observed changes in myocytes from VACHT  $KD^{HOM}$  mice can be prevented by 2 weeks of pyridostigmine treatment. \*, *P* value of  $<0.05$  in comparison with WT and  $KD^{HOM}$  PYR mice. T50, time from peak  $Ca^{2+}$  transient to 50% decay.

TABLE 2. Phenotypic parameters for WT and VACHT  $KD^{HOM}$  mice<sup>a</sup>

Parameter	WT ( <i>n</i> = 23) <sup>b</sup>	$KD^{HOM}$ ( <i>n</i> = 26) <sup>b</sup>
BW (g)	24.26 ± 0.51	22.53 ± 0.36
HW (mg)	193.50 ± 4.82	177.30 ± 4.36
HW/TL ratio (mg/mm)	8.80 ± 0.25	7.96 ± 0.16

<sup>a</sup> BW, body weight; HW, heart weight; HW/TL, heart weight/tibia length ratio.  
<sup>b</sup> Values are means ± SEM. The *P* values were  $<0.05$  for all conditions in comparisons of the values for the wild-type and VACHT  $KD^{HOM}$  mice.

from VACHT mutant were significantly smaller than those of the WT mice at 3 months. However, it is possible that hypertrophy may develop or progress in mutant hearts as a result of depressed cholinergic drive with age. In fact, hearts from 6-month-old mutants presented more pronounced changes in cardiac structure characterized by concentric hypertrophy compared to age-matched controls (see Fig. S1E and F in the supplemental material). Taken together, these data suggest that VACHT mutants have progressive changes in cardiac mass. Herein, we focused our experiments on 3-month-old mice.

Altered  $Ca^{2+}$  handling can influence cardiomyocyte physiology and changes in intracellular  $Ca^{2+}$  are a major feature in heart failure and myocyte pathology (3, 4). To determine if the heart dysfunction detected in VACHT  $KD^{HOM}$  mice is related to changes in  $Ca^{2+}$  handling, we examined intracellular  $Ca^{2+}$  in freshly isolated Fluo-4 AM-loaded ventricular myocytes from 3-month-old VACHT  $KD^{HOM}$  and WT mice. Figure 2E displays typical line-scan fluorescence images recorded from electrically stimulated ventricular myocytes. VACHT  $KD^{HOM}$  cardiomyocytes developed significantly smaller and slower intracellular  $Ca^{2+}$  transients than WT cells. The amplitude of the  $Ca^{2+}$  transient was significantly reduced in VACHT  $KD^{HOM}$  cardiomyocytes (Fig. 2F), and the kinetics of  $Ca^{2+}$  decay were significantly slower (Fig. 2G). These changes are closely related to the alteration in cholinergic tone in VACHT mutant mice, as  $Ca^{2+}$  handling is restored to normal levels in cells obtained from pyridostigmine-treated VACHT  $KD^{HOM}$  mice. Hence, changes in intracellular calcium handling parallel alterations in cardiac function due to reduced cholinergic tone. Collectively, these results suggest a correlation between decreased cholinergic tone and heart dysfunction that can be recovered by cholinesterase inhibitor treatment.

**Cardiomyocyte remodeling in VACHT  $KD^{HOM}$  mice.** To investigate the cellular basis of the abnormal intracellular  $Ca^{2+}$  transient of failing VACHT  $KD^{HOM}$  cardiomyocytes, electrical activity and expression levels of  $Ca^{2+}$  handling proteins were assessed by electrophysiology and Western blotting techniques, respectively. First, we investigated whether possible changes in  $I_{Ca}$  may play a role in the  $Ca^{2+}$  signaling dysfunction observed in VACHT  $KD^{HOM}$  cardiac cells. Figure 3A shows sample  $I_{Ca}$  recordings. Virtually no difference between macroscopic  $I_{Ca}$  values recorded in VACHT  $KD^{HOM}$  and WT cells was observed (at 0 mV,  $-8.10 \pm 0.44$  pA/pF in 12 WT cardiomyocytes versus  $-7.98 \pm 0.39$  pA/pF in 20 VACHT  $KD^{HOM}$  cardiomyocytes) (Fig. 3B), suggesting that under basal conditions,  $Ca^{2+}$  currents of the two genotypes were identical. Activation of  $\beta_1$ -adrenergic receptor increases  $I_{Ca}$ , and this is in part responsible for the adrenergic regulation of myocytes. Although we

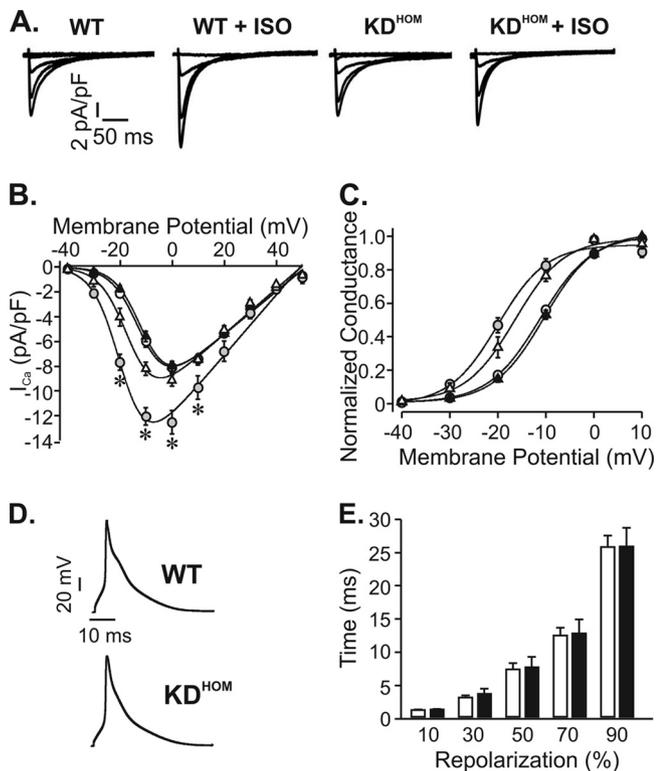


FIG. 3. Electrical properties of VAcHT KD<sup>HOM</sup> cardiomyocytes. (A) Sample I<sub>Ca</sub> currents recorded from depolarizations from -40 mV to 0 mV. ISO (100 nmol/liter) significantly increased the magnitude of I<sub>Ca</sub> in WT cells but not in VAcHT KD<sup>HOM</sup> ventricular myocytes. (B) Average I-V relationships for I<sub>Ca</sub> current density recorded from WT mice (open circles), WT mice with ISO (gray circles), VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice (black triangles), and VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice with ISO (open triangles). (C) Steady-state activation curves. (D) Sample action potential recordings from WT and VAcHT KD<sup>HOM</sup> ventricular cardiomyocytes. (E) Action potential durations at 10, 30, 50, 70, and 90% repolarization. Fifteen cells from each experimental group were used. \*, P value of <0.05 in comparison with WT mice.

have not observed a significant change in ISO-mediated response *in vivo*, it is possible that at the cellular level, β-adrenergic responses are altered; therefore, we next evaluated I<sub>Ca</sub> levels in myocytes exposed to ISO (100 nM). Figure 3A to C show that the I<sub>Ca</sub> increase induced by ISO was much less prominent in VAcHT KD<sup>HOM</sup> ventricular myocytes.

Alterations in action potential profile may also contribute to dampening Ca<sup>2+</sup> cycling in ventricular cells. To investigate this possible contribution, we recorded action potentials in ventricular myocytes from WT and VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice. No change between the action potential profiles of these cells was observed (Fig. 3D and E), indicating that electrical changes were not contributing to the Ca<sup>2+</sup> signaling dysfunction observed in response to decreased cholinergic tone.

The slow decline of the Ca<sup>2+</sup> transient in VAcHT KD<sup>HOM</sup> cardiomyocytes is consistent with the decreased expression of the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup> pump (SERCA2); therefore, we examined SERCA2 levels in these hearts. A significant reduction in SERCA2 expression levels was observed in VAcHT KD<sup>HOM</sup> hearts (Fig. 4A) compared to WT controls. In cardiac cells, PLN is the primary determinant of

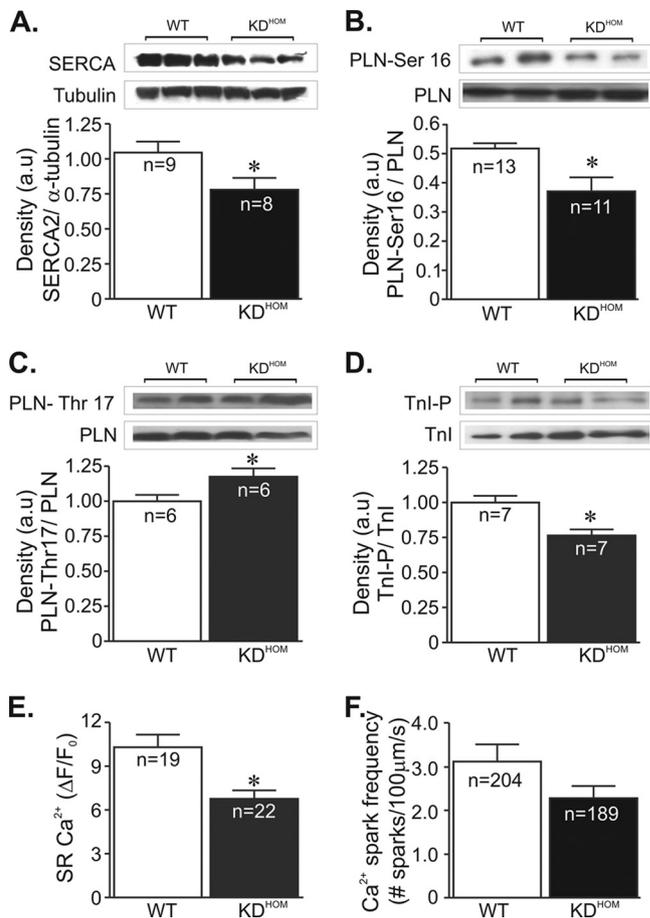


FIG. 4. Ca<sup>2+</sup> signaling components in VAcHT KD<sup>HOM</sup> hearts. In panels A to D, the top image is a representative Western blot and the bottom shows an average densitometry graph (n, number of heart samples analyzed). (A) SERCA2 levels in VAcHT KD<sup>HOM</sup> hearts were observed to be significantly reduced compared to levels in WT hearts. Phosphorylated-PLN levels at the protein kinase A (PKA)-dependent site (Ser-16) were lower in VAcHT mutant hearts (B), while phospho-Thr-17-PLN levels were increased in these hearts (C). (D) Phospho-Ser-23/24-troponin I levels were decreased in VAcHT mutant hearts relative to WT hearts. Tubulin expression levels were used as a loading control. (E) The SR Ca<sup>2+</sup> content in ventricular cardiomyocytes from VAcHT mutants was significantly reduced compared to that in WT cells. n, number of cells. (F) Ca<sup>2+</sup> spark frequency showed a tendency to be lower in VAcHT KD<sup>HOM</sup> cardiomyocytes than in WT mice, but the difference was not statistically different. n, number of cells. \*, P < 0.05.

SERCA2 function. Therefore, we also investigated if there may be a change in PLN activity in VAcHT KD<sup>HOM</sup> hearts by examining PLN expression/phosphorylation levels in these hearts. PLN expression was higher in VAcHT KD<sup>HOM</sup> hearts (data not shown); however, as shown in Fig. 4B, phosphorylated-PLN levels at Ser-16, a key determinant of SERCA2 activity, were significantly reduced in these hearts. We have also assessed PLN phosphorylation levels at the CaMKII site (Thr-17). Phospho-Thr-17-PLN levels in VAcHT KD<sup>HOM</sup> hearts were significantly increased compared to those in WT hearts (Fig. 4C). Another important aspect of cardiac cells is the sensitivity of the myofilaments to Ca<sup>2+</sup>. Since Tnl phosphorylation desensitizes the myofilament to Ca<sup>2+</sup>, we next

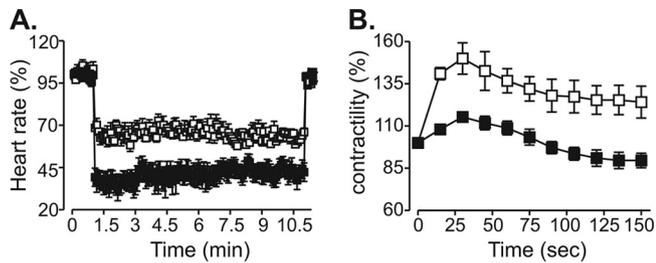


FIG. 5. VACHT KD<sup>HOM</sup> hearts present an altered GPCR response. (A) Percent decrease in beating frequency for WT (white squares;  $n = 4$ ) and VACHT KD<sup>HOM</sup> (black squares;  $n = 4$ ) hearts in response to 13  $\mu\text{mol/liter}$  ACh. (B) Time course of mean percent force increase in WT ( $n = 5$ ) and VACHT KD<sup>HOM</sup> ( $n = 5$ ) perfused hearts in response to 10  $\mu\text{mol/liter}$  ISO.

assessed TnI phosphorylation levels in cardiac samples. As shown in Fig. 4D, phospho-Ser-23/24-troponin I levels were significantly decreased in VACHT KD<sup>HOM</sup> hearts compared to WT hearts.

Since the SERCA2/PLN ratio is altered in the VACHT KD<sup>HOM</sup> hearts, we next examined the possibility that this alteration may lead to a reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  in the SR. Figure 4E shows a significant reduction in SR  $\text{Ca}^{2+}$  content in VACHT KD<sup>HOM</sup> cardiomyocytes. Furthermore,  $\text{Ca}^{2+}$  sparks were less frequent in VACHT KD<sup>HOM</sup> cardiomyocytes than in WT mice (Fig. 4F), although the data just failed to reach statistical significance.

**VACHT KD<sup>HOM</sup> mice show altered autonomic control of heart rate and G-protein-coupled receptor (GPCR) function.** A chronic decrease in cholinergic tone in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice appears to cause molecular cardiac remodeling with alterations in expression of genes related to cardiac stress,  $\text{Ca}^{2+}$  handling, and muscle contractility. Moreover, data from recordings of calcium currents suggested that  $\beta_1$ -adrenergic receptor responses are altered in VACHT KD<sup>HOM</sup> cardiomyocytes. To determine if decreased cholinergic tone, caused by reduced release of ACh in VACHT mutant mice, affected the responses to muscarinic and adrenergic activation, we treated Langendorff preparation-perfused hearts with ACh or ISO. As shown in Fig. 5A, hearts from VACHT KD<sup>HOM</sup> mice were much more sensitive to ACh (13  $\mu\text{mol/liter}$ ) than hearts from WT mice, and they showed enhanced bradycardia in response to this neurotransmitter. In contrast, the contractility response of *ex vivo* beating hearts from VACHT KD<sup>HOM</sup> mice to ISO (10  $\mu\text{mol/liter}$ ) was significantly attenuated (Fig. 5B), providing additional evidence of altered adrenergic response in mutant hearts.

To examine the possibility of autonomic imbalance in 3-month-old VACHT KD<sup>HOM</sup> mice *in vivo*, we assessed the effects of muscarinic and adrenergic receptor blockades on HR and HR variability parameters. Administration of atropine did not significantly increase HRs in either WT ( $\Delta\text{HR}$ ,  $56 \pm 27$  bpm) or VACHT KD<sup>HOM</sup> ( $\Delta\text{HR}$ ,  $65 \pm 28$  bpm) mice, whereas propranolol administration significantly reduced the HR in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice ( $\Delta\text{HR}$ ,  $-115 \pm 27$  bpm;  $P < 0.05$ ) but not in WT mice ( $\Delta\text{HR}$ ,  $-78 \pm 40$  bpm). Interestingly, the coadministration of atropine and propranolol resulted in a significant reduction of HR in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice ( $\Delta\text{HR}$ ,  $-87 \pm 13$  bpm;  $P < 0.05$ ) but not in WT mice ( $\Delta\text{HR}$ ,  $-11 \pm 4$

bpm). These results would suggest that HR in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice is under increased sympathetic control relative to HR in WT mice. To further investigate autonomic imbalance, we examined HRV parameters. Under baseline conditions, no significant differences in very low frequency (VLF) and low frequency (LF) power spectrum of HRV between WT and VACHT KD<sup>HOM</sup> mice were observed (data not shown). However, high-frequency (HF) power was significantly increased in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice (HF,  $3.66 \pm 0.18$   $\text{ms}^2$ ;  $n = 3$ ) compared to WT mice (HF,  $1.98 \pm 0.42$   $\text{ms}^2$ ;  $n = 3$ ), which resulted in a significant difference between the LF/HF ratios of the genotypes ( $4.2 \pm 0.6$  for KD<sup>HOM</sup> mice [ $n = 3$ ] versus  $6.6 \pm 0.5$  for WT mice [ $n = 3$ ];  $P = 0.04$ ). Atropine administration significantly reduced the LF/HF ratio in both WT ( $1.2 \pm 0.5$ ;  $n = 3$ ) and VACHT KD<sup>HOM</sup> ( $1.6 \pm 0.8$ ;  $n = 3$ ) mice, and these values were not different between genotypes. Interestingly, propranolol treatment did not significantly alter the LF/HF ratios relative to the baseline LF/HF ratios for either WT or VACHT KD<sup>HOM</sup> mice (data not shown). Lastly, the coadministration of atropine and propranolol significantly reduced the LF/HF ratios in both WT ( $2.1 \pm 1.1$ ;  $n = 3$ ) and VACHT KD<sup>HOM</sup> ( $0.9 \pm 0.5$ ;  $n = 3$ ) mice, and these values were not different between genotypes. Taken together, these experiments suggested the possibility that decreased cholinergic tone causes an imbalance of autonomic control of the heart, characterized by altered GPCR activation, with sympathetic tone in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice being at a higher level than that in WT mice.

To determine the molecular basis of these changes in GPCR activation, we measured transcript expression levels of muscarinic and adrenergic receptors or associated proteins (such as GPCR kinases [GRKs]). Real-time quantitative PCR analysis of RNA from heart tissue indicated that  $M_2$  muscarinic receptor levels were overexpressed (by 2-fold) in VACHT KD<sup>HOM</sup> hearts (Fig. 6A). In contrast,  $\beta_1$ -adrenergic receptor transcripts were decreased by 41% in VACHT mutant hearts compared to the expression of WT controls (Fig. 6B). This reduction is consistent with attenuated magnitude of ISO-induced increment in  $I_{\text{Ca}}$  in VACHT KD<sup>HOM</sup> cardiomyocytes (Fig. 3B) and the reduced ISO response of VACHT mutants observed *ex vivo* (Fig. 5B). Interestingly, pharmacological restoration of ACh with pyridostigmine treatment for 2 weeks reversed the overexpression of  $M_2$  receptor message in VACHT KD<sup>HOM</sup> hearts, but it did not reverse the decrease in the levels of  $\beta_1$ -adrenergic receptor message. Finally, we examined if we could detect transcripts for muscarinic receptors in isolated adult ventricular cardiomyocytes. We found an increase in  $M_2$  muscarinic receptors in cardiomyocytes similar to what we found in the whole heart, but we also found that  $M_1$  and  $M_3$  transcripts, which have been shown to have a role in inotropic responses (25, 45, 49), were also overexpressed in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice (Fig. 6C).

To further confirm if reduced ACh release could alter GPCR message levels, we measured  $M_2$  and  $\beta_1$  receptor messages in recently developed VACHT KO mice (VACHT<sup>del/del</sup> [9]). Homozygous VACHT KO mice are unable to release acetylcholine in response to depolarization and died shortly after birth due to respiratory failure (9). We examined hearts from embryos (day 18.5) of VACHT<sup>del/del</sup> mice and found that they recapitulate the molecular changes in GPCRs levels found in adult VACHT KD<sup>HOM</sup> mice, i.e., mRNA levels of  $M_2$  muscarinic receptors were significantly increased, while the mRNA

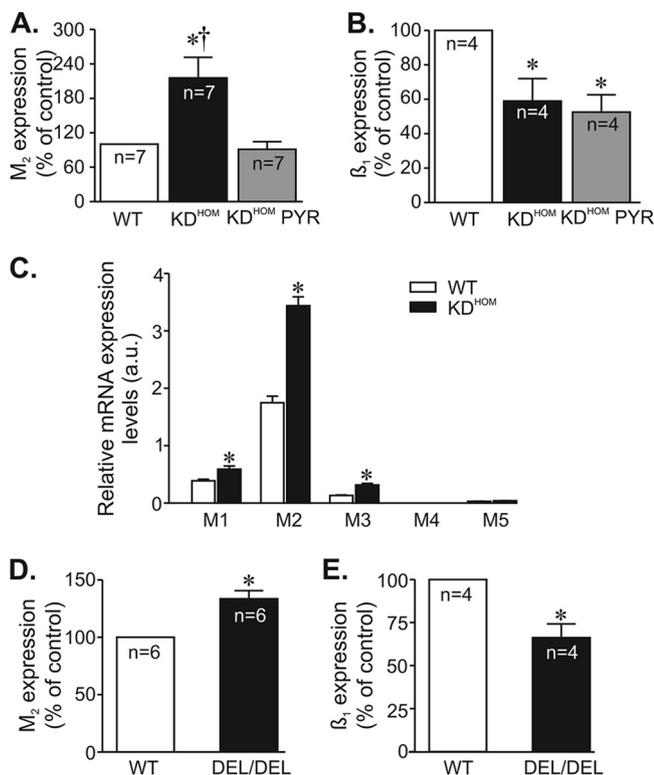


FIG. 6. Effect of VACHT deficiency on  $M_2$  muscarinic and  $\beta_1$ -adrenergic receptor message levels.  $M_2$  muscarinic and  $\beta_1$ -adrenergic receptor message levels were determined by qPCR. n, number of heart samples. (A)  $M_2$  mRNA levels were significantly increased in VACHT  $KD^{HOM}$  hearts. (B) Significant reduction in  $\beta_1$ -adrenergic receptor mRNA levels was observed in VACHT  $KD^{HOM}$  hearts. Pyridostigmine treatment prevented the increase in  $M_2$  mRNA levels without affecting  $\beta_1$ -adrenergic receptor mRNA expression levels in VACHT  $KD^{HOM}$  hearts. (C) Determination of  $M_1$  to  $M_5$  mRNA expression levels by real-time quantitative PCR in ventricular cardiomyocytes from WT and VACHT  $KD^{HOM}$  mice. Significant levels of  $M_1$  to  $M_3$  transcripts were detected in cardiomyocytes from WT mice.  $M_1$ ,  $M_2$ , and  $M_3$  muscarinic receptor transcript levels were upregulated in VACHT  $KD^{HOM}$  cardiomyocytes. The bar graph represents data from at least 6 independent experiments. \*,  $P < 0.05$ . (D and E) Increased  $M_2$  and reduced  $\beta_1$ -adrenergic receptor transcript messages are observed in hearts of VACHT knockout mice. \*,  $P$  value of  $<0.05$  in comparison with the WT; †,  $P$  value of  $<0.05$  in comparison with  $KD^{HOM}$  mice treated with PYR. n, number of heart samples analyzed.

levels of  $\beta_1$ -adrenergic receptors were decreased in VACHT<sup>del/del</sup> mice compared to the WT (Fig. 6D and E). Thus, in two distinct strains of mutant mice with altered expression of VACHT, we detected similar gene expression patterns of GPCRs. Alterations in GRK expression levels have the potential to affect GPCR-stimulated biological responses, and GRKs have been shown to be altered in heart failure (40). Therefore, we measured GRK message levels in hearts of VACHT  $KD^{HOM}$  mice, with particular attention to GRKs that have been previously shown to phosphorylate  $\beta$ -adrenergic or  $M_2$  receptors and participate in receptor desensitization. The message of GRK2, the most-expressed GRK in cardiac tissue, was increased in VACHT  $KD^{HOM}$  hearts compared to WT controls (by 84%). We also observed a significant increase in GRK5 message levels (by 44%), whereas GRK3 levels were not altered in VACHT  $KD^{HOM}$  hearts. Moreover, GRK6 expression levels in VACHT

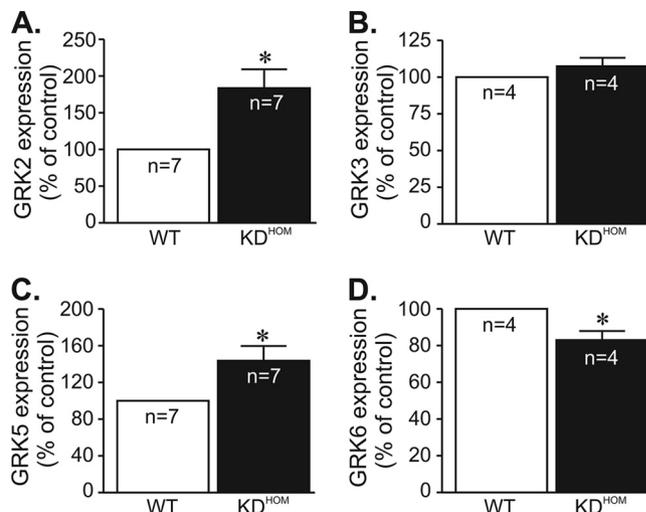


FIG. 7. GRK message expression levels are altered in VACHT mutant hearts. Determination of GRK2 (A), GRK3 (B), GRK5 (C), and GRK6 (D) mRNA expression by real-time quantitative PCR. n, number of hearts analyzed. \*,  $P < 0.05$ .

$KD^{HOM}$  hearts were reduced by 17% compared to those in WT hearts. Figure 7 summarizes these data. Hence, the alteration in receptor responses may reflect a combination of receptor and GRK changes in hearts of VACHT mutants.

## DISCUSSION

In this work, we present evidence that chronic disturbance in cholinergic tone in mutant mice causes changes in cardiac gene expression associated with a molecular remodeling with altered intracellular calcium handling and decreased ventricular function. The dysautonomy due to decreased VACHT expression causes pronounced alterations in autonomic receptor function, with attenuated  $\beta_1$ -receptor responses, whereas  $M_2$  responses seem exacerbated. Moreover, the cardiac phenotype of VACHT  $KD^{HOM}$  mice could be reversed by treatment with a cholinesterase inhibitor, pyridostigmine. These data suggest that cholinergic transmission might have unanticipated roles in maintaining ventricular cardiac contractility and that decreased cholinergic tone may contribute to cardiac dysfunction.

Clinical studies have shown that withdrawal of parasympathetic tone precedes sympathetic activation during the development of heart failure (1). For humans, spectral analysis suggests that aging, one of the major risk factors for heart failure, decreases parasympathetic drive (11). Animal studies further corroborated these data by showing autonomic imbalance in the early stage of experimental heart failure in dogs (22). Thus, dysautonomy plays important roles in pathological changes in the heart (37). However, given that genetic interference in the presynaptic cholinergic system is usually fatal, it has been difficult to chronically disturb the cholinergic autonomic nervous system to understand if acetylcholine plays any unanticipated roles in cardiac contractility.

VACHT presence in synaptic vesicles is fundamental for evoked release of ACh, as VACHT KO mice cannot release this neurotransmitter (9), and the VACHT  $KD^{HOM}$  mice,

which present reduced VAcHT expression, show reduced ACh packing in synaptic vesicles (41). It is likely that both the sympathetic and parasympathetic nervous systems are affected in VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice, since both depend on preganglionic cholinergic neurotransmission, albeit the parasympathetic nervous system should be hit twice due to its postganglionic cholinergic phenotype. We favor the possibility that dysautonomy caused by decreased cholinergic tone results in imbalance of autonomic control of the heart in mutant mice, based on the following evidence. First, it is known that at room temperature (25°C), the sympathetic drive predominates in mice and keeps their heart rate high (18). We found that heart rates were identical in the two genotypes despite a substantial decrease in  $\beta_1$ -receptor expression and function in VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice, suggesting that *in vivo*, the sympathetic nervous system needed to be overactivated in VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice in order to maintain the basal HR at levels that were similar to those of the WT. Second, the changes in  $\beta_1$ -receptor expression and GRKs observed for VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice are similar to those seen in models of adrenergic overactivation (19, 39). Third, the effect of sympathetic blockade on changes in HR responses were significantly enhanced in VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice, suggesting an important sympathetic component to maintenance of normal values of heart rate in the mutant mice. It is therefore conceivable that dysautonomy caused by reduced cholinergic function in VAcHT mutants favors an increased sympathetic tone in these mice. The HR variability analysis conducted here supports this conclusion.

An intriguing observation is the reduced heart rate found in Langerdorff preparation-perfused hearts of mutant mice. This finding agrees with the results of autonomic blockage *in vivo* showing a reduced intrinsic heart rate in VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice. It is likely that these results reflect reduced sinoatrial node action potential firing in mutant mice. Future studies will be needed to determine the ionic and molecular bases of these changes.

Our findings contrast in part with the results obtained with another model of cholinergic dysfunction, the M<sub>2</sub>-AChR knockout mice (26). In spite of the similar *in vivo* HRs of the VAcHT KD<sup>HOM</sup> and M<sub>2</sub>-AChR knockout mice compared to their respective controls, these two mouse strains presented distinct degrees of cardiac dysfunction and remodeling. Since most of the major cardiac changes observed in VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice can be attributed to the reduced cholinergic tone, it seems reasonable to have expected that the same array of changes would be observed in the M<sub>2</sub>-AChR knockout mice. One potential explanation for these phenotypic distinctions is the degree of activation of  $\beta$ -adrenergic and muscarinic signaling. Whereas  $\beta$ -adrenergic responses were significantly altered in VAcHT mutants, this signaling pathway was preserved in M<sub>2</sub>-AChR knockout mice (26). Moreover, VAcHT mice presented exacerbated M<sub>2</sub> responses, in contrast to M<sub>2</sub>-AChR knockout mice, in which M<sub>2</sub> responses were absent (26). There is another consideration: the existence of other types of muscarinic receptors in the heart, albeit with lower levels of expression, has been reported (44, 49). Indeed, we could also detect M<sub>1</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptor messages in ventricular cardiomyocytes, and their expression was elevated in VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice. It is surprising that M<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, and M<sub>3</sub> receptors are all upregulated in ventricular myocytes from VAcHT mu-

tants, even though parasympathetic fibers are not abundant in ventricles of rodents (30). Therefore, ACh may control ventricular cell function by mechanisms that are not characterized yet, and disturbance of VAcHT expression can interfere with ventricular function. In fact, the possibility that cardiomyocytes express presynaptic cholinergic proteins has been raised recently (23).

It is well established that acetylcholine controls atrial function, with predominant roles in maintaining heart rate and action potential conduction. Unexpectedly, we found that altered cholinergic tone also provokes profound effects on ventricular cardiomyocytes. The array of cellular changes included Ca<sup>2+</sup> signaling dysfunction and altered GPCR function. Interestingly, these changes occurred without altering I<sub>Ca</sub> density or action potential properties. Overall, the cardiac remodeling observed for VAcHT mutant mice resembles in many aspects the remodeling process observed for animal models of heart failure with sympathetic overdrive (7, 19, 39). Therefore, we suggest that the autonomic imbalance in the sympathetic direction in VAcHT mutants, with decreased parasympathetic activity, can largely explain the development of ventricular dysfunction in these mice.

It is not clear at the moment if the overexpression of M<sub>2</sub> muscarinic receptors contributes to the VAcHT cardiac phenotype. We found that hearts from VAcHT mutants were more sensitive to the bradycardic effects of ACh, suggesting the presence of increased functional M<sub>2</sub> receptors in these hearts. It is well known that M<sub>2</sub> receptors couple to the Gi/0 family of G proteins (27) to inhibit adenylyl cyclase; therefore, it is likely that M<sub>2</sub> overexpression may also contribute to the impaired  $\beta_1$  response in VAcHT mutant hearts. Consistent with this notion, improvement in ventricular function following pyridostigmine treatment of VAcHT mice occurred in spite of reduced  $\beta_1$ -receptor mRNA levels. It remains to be determined if attenuation of  $\beta_1$ -adrenergic receptor mRNA in this model is a late event that may require more-prolonged pyridostigmine treatment. Levels of GRK2 are elevated in different models of heart failure characterized by enhanced chronic neurohumoral stimulation, in which they contribute to  $\beta_1$ -adrenergic receptor attenuation (39). Consistent with this notion, we found increased GRK2 levels in the VAcHT mutant model of cholinergic deficiency. Our results also demonstrated an upregulation of GRK5 in VAcHT mutant hearts. Recently, Martini and collaborators (31) have characterized a new role for GRK5 as a nuclear histone deacetylase (HDAC) kinase with a key role in maladaptive cardiac hypertrophy. In this context, nuclear accumulation of GRK5 correlates with enhanced ventricular expression of the hypertrophy-associated fetal gene program (31). It is interesting that 3-month-old VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice had no sign of cardiac hypertrophy, although they showed increased levels of ANF and  $\beta$ -MHC transcripts. However, it is important to mention that ventricular expression of these markers is not always associated with cardiac hypertrophy (38, 48). In contrast, 6-month-old mice presented concentric hypertrophy, suggesting that cardiac dysfunction is progressive in VAcHT mutant hearts as a result of chronic depressed cholinergic drive with age. It remains to be determined whether aged VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice will present further features of heart failure. Another critical aspect of cardiac dysfunction in heart failure is ventricular dyssynchrony.

In fact, ventricular dyssynchrony has been shown to have deleterious effects on cardiac function resulting in contractile inefficiency and increased mortality (46). It remains to be determined whether VACHT KD<sup>DOM</sup> mice present ventricular dyssynchrony.

Taken together, our experiments indicate that dysautonomy causes profound changes in gene expression, suggesting that the balanced long-term responses of GPCRs are fundamental to maintain cardiac gene expression to maintain normal heart function. Our data also add to recent evidence suggesting that therapies aimed at enhancing parasympathetic activation may have positive effects on patients with heart failure (16, 43, 47).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sanda Raulic and Jue Fan for mouse husbandry and genotyping at the University of Western Ontario, Richard Premont and Raul Gainetdinov (Duke University Medical Center) for advice on GRK PCR, and Brian Collier (McGill University) and R. Jane Rylett (University of Western Ontario) for comments on earlier versions of the manuscript.

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Ontario (grant NA 6656 to R.G., S.G., V.F.P., and M.A.M.P.), CIHR (grants MOP-82756 to R.G. and MOP-89919 to V.F.P. and M.A.M.P.), NIH-Fogarty grant R21 TW007800-02 (to M.A.M.P., V.F.P., and M.G.C.), PRONEX-FAPEMIG (to M.A.M.P., V.F.P., and S.G.), CNPq (to S.G., J.S.C., V.F.P., and M.A.M.P.), FAPEMIG, and Instituto do Milenio Toxins/MCT (to M.V.G., M.A.M.P., V.F.P., A.P.A., and S.G.). R.P. and C.A.S.M. received postdoctoral fellowships from the Department of Foreign Affairs and International Trade (Canada). R.G. is supported by a New Investigator Award from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

#### REFERENCES

- Amorim, D. S., H. J. Dargie, K. Heer, M. Brown, D. Jenner, E. G. Olsen, P. Richardson, and J. F. Goodwin. 1981. Is there autonomic impairment in congestive (dilated) cardiomyopathy? *Lancet* **i**:525–527.
- Bartholomeu, J. B., A. S. Vanzelli, N. P. Rolim, J. C. Ferreira, L. R. Bechara, L. Y. Tanaka, K. T. Rosa, M. M. Alves, A. Medeiros, K. C. Mattos, M. A. Coelho, M. C. Irigoyen, E. M. Krieger, J. E. Krieger, C. E. Negrão, P. R. Ramires, S. Guatimosim, and P. C. Brum. 2008. Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **45**:240–249.
- Bers, D. M. 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)* **21**:380–387.
- Bers, D. M. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**:198–205.
- Brandon, E. P., W. Lin, K. A. D'Amour, D. P. Pizzo, B. Dominguez, Y. Sugiura, S. Thode, C. P. Ko, L. J. Thal, F. H. Gage, and K. F. Lee. 2003. Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J. Neurosci.* **23**:539–549.
- Castro, C. H., R. A. Santos, A. J. Ferreira, M. Bader, N. Alenina, and A. P. Almeida. 2005. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension* **46**:937–942.
- Chakir, K., S. K. Daya, T. Aiba, R. S. Tunin, V. L. Dimaano, T. P. Abraham, K. M. Jaques-Robinson, E. W. Lai, K. Pacak, W. Z. Zhu, R. P. Xiao, G. F. Tomaselli, and D. A. Kass. 2009. Mechanisms of enhanced beta-adrenergic reserve for cardiac resynchronization therapy. *Circulation* **119**:1231–1240.
- Cruz, J. S., and H. Matsuda. 1994. Depressive effects of arenobufagin on the delayed rectifier K<sup>+</sup> current of guinea-pig cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **266**:317–325.
- de Castro, B. M., X. De Jaeger, C. Martins-Silva, R. D. Lima, E. Amaral, C. Menezes, P. Lima, C. M. Neves, R. G. Pires, T. W. Gould, I. Welch, C. Kushmerick, C. Guatimosim, I. Izquierdo, M. Cammarota, R. J. Rylett, M. V. Gomez, M. G. Caron, R. W. Oppenheim, M. A. Prado, and V. F. Prado. 2009. The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. *Mol. Cell Biol.* **29**:5238–5250.
- de Castro, B. M., G. S. Pereira, V. Magalhaes, J. I. Rossato, X. De Jaeger, C. Martins-Silva, B. Leles, P. Lima, M. V. Gomez, R. R. Gainetdinov, M. G. Caron, I. Izquierdo, M. Cammarota, V. F. Prado, and M. A. Prado. 2009. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes Brain Behav.* **8**:23–35.
- De Meersman, R. E., and P. K. Stein. 2007. Vagal modulation and aging. *Biol. Psychol.* **74**:165–173.
- Dhein, S., C. J. van Koppen, and O. E. Brodde. 2001. Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol. Res.* **44**:161–182.
- Duprez, D. A. 2008. Cardiac autonomic imbalance in pre-hypertension and in a family history of hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**:1902–1903.
- Ferreira, A. J., T. L. Oliveira, M. C. Castro, A. P. Almeida, C. H. Castro, M. V. Caliari, E. Gava, G. T. Kitten, and R. A. Santos. 2007. Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. *Life Sci.* **81**:916–923.
- Floras, J. S. 1993. Clinical aspects of sympathetic activation and parasympathetic withdrawal in heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **22**:72A–84A.
- Freeling, J., K. Wattier, C. LaCroix, and Y. F. Li. 2008. Neostigmine and pilocarpine attenuated tumour necrosis factor alpha expression and cardiac hypertrophy in the heart with pressure overload. *Exp. Physiol.* **93**:75–82.
- Funakoshi, H., T. Kubota, N. Kawamura, Y. Machida, A. M. Feldman, H. Tsutsui, H. Shimokawa, and A. Takeshita. 2002. Disruption of inducible nitric oxide synthase improves beta-adrenergic inotropic responsiveness but not the survival of mice with cytokine-induced cardiomyopathy. *Circ. Res.* **90**:959–965.
- Gehrmann, J., P. E. Hammer, C. T. Maguire, H. Wakimoto, J. K. Triedman, and C. I. Berul. 2000. Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**:H733–H740.
- Grassi, G., G. Seravalle, F. Quarti-Trevano, and R. Dell'oro. 2009. Sympathetic activation in congestive heart failure: evidence, consequences and therapeutic implications. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **7**:137–145.
- Gros, R., X. You, L. L. Baggio, M. G. Kabir, A. M. Sadi, I. N. Mungrue, T. G. Parker, Q. Huang, D. J. Drucker, and M. Husain. 2003. Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* **144**:2242–2252.
- Guatimosim, S., E. A. Sobie, C. J. dos Santos, L. A. Martin, and W. J. Lederer. 2001. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2+) current. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**:C1327–C1339.
- Ishise, H., H. Asanoi, S. Ishizaka, S. Joho, T. Kameyama, K. Umeno, and H. Inoue. 1998. Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. *J. Appl. Physiol.* **84**:1234–1241.
- Kakinuma, Y., T. Akiyama, and T. Sato. 2009. Cholinoceptive and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. *FEBS J.* **276**:5111–5125.
- Kent, K. M., S. E. Epstein, T. Cooper, and D. M. Jacobowitz. 1974. Cholinergic innervation of the canine and human ventricular conducting system. Anatomic and electrophysiologic correlations. *Circulation* **50**:948–955.
- Korth, M., V. K. Sharma, and S. S. Sheu. 1988. Stimulation of muscarinic receptors raises free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **62**:1080–1087.
- LaCroix, C., J. Freeling, A. Giles, J. Wess, and Y. F. Li. 2008. Deficiency of M2 muscarinic acetylcholine receptors increases susceptibility of ventricular function to chronic adrenergic stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**:H810–H820.
- Lanzafame, A. A., A. Christopoulos, and F. Mitchelson. 2003. Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* **9**:241–260.
- Li, M., C. Zheng, T. Sato, T. Kawada, M. Sugimachi, and K. Sunagawa. 2004. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* **109**:120–124.
- Lloyd-Mostyn, R. H., and P. J. Watkins. 1975. Defective innervation of heart in diabetic autonomic neuropathy. *Br. Med. J.* **3**:15–17.
- Mabe, A. M., J. L. Hoard, M. M. Duffour, and D. B. Hoover. 2006. Localization of cholinergic innervation and neurturin receptors in adult mouse heart and expression of the neurturin gene. *Cell Tissue Res.* **326**:57–67.
- Martini, J. S., P. Raake, L. E. Vinge, B. DeGeorge, Jr., J. K. Chuprun, D. M. Harris, E. Gao, A. D. Eckhart, J. A. Pitcher, and W. J. Koch. 2008. Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:12457–12462.
- Misgeld, T., R. W. Burgess, R. M. Lewis, J. M. Cunningham, J. W. Lichtman, and J. R. Sanes. 2002. Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* **36**:635–648.
- Mungrue, I. N., R. Gros, X. You, A. Pirani, A. Azad, T. Csont, R. Schulz, J. Butany, D. J. Stewart, and M. Husain. 2002. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J. Clin. Invest.* **109**:735–743.
- Nagata, K., C. Ye, M. Jain, D. S. Milstone, R. Liao, and R. M. Mortensen. 2000. Alpha(12) but not Alpha(13) is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ. Res.* **87**:903–909.
- Okoshi, K., M. Nakayama, X. Yan, M. P. Okoshi, A. J. Schuldt, M. A. Marchionni, and B. H. Lorell. 2004. Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation* **110**:713–717.
- Oliveira, F. A., S. Guatimosim, C. H. Castro, D. T. Galan, S. Lauton-Santos,

- A. M. Ribeiro, A. P. Almeida, and J. S. Cruz. 2007. Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine-deficient rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**:H394–H401.
37. Olshansky, B., H. N. Sabbah, P. J. Hauptman, and W. S. Colucci. 2008. Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation* **118**:863–871.
  38. Pandya, K., H. S. Kim, and O. Smithies. 2006. Fibrosis, not cell size, delineates beta-myosin heavy chain reexpression during cardiac hypertrophy and normal aging in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:16864–16869.
  39. Penela, P., C. Murga, C. Ribas, A. S. Tutor, S. Peregrin, and F. Mayor, Jr. 2006. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **69**:46–56.
  40. Petrofski, J. A., and W. J. Koch. 2003. The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**:1167–1174.
  41. Prado, V. F., C. Martins-Silva, B. M. de Castro, R. F. Lima, D. M. Barros, E. Amaral, A. J. Ramsey, T. D. Sotnikova, M. R. Ramirez, H. G. Kim, J. I. Rossato, J. Koenen, H. Quan, V. R. Cota, M. F. Moraes, M. V. Gomez, C. Guatimosim, W. C. Wetsel, C. Kushmerick, G. S. Pereira, R. R. Gainetdinov, I. Izquierdo, M. G. Caron, and M. A. Prado. 2006. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* **51**:601–612.
  42. Rota, M., T. Hosoda, A. De Angelis, M. L. Arcarese, G. Esposito, R. Rizzi, J. Tillmanns, D. Tugal, E. Musso, O. Rimoldi, C. Bearzi, K. Urbanek, P. Anversa, A. Leri, and J. Kajstura. 2007. The young mouse heart is composed of myocytes heterogeneous in age and function. *Circ. Res.* **101**:387–399.
  43. Serra, S. M., R. V. Costa, R. R. Teixeira De Castro, S. S. Xavier, and A. C. Nobrega. 2009. Cholinergic stimulation improves autonomic and hemodynamic profile during dynamic exercise in patients with heart failure. *J. Card. Fail.* **15**:124–129.
  44. Sharma, V. K., H. M. Colecraft, L. E. Rubin, and S. S. Sheu. 1997. Does mammalian heart contain only the M2 muscarinic receptor subtype? *Life Sci.* **60**:1023–1029.
  45. Sharma, V. K., H. M. Colecraft, D. X. Wang, A. I. Levey, E. V. Grigorenko, H. H. Yeh, and S. S. Sheu. 1996. Molecular and functional identification of m1 muscarinic acetylcholine receptors in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **79**:86–93.
  46. Spragg, D. D., and D. A. Kass. 2006. Pathobiology of left ventricular dyssynchrony and resynchronization. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **49**:26–41.
  47. Thayer, J. F., and R. D. Lane. 2007. The role of vagal function in the risk for cardiovascular disease and mortality. *Biol. Psychol.* **74**:224–242.
  48. Vikstrom, K. L., T. Bohlmeier, S. M. Factor, and L. A. Leinwand. 1998. Hypertrophy, pathology, and molecular markers of cardiac pathogenesis. *Circ. Res.* **82**:773–778.
  49. Wang, Z., H. Shi, and H. Wang. 2004. Functional M3 muscarinic acetylcholine receptors in mammalian hearts. *Br. J. Pharmacol.* **142**:395–408.
  50. Wu, J. S., F. H. Lu, Y. C. Yang, T. S. Lin, J. J. Chen, C. H. Wu, Y. H. Huang, and C. J. Chang. 2008. Epidemiological study on the effect of pre-hypertension and family history of hypertension on cardiac autonomic function. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**:1896–1901.
  51. Yang, L. L., R. Gros, M. G. Kabir, A. Sadi, A. I. Gotlieb, M. Husain, and D. J. Stewart. 2004. Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation* **109**:255–261.