



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA CONEXINA 43 MIOCÁRDICA NA  
DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**

**BRENO CARDIM BARRETO**

**Salvador – Bahia  
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA CONEXINA 43 MIOCÁRDICA NA  
DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA**

**BRENO CARDIM BARRETO**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Milena Botelho Pereira Soares

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Garcia Macambira

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Patologia  
Experimental para a obtenção do  
grau de Mestre.

**Salvador – Bahia  
2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

B273c Barreto, Breno Cardim.  
Caracterização da expressão da conexina 43 miocárdica na doença de chagas  
crônica. / Breno Cardim Barreto. - 2019.  
55 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Milena Botelho Pereira Soares, Laboratório de  
Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia,  
Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz,  
2019.

1. Doença de Chagas. 2. Cardiomiopatia. 3. Conexina . 4. Arritmias.

I. Título.

CDU 616.937

"CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA CONEXINA 43 MIOCÁRDICA NA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA".

Breno Cardim Barreto


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 19 de junho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Valéria de Matos Borges  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Milena Botelho Pereira Soares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me permitir chegar até aqui e me presentear com pessoas tão especiais, que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, e me apoiaram em todos os momentos, mesmo não entendendo muito bem o que estava acontecendo, como meus pais, Wilson e Rita, minha irmã, Isadora, minha avó Marly, e toda minha família.

Agradeço à Dra. Milena Soares e Dra. Simone Macambira por toda orientação, paciência, amizade, cuidado e confiança em todos esses anos, desde que entrei para esse grupo, e que se tornou minha segunda família.

Aos amigos que a pesquisa me deu como Pâmela Daltro, com quem dividi boa parte dos trabalhos, experimentos, “puxões de orelha” e boas conversas, e por quem nutro um enorme carinho e amizade. À Gisele Batista, por sempre se disponibilizar a ajudar nos momentos de “aperto”, e principalmente por proporcionar momentos de boas gargalhadas; à Carine, quem praticamente me “salvou” nas últimas etapas desse trabalho, sempre com boa vontade e atenção; à Cássio Meira, o cara mais citado em todos os agradecimentos, mas que é bem merecido, pois é uma pessoa que está sempre disposto a ajudar todos a quem recorre a ele, e um grande amigo; Renan, Helenita, Mariana, Sara, Carol, pelos momentos alegres, jogando muita conversa fora; Ivan e Patrícia, pessoas por quem passei a nutrir uma enorme consideração, admiração e respeito conforme o convívio foi aumentando e à toda equipe do LETI.

Às amizades feitas através do PGPAT, em especial à Bruna Oliveira, com quem dividi boa parte dos “perrengues”, madrugadas de estudos e discussões durante as disciplinas; Cibele e Ivanéia, por todo carinho, cuidado e amizade que compartilhamos desde que passamos na seleção do mestrado. Ao IGM por me proporcionar viver todas essas experiências; à biblioteca do IGM pelo cuidado e atenção dedicada à correção deste trabalho. A todos, o meu mais sincero “Muito Obrigado”, pois sem qualquer um deles, essa jornada seria, com certeza, mais difícil.

BARRETO, Breno Cardim. Caracterização da expressão da conexina 43 miocárdica na doença de chagas crônica. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A cardiomiopatia chagásica crônica é uma doença debilitante de curso fatal, sendo as arritmias cardíacas a principal causa de morte súbita dos indivíduos acometidos por essa doença. Devido à falta de opções terapêuticas adequadas, o entendimento dos mecanismos que levam ao desenvolvimento das arritmias graves é de grande relevância. A conexina 43 é uma importante proteína componente das junções comunicantes em cardiomiócitos, e a expressão alterada dessa proteína está relacionada a distúrbios de condução em outras cardiomiopatias. **OBJETIVO:** Caracterizar as alterações na expressão e distribuição da Cx43 em corações chagásicos crônicos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Camundongos C57BL/6 com 6 e 12 meses de infecção pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* e controles não infectados foram submetidos à avaliação funcional (ergométrica e ECG). Após eutanásia, os corações foram coletados e destinados para análises histopatológicas, para avaliação do infiltrado inflamatório e de fibrose; análise por imunofluorescência para avaliar o padrão de distribuição da Cx43 total e fosforilada (S368); análise pela técnica de *Immunogold*, para avaliar a presença da Cx43 nos discos intercalares; análise de expressão gênica por RT-qPCR, para avaliar a expressão gênica da Cx43 total, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Amostras de corações explantados de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, submetidos à transplante cardíaco, foram utilizadas para análise por imunofluorescência da expressão de Cx43. **RESULTADOS:** Animais com 6 e 12 meses de infecção perderam a capacidade de realizar exercício na esteira ergométrica e apresentaram distúrbios de condução no coração, observados no ECG. As análises histopatológicas confirmaram intenso infiltrado inflamatório e fibrótico nos corações chagásicos (6 e 12 meses), diferente do observado nos animais controles. Nas análises de imunofluorescência, observamos alteração na distribuição da Cx43 total e com marcações na membrana lateral ou no interior do cardiomiócitos nos animais infectados (6 e 12 meses), enquanto que os corações de animais não infectados apresentaram Cx43 localizadas nos discos intercalares. A análise da Cx43(S368) foi mais intensa nos animais infectados (6 e 12 meses) do que nos animais não infectados. Na análise por *Immunogold*, observamos que os animais não-infectados apresentaram maior concentração de Cx43 total nos discos intercalares, enquanto que nos infectados as marcações estavam presentes em estruturas semelhantes a vacúolos autofágicos. As análises por RT-qPCR mostraram um aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos infectados (6 e 12 meses). A expressão do gene da Cx43 está reduzida nos animais com 6 meses de infecção, mas não com 12 meses, em comparação com os animais controles. Por fim, a marcação de Cx43 total e Cx43 (S368) no material humano apresentaram padrão semelhante ao observado no modelo experimental. **CONCLUSÃO:** Corações chagásicos crônicos apresentam alteração na expressão da Cx43, bem como no padrão de distribuição da Cx43 total e fosforilada, o que pode estar associada com a alta produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e contribuir para o estabelecimento dos distúrbios de condução na doença de Chagas.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; Cardiomiopatia; Conexina 43; Arritmias

BARRETO, Breno Cardim. Characterization of miocardial connexin 43 expression in chronic Chagas disease. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Chronic chagasic cardiomyopathy is a debilitating disease of fatal course, with cardiac arrhythmias being the main cause of sudden death in individuals with this disease. Due to the lack of adequate therapeutic options, the understanding of the mechanisms that lead to the development of severe arrhythmias is of great relevance. Connexin 43 is an important protein component of the communicating junctions in cardiomyocytes, and the altered expression of this protein is related to conduction disorders in other cardiomyopathies. **OBJECTIVE:** To characterize the changes in expression and distribution of Cx43 in chronic chagasic hearts. **MATERIAL AND METHODS:** C57BL/6 mice with 6 and 12 months of infection by the Colombian *Trypanosoma cruzi* strain and uninfected controls were submitted to functional evaluation (ergometric and ECG). After euthanasia, the hearts were collected and destined for histopathological analysis, to evaluate the inflammatory infiltrate and fibrosis; analysis by immunofluorescence to evaluate the distribution pattern of total and phosphorylated Cx43 (S368); analysis by the Immunogold technique, to evaluate the presence of Cx43 in the intercalated discs; gene expression analysis by RT-qPCR, to evaluate the gene expression of total Cx43, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Samples from explanted hearts of patients with chronic chagasic cardiomyopathy submitted to cardiac transplantation were used for immunofluorescence analysis of Cx43 expression. **RESULTS:** Animals with 6 and 12 months of infection lost the ability to exercise on the treadmill and presented conduction disorders in the heart, observed on the ECG. Histopathological analyzes confirmed intense inflammatory and fibrotic infiltration in chagasic hearts (6 and 12 months), different from that observed in control animals. In the immunofluorescence analyses, we observed a change in the total Cx43 distribution and with lateral membrane or cardiomyocyte markings in the infected animals (6 and 12 months), while the hearts of uninfected animals presented Cx43 located in the intercalated discs. The staining for Cx43 (S368) was more intense in infected (6 and 12 months) than in uninfected animals. In the analysis by Immunogold, uninfected animals presented more intense localization of total Cx43 in the intercalated discs, whereas in the infected ones the markings were present in structures similar to autophagic vacuoles. The RT-qPCR analyses showed an increase in the gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the infected (6 and 12 months) compared to uninfected controls. A reduction of Cx43 gene expression was reduced in the animals with 6 months, but not with 12 months of infection, compared to uninfected controls. Finally, the labeling of total Cx43 and Cx43 (S368) in the human material presented a pattern similar to that observed in the experimental model. **CONCLUSION:** Chronic chagasic hearts present alterations in Cx43 expression, as well as in the distribution pattern of total and phosphorylated Cx43, which may be associated with the high production of proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and contribute to the establishment of conduction disorders in Chagas disease.

**Keys word:** Chagas disease; Cardiomyopathy; Connexin 43; Arrhythmias



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	13
<b>Figura 2</b>	Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos.	14
<b>Figura 3</b>	Fases e aspectos clínicos da doença de Chagas.	15
<b>Figura 4</b>	Estrutura da conexina43 e formação das junções comunicantes	17
<b>Figura 5</b>	Extremidade C-Terminal da Cx43. Resíduos de aminoácidos (serina-vermelho ou tirosina-azul) que sofrem fosforilação.	19
<b>Figura 6</b>	Desenho do estudo.	25
<b>Figura 7</b>	Avaliação da capacidade de exercício em teste ergométrico	30
<b>Figura 8</b>	Representação do registro eletrocardiográfico.	31
<b>Figura 9</b>	Quantificação do infiltrado inflamatório em corações de camundongos chagásicos e controles.	33
<b>Figura 10</b>	Quantificação de fibrose no coração de camundongos chagásicos e controles	34
<b>Figura 11</b>	Distribuição da Cx43 total em tecido muscular cardíaco de camundongos chagásicos e controles.	36
<b>Figura 12</b>	Quantificação da Cx43 total em tecido muscular cardíaco de camundongos com 6 e 12 meses de infecção.	37
<b>Figura 13</b>	Marcação da Cx43 fosforilada (S368) em tecido muscular cardíaco de camundongos chagásicos e controles.	37
<b>Figura 14</b>	Análise ultraestrutural da expressão de Cx43 total	38
<b>Figura 15</b>	Análise da expressão gênica da Cx43 ( <i>Gaj1</i> ) em corações de camundongos	39
<b>Figura 16</b>	Análise da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em corações de camundongos	40

<b>Figura 17</b>	Infiltrado inflamatório em corações de pacientes chagásicos crônicos	41
<b>Figura 18</b>	Expressão de Cx43 total em tecido muscular cardíaco humano	42
<b>Figura 19</b>	Expressão de Cx43 fosforilada (S368) em tecido muscular cardíaco humano	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Alterações observadas no ECG de camundongos chagásicos e não-infectados seis meses pós-infecção	32
<b>Tabela 2</b>	Alterações observadas no ECG de camundongos chagásicos e não-infectados doze meses pós-infecção	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABNT</b>	Associação Brasileira de Normas e Trabalhos
<b>CCC</b>	Cardiomiopatia chagásica crônica
<b>Cx43</b>	Conexina 43
<b>Cx43 (S368)</b>	Conexina 43 fosforilada no resíduo 368 de serina
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>JC</b>	Junção comunicante
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa

# SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS (TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA).....	11
1.2	CICLO DE VIDA DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	11
1.3	EPIDEMIOLOGIA .....	13
1.4	DIAGNÓSTICO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS .....	14
1.5	CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA E ARRITMIAS .....	15
1.6	TRATAMENTO.....	16
1.7	JUNÇÕES COMUNICANTES E CONEXINA 43 (CX43).....	17
1.8	DOENÇA DE CHAGAS, ARRITMIAS E CX43.....	19
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	22
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	24
4.1	ANIMAIS.....	24
4.2	INFECÇÃO COM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	24
4.3	ELETROCARDIOGRAMA (ECG) .....	25
4.4	TESTE ERGOMÉTRICO .....	26
4.5	IMUNOFLOURESCÊNCIA .....	26
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – IMMUNOGOLD.....	27
4.7	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS .....	27
4.8	RT-QPCR.....	28
4.9	MATERIAL HUMANO.....	28
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
5	<b>RESULTADOS</b> .....	30
5.1	AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DA DISFUNÇÃO CARDÍACA NO MODELO EXPERIMENTAL DE CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA.....	30
5.2	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS .....	32
5.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DA CX43 EM CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS.....	34
5.4	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA DISTRIBUIÇÃO DA CX43.....	38
5.5	EXPRESSÃO GÊNICA DA CX43 E DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO CORÇÃO DE CAMUNDONGOS.....	39
5.6	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM CORAÇÕES CHAGÁSICOS HUMANOS.....	40
5.7	ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DA CX43 EM CORAÇÕES CHAGÁSICOS HUMANOS..	41
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	44
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS (TRIPANOSSOMÍASE AMERICANA)

A doença de Chagas é causada pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e foi descrita em 1909, pelo médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, durante um surto de malária que atingia operários que trabalhavam na construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, no município de Lassance, em Minas Gerais (CHAGAS, 1922). Na ocasião, ele descreveu detalhadamente o ciclo de vida do parasita e aspectos clínicos da fase aguda de pessoas infectadas, bem como o mecanismo de transmissão por meio de insetos hematófagos da família *Reduviidae* (subfamília *Triatominae*), popularmente conhecido como barbeiro (CHAGAS, 1922; MARIN-NETO et al., 1999).

No entanto, estudos realizados posteriormente analisaram fragmentos teciduais de múmias de regiões do Chile e do Peru e constataram a presença de DNA parasitário, indicando que a infecção por *T. cruzi* ocorre na humanidade há pelo menos 9 mil anos (GUHL et al., 2000; AUFDERHEIDE et al., 2003; TANOWITZ et al., 2009).

### 1.2. CICLO DE VIDA DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

A doença de Chagas em humanos pode ser considerada uma ocorrência acidental. Ao longo dos anos, os humanos entraram em contato com os focos naturais da infecção através de atividades exploratórias do ambiente e domesticação de animais silvestres, por exemplo, e podem ter sido infectados como uma adição única à extensa gama de hospedeiros do *T. cruzi*, que inclui outros mamíferos (primatas, cães, gatos, entre outros), e dessa forma iniciou-se um processo de adaptação e domiciliação às habitações humanas, através do qual os vetores tinham acesso direto a alimentos abundantes, bem como proteção contra mudanças climáticas e predadores (GROOM et al., 2017).

A infecção pelo *T. cruzi* ocorre através da transmissão do parasito pelo inseto vetor (triatomíneos pertencentes aos gêneros: *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*)

(COURA e VIÑAS., 2010; MOLINA e MOLINA., 2017). Esses insetos, que são hematófagos, após se alimentarem de sangue de animais vertebrados infectados, acabam por ingerir também o parasito na sua forma circulante (tripomastigota). Quando ingeridos pelo triatomíneo, os tripomastigotas se diferenciam em esferomastigotas, tornando-se inicialmente epimastigotas curtos, que possuem capacidade replicativa e característica não-infectiva (MARIN-NETO et al., 1999).

Após a migração para o intestino grosso do inseto, epimastigotas alongados se ligam à cutícula intestinal e dão origem a tripomastigotas metacíclicos infecciosos. Durante o processo de repasto sanguíneo entre o inseto vetor e o hospedeiro vertebrado, o abdome do triatomíneo se dilata e os tripomastigotas metacíclicos são lançados nas fezes e na urina do inseto, e dessa forma são liberados no local da picada na pele ou na mucosa do hospedeiro vertebrado, alcançando assim a corrente sanguínea (GROOM et al., 2017; LIDANI et al., 2017). Ao atingir a circulação do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas liberados pelo inseto vetor invadem diversos tipos celulares, seja por fagocitose (realizadas por macrófagos) ou penetrando ativamente em células não-fagocíticas, através da formação do vacúolo parasitóforo (LIDANI et al., 2017).

Depois de infectarem as células, os tripomastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplica por fissão binária. Depois de 9 ciclos de divisão binária, os parasitos voltam a assumir a forma de tripomastigota, e são lançados novamente na corrente sanguínea, podendo infectar outras células, ou ser absorvido por um outro inseto vetor, iniciando novamente o ciclo (Figura 1) (LIDANI et al., 2017; COURA et al., 2015).

No entanto, apesar de a principal rota de transmissão ser através do contato direto com o inseto vetor, existem outras vias de transmissão da doença como: (i) oral (através da ingestão de alimentos contaminados como caldo de cana, açaí, por exemplo); (ii) transfusão de sangue ou transplante órgãos ou (iii) congênita, o que contribuiu para a disseminação da doença para áreas não-endêmicas; (iv) acidentes laboratoriais (TANOWITZ et al., 2009; GROOM et al., 2017; WHO., 2019). No Brasil, a contaminação oral pelo consumo de alimentos contendo o *T. cruzi* tem sido uma das principais rotas de transmissão do parasito, promovendo a ocorrência de surtos agudos da doença (ANDRADE et al., 2014).

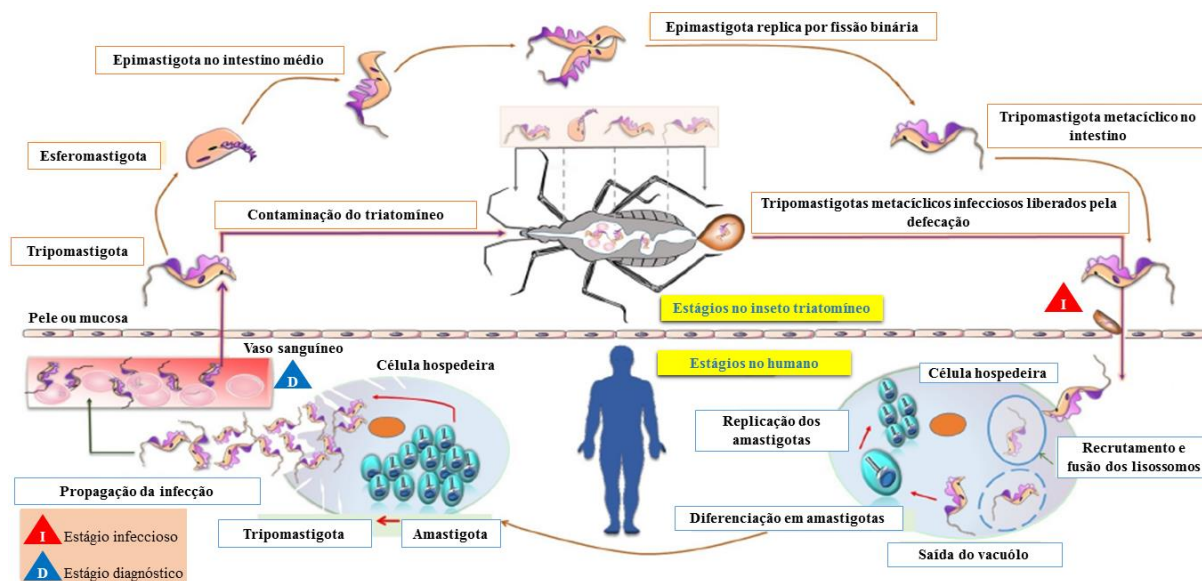


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (Adaptado de Lidani et al, 2017).

### 1.3. EPIDEMIOLOGIA

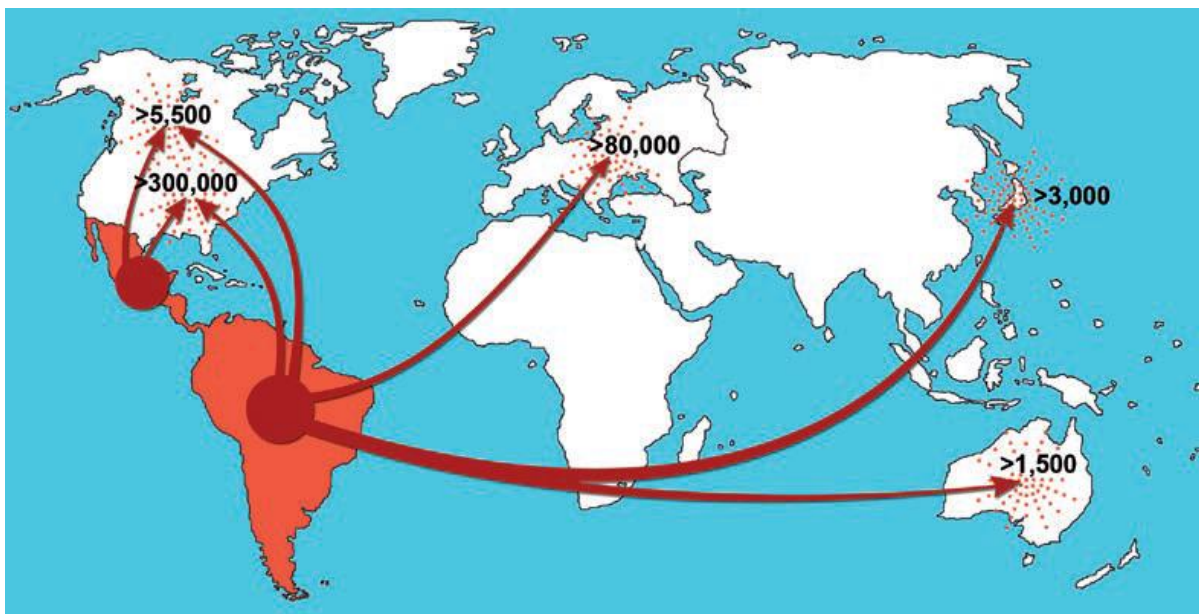
A doença de Chagas é uma antroponose endêmica da América Latina, compreendendo áreas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e do Chile. No século XX, a sua ocorrência estava associada a áreas rurais pobres, onde a principal rota de contaminação ainda era a transmissão do parasito através da picada do inseto vetor (MOLINA e MOLINA.,2017). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença de Chagas é uma das principais doenças parasitárias no mundo, figurando na lista de doenças tropicais negligenciadas (BENZIGER et al., 2017; WHO 2019).

A doença de Chagas apresenta elevada morbi-mortalidade, com significativo impacto socioeconômico, afetando principalmente populações mais pobres. Além das barreiras biomédicas e psicossociais para diagnóstico, tratamento e controle, a disponibilidade limitada de recursos e baixa prioridade política tornam essa doença um grave problema de saúde pública (BENZIGER et al., 2017).

Estima-se que 8 milhões de indivíduos estejam infectadas pelo *T. cruzi*, principalmente na América Latina, e que 25 milhões de pessoas vivem sob risco de adquirir a doença, a qual promove aproximadamente 10 mil mortes/ano ocorram em virtude da doença (WHO, 2019). Restrita inicialmente aos países da América Latina, devido ao processo migratório estimulado por fatores econômicos ou políticos,



indivíduos infectados da área endêmica se deslocam para regiões não-endêmicas como Estados Unidos, Canadá, alguns países da Europa, Ásia e Oceania (SCHMUNIS, 2007; COURA e VIÑAS, 2010) (Figura 2).



**Figura 2. Rotas de migração da América Latina e estimativa do número total de indivíduos infectados em países não endêmicos.** (Adaptado de Coura & Viñas, 2010).

A doença de Chagas tem impacto socioeconômico relevante, afetando e incapacitando indivíduos em idade economicamente ativa, representando perdas estimadas de 752 mil dias úteis/ano em virtude de mortes prematuras causadas pela doença e prejuízo de cerca de 1,2 bilhões de dólares devido a perda de produtividade em alguns países da América do Sul (CONTEH et al., 2010; BEHZINGER et al., 2017). No Brasil, a perda mínima estimada é de 5,6 milhões de dólares (CONTEH et al., 2010).

#### 1.4. DIAGNÓSTICO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS

Após a transmissão do *T. cruzi*, e um período de incubação de aproximadamente 12 dias, inicia-se a fase aguda da doença, período caracterizado por elevada parasitemia na corrente sanguínea (BASQUIERA et al., 2003). Essa fase tem duração aproximada de dois meses, e pode ser caracterizada pela presença de tripomastigotas circulantes no sangue e detecção de IgM anti-*T. cruzi*, e o hospedeiro infectado pode desenvolver quadro assintomático ou apresentar manifestações clínicas inespecíficas, tais como febre e anorexia, linfadenopatia,

hepatoesplenomegalia, além de inflamação e inchaço na pele no local da picada (chagoma de inoculação) ou o sinal de Romaña na pálpebra (TANOWITZ et al., 2009; LIDANI et al., 2017). No entanto, uma pequena parcela dos pacientes na fase aguda desenvolve alterações cardíacas em virtude da miocardite causada pelo *T. cruzi* (SIMÕES et al., 2018).

Depois da fase aguda, o hospedeiro entra na fase crônica da doença, a qual pode ser dividida nas formas indeterminada ou sintomática. Cerca de 60% dos indivíduos infectados encontram-se na forma indeterminada da doença, na qual não são observadas manifestações clínicas, mesmo com evidências parasitológicas de infecção pelo *T. cruzi*. Por outro lado, 10 a 30 anos após a infecção, aproximadamente 30% dos pacientes apresentam disfunções clínicas como: cardíacas (20-30%), digestivas (10-15%) e cardiodigestivas (1-5%), como demonstrado na figura 3 (TANOWITZ et al., 2009; LIDANI et al., 2017).

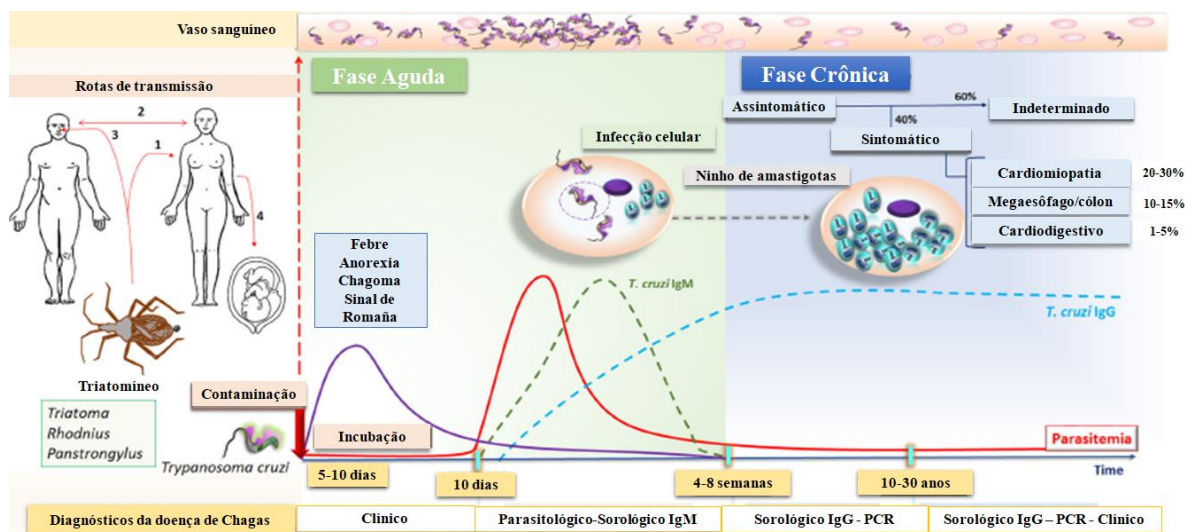


Figura 3. Fases e aspectos clínicos da doença de Chagas. (Adaptado de Lidani et al, 2017).

### 1.5. CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA E ARRITMIAS

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é caracterizada por uma miocardite difusa, miocitólise, deposição de fibrose e isquemia na região subendocárdica. Este processo leva ao desenvolvimento da cardiomegalia, aneurisma apical e arritmias, culminando na insuficiência cardíaca, sendo a principal causa de morte na América Latina (DIAS e COURA, 1997).

O quadro é agravado pela destruição das fibras nervosas parassimpáticas, exacerbando a ação do sistema nervoso autônomo simpático sobre o coração, produzindo efeitos cardiotóxicos. A progressão da doença de Chagas envolve um processo de remodelamento cardíaco, que inclui um conjunto de alterações compensatórias do órgão ao comprometimento mecânico, a fim de manter a homeostasia corporal. Esta resposta adaptativa caracteriza-se por alteração na forma e tamanho do órgão, assim como a função do miocárdio (BOCCHI e FIORELLI, 2001; MARIN-NETO et al., 2007).

Dentre as manifestações clínicas presentes na fase crônica da doença, as arritmias ventriculares destacam-se como uma das principais causas de morte súbita cardíaca nesses pacientes (KUMAR, 2016), apresentando diferentes graus de gravidade que abrangem desde extrassístoles até distúrbios graves da condução atrioventricular e intraventricular, além das arritmias ventriculares complexas (MARIN-NETO et al., 1999; SIMÕES et al., 2018). As arritmias podem acometer indivíduos com função sistólica normal (KUMAR., 2016), e sua gênese pode ser decorrente de eventos isquêmicos, inflamatórios e fibróticos que formam substratos arrítmicos e, conseqüentemente, compromete o acoplamento elétrico (MARIN-NETO et al., 1999; BARBOSA et al, 2015). Esses distúrbios de condução são comuns na doença de Chagas e podem se manifestar como bloqueio de ramo direito, bloqueio atrioventricular, disfunção do nó sinusal e podem ser observadas no eletrocardiograma (BARBOSA et al., 2015; HEALY et al., 2015).

No que se refere ao acoplamento elétrico, é essencial para a propagação normal do impulso através do coração, juntamente com a excitabilidade adequada dos cardiomiócitos e da arquitetura normal dos tecidos. A redução do acoplamento elétrico pode aumentar a propensão a arritmias, tornando o ventrículo mais suscetível à reentrada. Esta condição pode estar associada à disfunção e desorganização da proteína conexina43 (BARBOSA et al., 2015; MICHELA et al., 2015).

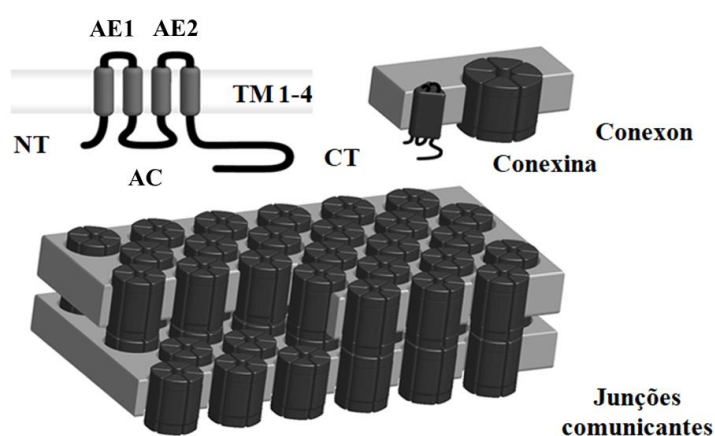
## 1.6. TRATAMENTO

A intervenção terapêutica para esta doença tem eficácia restrita à infecção aguda, e é limitada à utilização dos fármacos benznidazol ou nifurtimox. No entanto,

esses medicamentos não apresentam eficácia na cura da CCC estabelecida. Na fase crônica, o tratamento é sintomático, apresentando efeitos colaterais como náuseas, erupções cutâneas, insuficiência renal e hepática, por exemplo (CLAYTON., 2010; URBINA., 2010). O transplante cardíaco configura como a única alternativa terapêutica eficaz para os pacientes com insuficiência cardíaca decorrente da CCC (BOCCHI e FIORELLI, 2001; RASSI et al., 2007, JÚNIOR et al., 2017). Este procedimento é complexo e oneroso, a disponibilidade de órgãos é inferior à demanda e o uso de corticoides pós-transplante pode reativar o parasitismo tecidual latente destes indivíduos (BOCCHI e FIORELLI, 2001).

### 1.7. JUNÇÕES COMUNICANTES E CONEXINA 43 (CX43)

As junções comunicantes (JC) são canais envolvidos em fenômenos fisiológicos desde o desenvolvimento embrionário até a condução dos potenciais de ação cardíaco, sendo responsáveis por promover a comunicação intercelular e pela manutenção da homeostase cardíaca (ADESSE et al., 2008). São formados por hemicanais (ou conexons) compostos por proteínas da família das conexinas. As conexinas possuem 20 isoformas nos roedores e 21 nos humanos, que são codificados por diferentes genes (SÖHL e WILLECKE., 2004). As conexinas são proteínas integrais de membrana, e sua estrutura é composta por 4 domínios transmembranas (TM), 2 alças extracelulares (AE), 1 alça citoplasmática (AC) e extremidades terminais N (NT) e C (CT) (Solan & Lampe., 2009; Axelsen et al., 2013) (Figura 4).



**Figura 4. Estrutura da conexina43 e formação das junções comunicantes** (Adaptado de Axelsen et al, 2013).

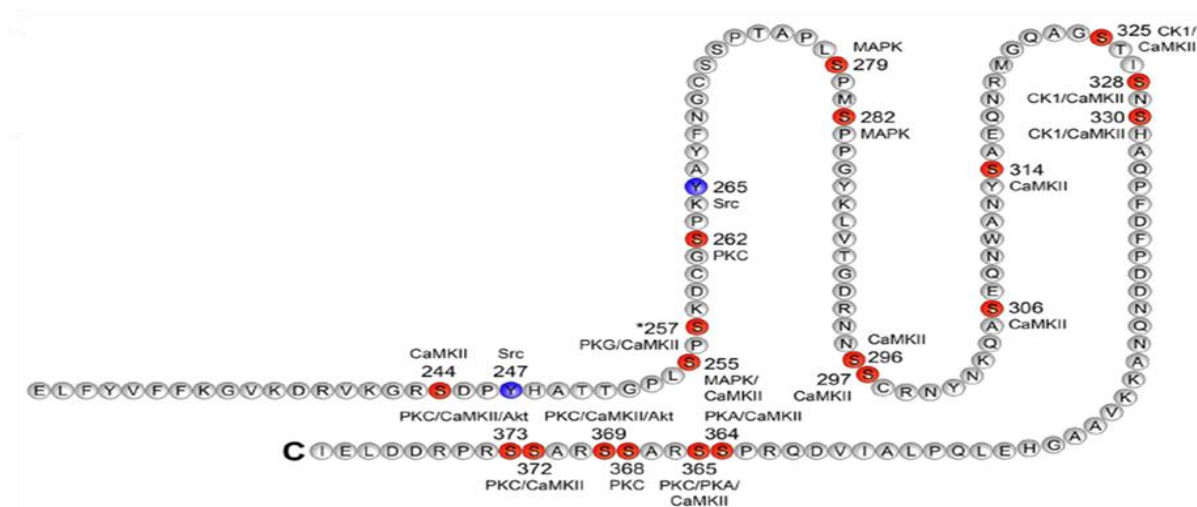
Seis conexinas são oligomerizadas no aparelho de Golgi e transportadas para a membrana plasmática, onde poderão agir transportando pequenas moléculas (AMPC, IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, por exemplo) para o meio extracelular ou ancorando por um hemicanal da célula vizinha, formando a junção comunicante, permitindo a troca de íons e moléculas que agem como segundos mensageiros entre células adjacentes e promovendo, assim, a comunicação célula-célula (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2017). Dentre as proteínas desta família, a isoforma conexina 43 (Cx43), destaca-se por estar presente de forma mais abundante principalmente no ventrículo esquerdo do coração, na região dos discos intercalares dos cardiomiócitos sob condições fisiológicas normais (DUFFY et al., 2006; AXELSEN et al., 2013), promovendo comunicação *ponta-a-ponta* entre cardiomiócitos vizinhos (KOHUTOVA et al., 2019).

Os discos intercalares são formados por um complexo juncional composto pelas junções comunicantes (formada pelas conexinas), junções aderentes (formada pela proteína N-caderina) e os desmossomos (complexo proteico composto pelas proteínas placoglobina, placofilina e desmoplaquina) (TÁVORA et al., 2013). Como descrito na literatura, alterações na expressão de proteínas desmossomais e da N-caderina nos discos intercalares podem contribuir para o prejuízo do acoplamento elétrico cardíaco (LI et al., 2006; TÁVORA et al., 2013), visto que podem contribuir para a translocação da Cx43 dos discos intercalares para a membrana lateral do cardiomiócito sob condições patológicas. Esse processo de lateralização promove comunicação *lado-a-lado* entre os cardiomiócitos vizinhos, o que resulta na desaceleração da condução elétrica no coração, favorecendo o surgimento de arritmias (KOHUTOVA et al., 2019). Quando a ativação elétrica e a propagação do potencial de ação são comprometidas é indicativo de que a função da Cx43 está prejudicada (HESKETH et al., 2010).

Sob condições fisiológicas normais, a permeabilidade e condutividade das JC são controladas por processos multifatoriais (KOHUTOVA et al., 2019). Esses processos podem estar associados a alterações na expressão da Cx43, tais como o estado de fosforilação de diferentes resíduos de aminoácidos (figura 5) (SOLAN & LAMPE., 2009, RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2017), pH intercelular, e concentração de Ca<sup>+</sup>, o que pode levar à sua disfunção, desorganização e re-distribuição dentro da célula cardíaca (PERACCHIA., 2004; KOHUTOVA et al., 2019), isso acontece

quando a fosforilação ocorre no resíduo de serina 368 (S368), por exemplo (RIBEIRO-RODRIGUES et al.,2017).

Alterações na expressão de Cx43, que em camundongos é codificada pelo gene *Gaj1*, já foram demonstradas anteriormente na infecção in vitro de cardiomiócitos por *T. cruzi* (ADESSE et al., 2008; ADESSE et al., 2011) e in vivo em modelo experimental de doença de Chagas (JELICKS et al., 2014; PEREIRA et al., 2015).



**Figura 5. Extremidade C-Terminal da Cx43.** Resíduos de aminoácidos (serina-vermelho ou tirosina-azul) que sofrem fosforilação. (Adaptado de Axelsen et al., 2013).

## 1.8. DOENÇA DE CHAGAS, ARRITMIAS E CX43

A CCC é a principal manifestação clínica da doença devido à sua gravidade e mortalidade elevadas, sendo uma das principais causas de morte súbita resultantes de anormalidades no sistema de condução elétrico no coração (VOLPE et al.,2018). A cardiopatia na fase crônica da doença de Chagas é marcada por intenso processo inflamatório, necrose e fibrose no miocárdio (JR et al., 2000; ROSSI., 1991; ROSSI e RAMOS., 1996). Estudos prévios já demonstraram a correlação entre a progressão da fibrose e a dilatação ventricular e a disfunção sistólica, bem como sua relação com a ocorrência de arritmias, condições que podem afetar indivíduos que apresentam ou não alterações cardíacas, inclusive aqueles com a forma indeterminada da doença (VOLPE et al.,2018; NOYA-RABELO et al., 2018).

Por se tratar de uma doença com características inflamatórias e arritmogênicas, citocinas como fator transformador de crescimento -  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) podem contribuir para desorganização na estrutura da JC e redução da expressão e distribuição da Cx43, comprometendo a condução elétrica (FERNANDEZ-COBO et al, 1999; ARAÚJO-JORGE et al., 2008; WHAGABI et al., 2009).

Dentre as citocinas presentes no coração chagásico, o TGF- $\beta$  é um importante regulador de diversos processos biológicos, e na doença de Chagas está diretamente associada ao desenvolvimento da CCC, regulando a invasão celular pelo parasito e seu ciclo nas células cardíacas; inflamação e resposta imune; fibrose e remodelação, e modulação da JC e condução elétrica do coração (ARAÚJO-JORGE et al., 2008; ARAÚJO-JORGE et al., 2012). Estudos prévios demonstraram que o TGF- $\beta$  pode modular a formação das junções comunicantes e consequentemente prejudicar a comunicação célula-célula reduzindo a expressão da conexina 43 em células cardíacas (WAGHABI et al., 2009; ARAÚJO-JORGE et al., 2012; SALVARANI et al., 2017).

Outra importante citocina pró-inflamatória é o IL-1 $\beta$ , que contribui para a ocorrência de eventos arrítmicos, promovendo o aumento da duração do potencial de ação, induzindo as correntes de potássio e aumentando os picos de cálcio no cardiomiócito (MONNERAT et al, 2016). Além disso, como descrito na literatura, essa citocina promove a fosforilação da proteína p38 MAPK, que leva ao aumento da fosforilação no resíduo S368 da conexina 43, prejudicando a comunicação celular e prolongando a duração do intervalo QRS (ZHONG et al, 2018). Já o TNF- $\alpha$  foi descrito por Fernandez-Cobo (1999) como sendo responsável pela diminuição da expressão da Cx43 durante processos inflamatórios cardíaco, reduzindo a atividade do promotor da Cx43. Por outro lado, estudos que avaliaram a relação do FGF-2 com a Cx43 mostraram que essa citocina é importante para a manutenção da homeostase cardíaca e sua ausência reduz a fosforilação nos resíduos S325/328/330 da Cx43, que são importantes para a montagem e estabilidade das junções comunicantes (SAKURAI et al, 2013).

Como descrito anteriormente, as JCs promovem a comunicação celular entre células vizinhas. No coração, esses canais são formados principalmente pela

proteína Cx43, e são responsáveis pela condução do impulso elétrico pelo tecido muscular cardíaco, contribuindo para atividade contrátil adequada do órgão. Porém, assim como acontece em outras doenças arritmogênicas (como infarto e isquemia, por exemplo) (SEVERS, 2001), na infecção por *T. cruzi* ocorre redistribuição e alteração na expressão Cx43, o que resulta na desorganização das JCs na fase aguda. (ADESSE et al., 2008; ADESSE et al., 2011).

No entanto, ainda não existem trabalhos na literatura que descrevam de forma clara o padrão de distribuição da Cx43 bem como a fosforilação do resíduo de serina 368 em corações chagásicos crônicos em modelo experimental e de corações explantados de pacientes chagásicos crônicos. Diante disso, a proposta deste trabalho foi investigar a distribuição, expressão e fosforilação da proteína Cx43 em amostras de tecido muscular cardíaco obtidos de camundongos chagásicos crônicos, e correlacioná-las com expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  uma vez que a caracterização adequada das alterações na Cx43 ocorridas nos pacientes que desenvolveram a CCC é importante para o melhor entendimento sobre a doença de Chagas, buscando a identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos potenciais.



## 2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, causada pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma doença debilitante e de curso fatal na fase crônica. Tem grande impacto socioeconômico, principalmente nos países endêmicos, visto que afeta principalmente a população economicamente ativa, além dos custos elevados com o tratamento. A principal manifestação clínica da doença é a CCC, que é uma manifestação severa e de elevada mortalidade, sendo uma das principais causas de morte súbita provenientes de anormalidades no sistema de condução elétrico no coração, que podem estar associadas com disfunções da proteína conexina 43.

Tendo em vista de que ainda não existe uma terapia definitiva para a CCC, sendo o transplante cardíaco a única alternativa terapêutica para os pacientes com insuficiência cardíaca, e que consiste em um procedimento complexo e oneroso, tendo a disponibilidade de órgãos é inferior à demanda e que o uso de corticoides pós-transplante pode reativar o parasitismo tecidual latente destes indivíduos, buscamos neste projeto caracterizar as alterações na expressão e distribuição, bem como a fosforilação do resíduo S368 da proteína Cx43 em corações chagásicos crônicos, visto que o entendimento das alterações na expressão de conexina 43 na doença de Chagas poderá contribuir para a identificação de novos marcadores moleculares e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para pacientes com CCC.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Investigar o padrão de expressão e distribuição da conexina 43 em corações chagásicos crônicos.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a progressão das alterações cardíacas na fase crônica da doença, no modelo experimental, através de análises funcionais e morfométricas.
- ✓ Avaliar a localização da Cx43 total e Cx43 fosforilada (S368) em corações chagásicos crônicos em relação a controles não-infectados.
- ✓ Avaliar a expressão gênica da Cx43 e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) em corações de camundongos chagásicos crônicos em relação a controles não-infectados.
- ✓ Validar as alterações no padrão de expressão em corações chagásicos humanos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 ( $n = 50$ ), machos, com 4 semanas de idade, obtidos do biotério do Centro de Terapia Celular e Biotecnologia do Hospital São Rafael. Os camundongos foram mantidos à temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C), umidade controlada (50%), com ração e a água *ad libitum*, e expostos a um ciclo claro-escuro constante de 12 horas. Todos os procedimentos estão de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital São Rafael (Protocolo 011/18).

### 4.2. INFECÇÃO COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Os camundongos foram infectados, por injeção intraperitoneal, com  $10^3$  tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, obtidas por infecção *in vitro* da linhagem celular LCC-MK2. A parasitemia foi avaliada em diferentes períodos pós-infecção contando o número de tripomastigotas em alíquotas de sangue periférico. Seis ( $n=25$ ) e doze ( $n=25$ ) meses após a infecção, respectivamente, os animais foram avaliados quanto à função cardíaca (teste ergométrico e eletrocardiograma), comparando grupos de animais não-infectados ( $n=10$ ) e infectados ( $n=15$ ) em cada período pós-infecção. Depois disso, os animais foram eutanasiados e os corações preparados para análises de imunofluorescência, microscopia eletrônica (*Immunogold*), RT-PCR (Figura 6).

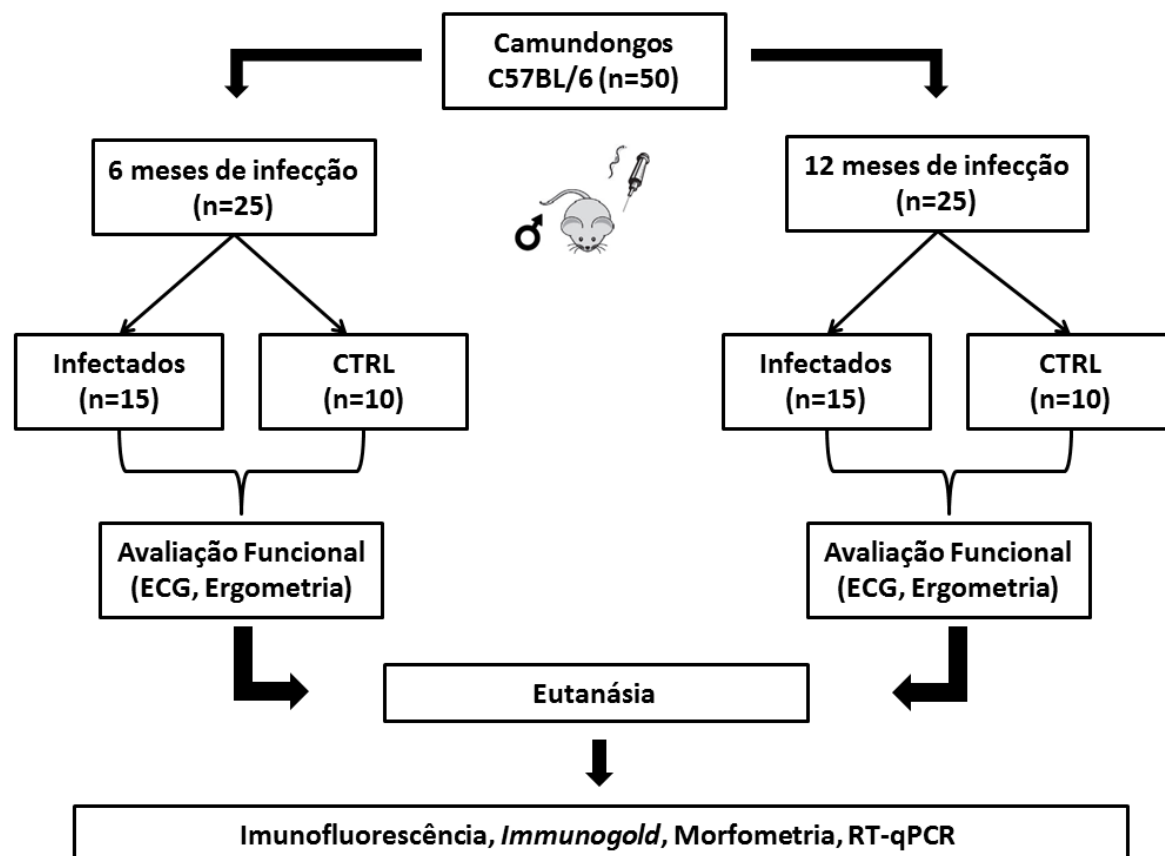


Figura 6. Desenho do estudo.

#### 4.3. ELETROCARDIOGRAMA (ECG)

Para aquisição dos dados eletrocardiográficos, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com Isoflurano (0,5 a 2%). Os registros eletrocardiográficos foram obtidos utilizando o sistema Bio Amp Powerlab (PowerLab 2\20, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Austrália) por meio das derivações bipolares I e II, e os dados obtidos foram analisados no programa LabChart7(PowerLab) com filtros na faixa de 1 a 100 Hz para minimizar os distúrbios do sinal ambiental, e taxa de amostragem foi de 1 kHz.

Os parâmetros avaliados no ECG incluíram frequência cardíaca, intervalo PR, duração da onda P, intervalo QT, Intervalo QT corrigido (QTc) e arritmias. As durações das ondas (ms) e a frequência cardíaca foram calculadas automaticamente pelo software. O QTc foi calculado como a razão do intervalo QT por raízes quadradas do intervalo RR (fórmula de Bazett).

#### 4.4. TESTE ERGOMÉTRICO

A avaliação da capacidade de realizar exercício foi realizada em uma câmara com esteira ergométrica para um animal (LE 8700; Panlab, Barcelona, Espanha). A velocidade da esteira e a intensidade do choque (mA) foram controladas por um potenciômetro (LE 8700 controle da esteira, Panlab). A velocidade inicial foi de 6 cm/s, com incremento de mais 6 cm/s a cada 5 minutos, até que o animal atinja a exaustão e permaneça por um período de 10 segundos na grade de aço inoxidável eletrificada que serve como estímulo para que o animal realize a atividade. Os parâmetros avaliados foram a distância percorrida e tempo total de exercício.

#### 4.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para as análises por imunofluorescência, fragmentos obtidos do ventrículo esquerdo do tecido muscular cardíaco humano e todo o ventrículo esquerdo de cada animal foram submetidos à fixação em formalina 10%, para posterior inserção em parafina e preparação de lâminas. Secções de parafina (3  $\mu$ m) foram desparafinizadas em xilol (5 minutos) e reidratadas em banhos de álcool gradativos (5 minutos cada). Em seguida, as lâminas foram colocadas em tampão citrato (pH 6.0) e aquecidas (98°C) para recuperação antigênica. Após o aquecimento, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente e lavadas com PBS, antes do bloqueio de sítios inespecíficos com Cas-blocK (*Thermo Fisher Scientific*) durante 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-conexina 43 (1:100, *Santa Cruz Biotechnology*); anti-Cx43(pS368) (1:50; *Thermo Fisher Scientific*) produzidos em coelho, diluídos em PBS/BSA 1% “overnight”, a 4 °C.

Depois da incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS/tween 0,05% em PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 568 (*Life Technologies*, 1:1000) e WGA (1:1000), por 1 hora, à temperatura ambiente. As lavagens com PBS/tween 0,05% em PBS foram repetidas e as lâminas foram montadas com meio de montagem vectashield com DAPI (*Vector Laboratories*). As imagens foram obtidas no microscópio Confocal espectral modelo TCS SP8 (*Leica*) e analisadas no programa Image Pro versão 7.0 (*Media Cybernetics*).

#### 4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – IMMUNOGOLD

Fragmentos do ventrículo esquerdo do coração foram colocados em fixador contendo glutaraldeído (1%), paraformaldeído (4%), ácido pícrico (0,2%) e cacodilato de sódio 0,1 M por, no mínimo, 3 h, a 4°C. Após a fixação, os fragmentos foram lavados com cacodilato de sódio 0,1 (3x10 minutos). Depois da lavagem, foi feita desidratação seriada em etanol. Em seguida, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente em uma mistura de LR-Gold (Plano, Wetzlar, Alemanha) e etanol (na proporção 1:2; 1:1 e depois 2:1), por 18 h em cada uma das misturas.

A resina foi fotopolimerizada com luz UV (360 nm) a -15°C durante 48 h. Seções ultrafinas foram transferidas para grades de níquel revestidas com colódio. As grades foram enxaguadas em PBS 0,1 M durante 5 min, depois bloqueadas com Glicina 50 mM por 30 minutos. Depois do bloqueio, as grades foram novamente lavadas com PBS 0,1 M contendo BSA-C a 10% (Aurion, Wageningen, Holanda, Código 900.099) e Tween 20 a 0,1% (Sigma-Aldrich, Hamburgo, Alemanha, P1379). Em seguida, as grades foram incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário anti-conexina 43 (*Santa Cruz Biotechnology*) na diluição de 1:10.

Depois da incubação com o anticorpo primário, as grades foram lavadas em PBS 0,1 M (3x5 min) e incubadas durante 1 h com o anticorpo secundário anti-coelho feito em cabra conjugado com ouro coloidal (10 nm) (*Sigma-Aldrich*). Após a lavagem em PBS 0,1 M, as grades foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas com um microscópio eletrônico Zeiss EM 109. Para controles negativos, as grades foram incubadas em PBS 0,1 M ao invés do anticorpo primário.

#### 4.7. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS

As amostras de tecido muscular cardíaco foram submetidas à fixação em formalina 4%, para posterior inclusão em parafina e preparação de cortes histológicos. A análise da quantificação da inflamação e percentual de tecido fibrótico foi realizada em lâminas observadas por microscopia de campo claro depois de coradas com hematoxilina-eosina (HE) ou picrossírius vermelho, respectivamente. As imagens foram digitalizadas usando uma câmera digital CoolSnap adaptada ao microscópio AX-70 (Olympus) e analisadas usando o programa Image-Pro Plus

versão 5.0 (Media Cybernetics), permitindo a contagem das células do infiltrado inflamatório em dez campos por corte de coração, corados por HE, integradas por área. O percentual de fibrose foi determinado usando o mesmo programa, integrando as áreas de tecido fibrótico e não-fibrótico em cada campo, em cortes de corações corados com picrossírius vermelho.

#### 4.8. RT-qPCR

Para a extração dos mRNAs nas amostras do tecido muscular cardíaco, foi utilizado o método de Trizol® (*Thermo Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante. A quantidade e pureza de RNA foram avaliadas através de espectrofotômetro Nanodrop 2000c (*Thermo Scientific*). A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® (*Thermo Scientific*). Todos os procedimentos seguiram as recomendações do fabricante.

Para a avaliação da expressão gênica, foram utilizados o reagente Taqman *Universal Master Mix* (APPLIED BIOSYSTEMS) e sondas para *Tnf-α* (Mm00443258\_m1), *Il-1β*(Mm00434228\_m1) e *Gja1*(Mm00439105\_m1), utilizando o equipamento *7500 Real Time PCR System* (APPLIED BIOSYSTEMS).

Para a normalização das amostras, foi utilizado o gene *Gapdh*(Mm99999915 g1) e a quantificação relativa da expressão gênica foi realizada comparando amostras do tecido muscular cardíaco de camundongos chagásicos e de controles não-infectados utilizando o modelo matemático denominado  $\Delta$ CT.

#### 4.9. MATERIAL HUMANO

Amostras de tecido muscular cardíaco explantado foram obtidas em colaboração com os Drs. Fábio Távora e João David de Souza Neto, do serviço de transplante cardíaco do Hospital de Messejana, Ceará, Fortaleza. Foram incluídos no estudo amostras provenientes de corações de pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica (n= 4) e biópsia miocárdica de corações normais transplantados (n= 1). As amostras foram submetidas à análise de imunofluorescência para análise da distribuição da Cx43 total e fosforilada (S368).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Messejana (Número do parecer: 3.255.044).

#### 4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

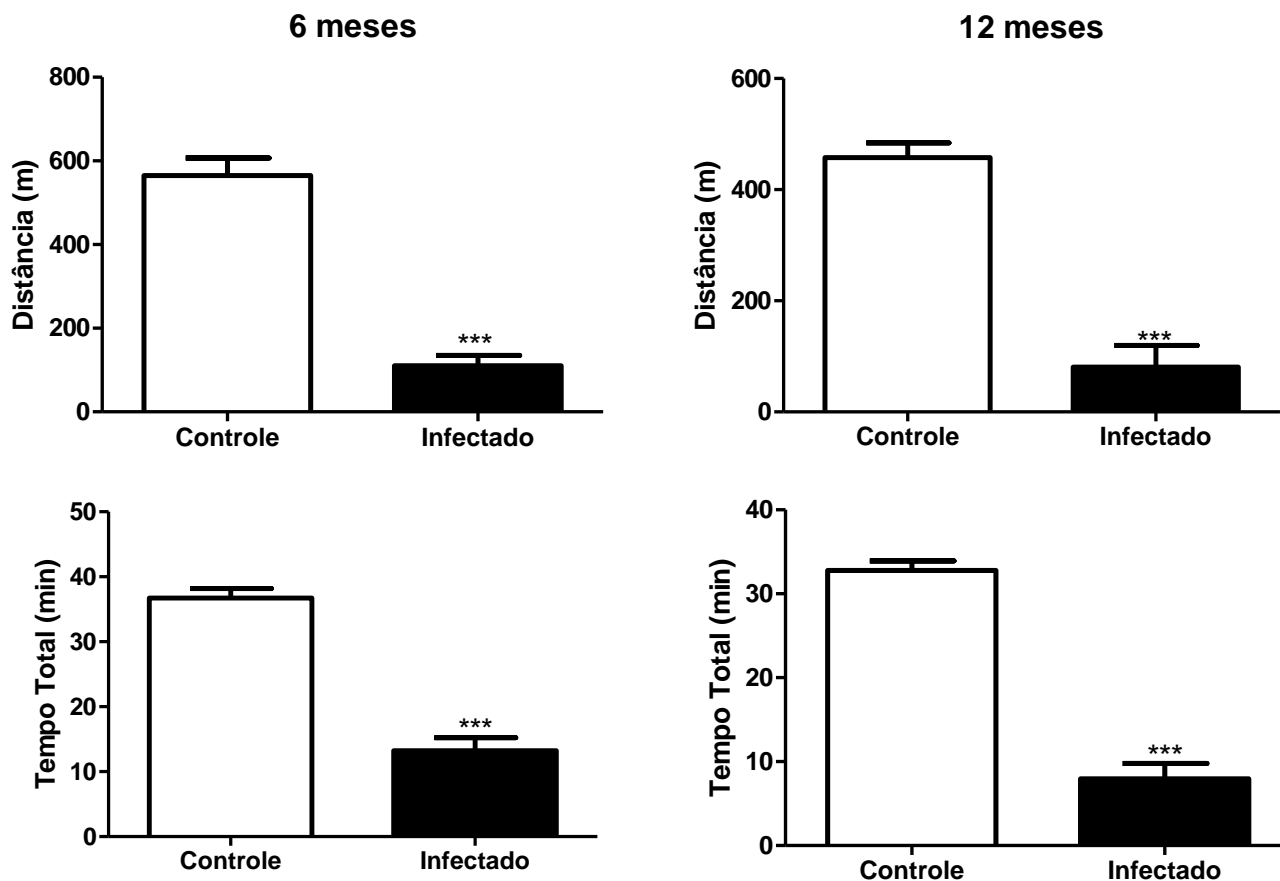
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de média para o número de animais em cada grupo. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar as variáveis quantitativas dos grupos em um ponto. Diferença significativa foi considerada para os valores de *p* inferiores a 0,05. A análise estatística foi realizada com o programa Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA).



## 5. RESULTADOS

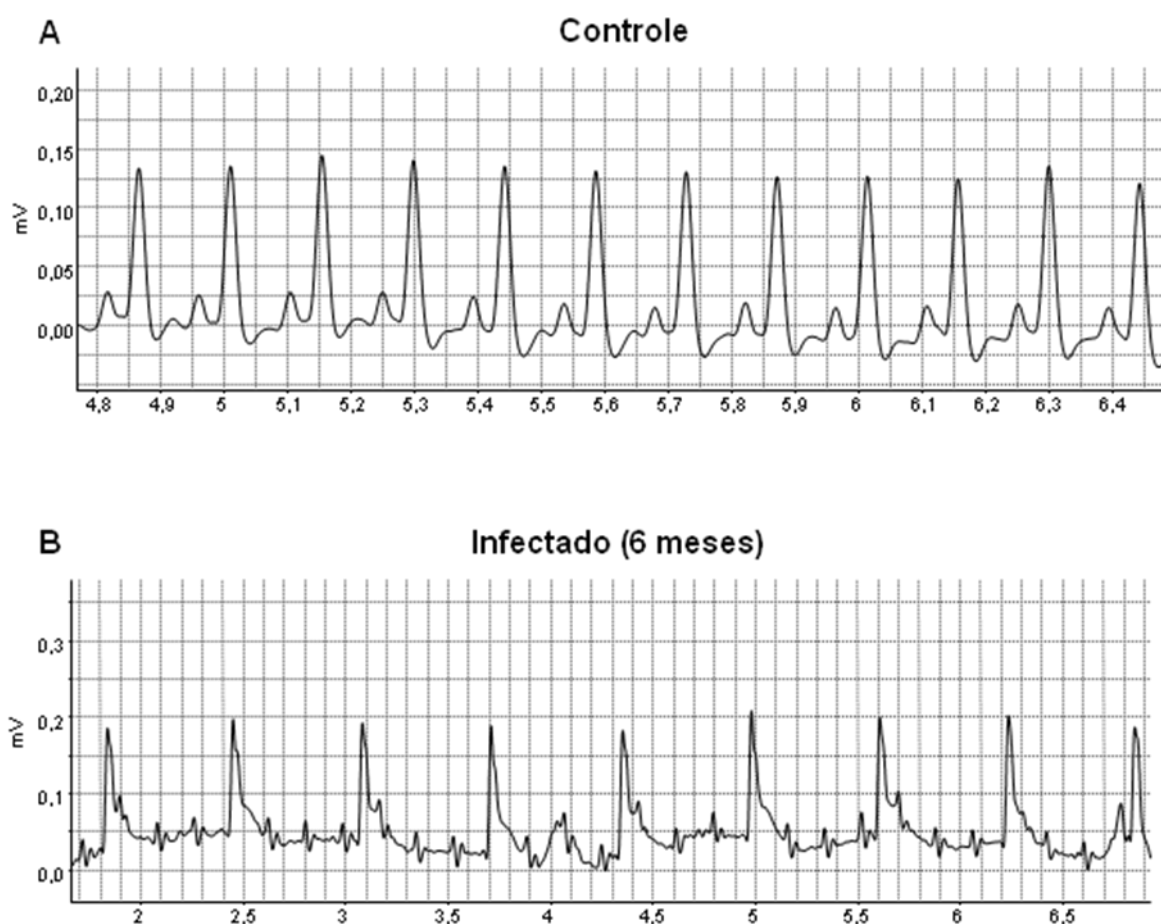
### 5.1. AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DA DISFUNÇÃO CARDÍACA NO MODELO EXPERIMENTAL DE CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA

Camundongos C57Bl/6 infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* apresentam alterações cardíacas funcionais e histológicas na fase crônica. Para a avaliação funcional, os camundongos foram submetidos ao teste de esforço (ergometria) a fim de avaliar sua capacidade de realizar exercício. Os camundongos chagásicos crônicos com 6 ou 12 meses de infecção apresentaram um desempenho inferior ao do grupo controle não infectado, correndo uma distância significativamente menor do que os animais do grupo controle (figura 7).



**Figura 7. Avaliação da capacidade de exercício em teste ergométrico.** Grupos de camundongos com CCC e controles não infectados foram submetidos ao teste ergométrico nos tempos de 6 e 12 meses pós-infecção. Os valores representam a média±SEM de 9-15 animais/grupo. \*\*\*p<0,001.

A análise eletrofisiológica do coração dos camundongos foi realizada por ECG, demonstrando a presença de diversas alterações nos grupos chagásicos tanto em 6 quanto em 12 meses de infecção (figura 8 e tabelas 1 e 2). As alterações encontradas correspondem a diferentes tipos de arritmias, tais como taquicardia ventricular monomórfica, taquicardia ventricular polimórfica, ritmo juncional, dissociação atrioventricular e bloqueio atrioventricular, sendo que um dos animais apresentou mais de um distúrbio de condução. Já os animais do grupo controle (CTRL) permaneceram com o ritmo sinusal normal (figura 8 e tabelas 1 e 2).



**Figura 8. Representação do registro eletrocardiográfico.** A) Registro de camundongo controle (não-infectado) com ritmo sinusal normal. B) Registro de camundongo chagásico com dissociação atrioventricular.

**Tabela 1.** Alterações observadas no ECG de camundongos chagásicos e não-infectados seis meses pós-infecção

<b>6 meses</b>	<b>Ritmo sinus normal</b>	<b>Taquicardia ventricular monomórfica</b>	<b>Ritmo juncional</b>	<b>Dissociação atrioventricular</b>	<b>Bloqueio atrioventricular</b>
<b>Controle (n=8)</b>	8	-	-	-	-
<b>Infectado (n=14)</b>	-	2	2	10	-

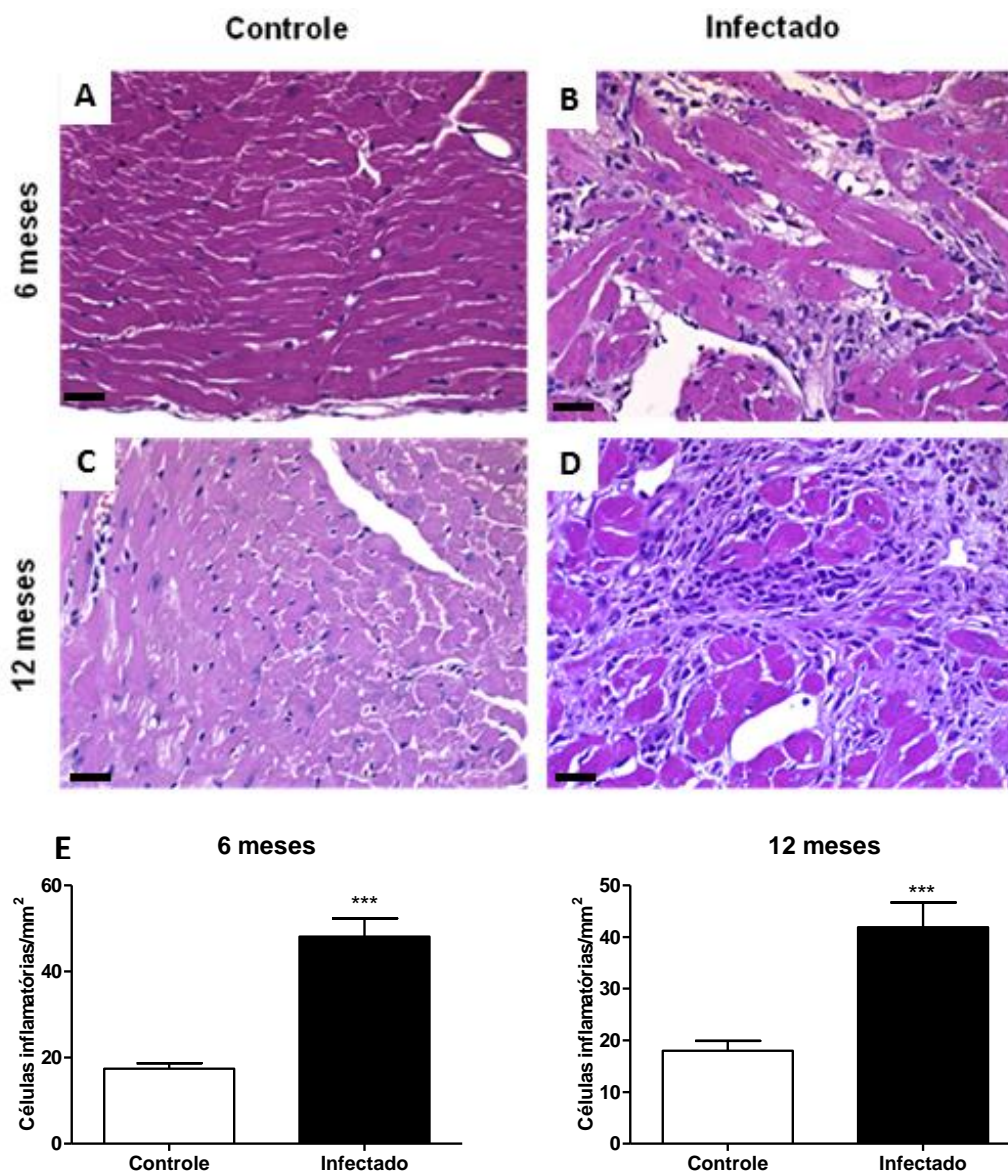
**Tabela 2.** Alterações observadas no ECG de camundongos chagásicos e não-infectados doze meses pós-infecção

<b>12 meses</b>	<b>Ritmo sinus normal</b>	<b>Taquicardia ventricular polimórfica</b>	<b>Ritmo juncional</b>	<b>Dissociação atrioventricular</b>	<b>Bloqueio atrioventricular</b>
<b>Controle (n=10)</b>	10	-	-	-	-
<b>Infectado (n=8)*</b>	-	3	1	3	2

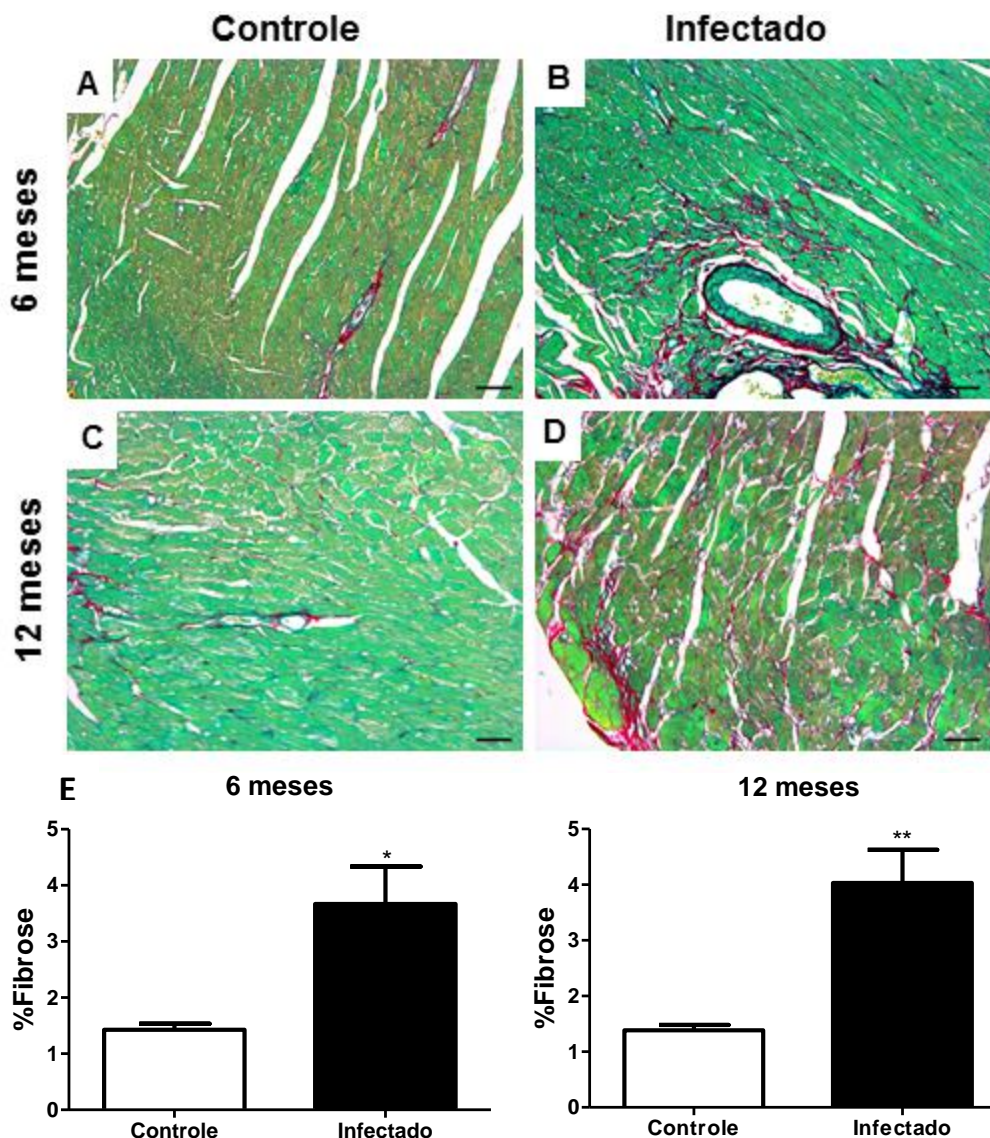
\* Um animal desse grupo apresentou duas alterações ao ECG.

## 5.2. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS

Secções de corações de camundongos infectados pelo *T. cruzi* apresentaram intenso infiltrado inflamatório multifocal composto predominantemente por células mononucleares, nos dois tempos avaliados (6 e 12 meses pós-infecção (figura 9). A análise de fibrose, realizada em cortes corados por picrossírius vermelho, demonstram um aumento de deposição de colágeno com a progressão da doença (figura 10).



**Figura 9. Quantificação do infiltrado inflamatório em corações de camundongos chagásicos e controles.** Cortes representativos de corações de animais não-infectados do grupo controle (A e C) e de animais com 6 (B) e 12 (D) meses pós-infecção por *T. cruzi* corados com hematoxilina e eosina. (E) Quantificação de células inflamatórias no tecido muscular cardíaco de animais não infectados e chagásicos por análise morfométrica. Os valores representam a média±SEM de 5 animais/grupo. \*\*\* $p < 0,001$ . Barras = 25 $\mu$ m.



**Figura 10. Quantificação de fibrose no coração de camundongos chagásicos e controles.** Cortes representativos de corações de animais não-infectados do grupo controle (A e C) e de animais com 6 (B) e 12 (D) meses pós-infecção por *T. cruzi* corados com picrossírius vermelho. (E) Quantificação de fibrose em corações de animais não infectados e chagásicos por análise morfométrica. Os valores representam a média±SEM de 5 animais/grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Barras = 50  $\mu$ m.

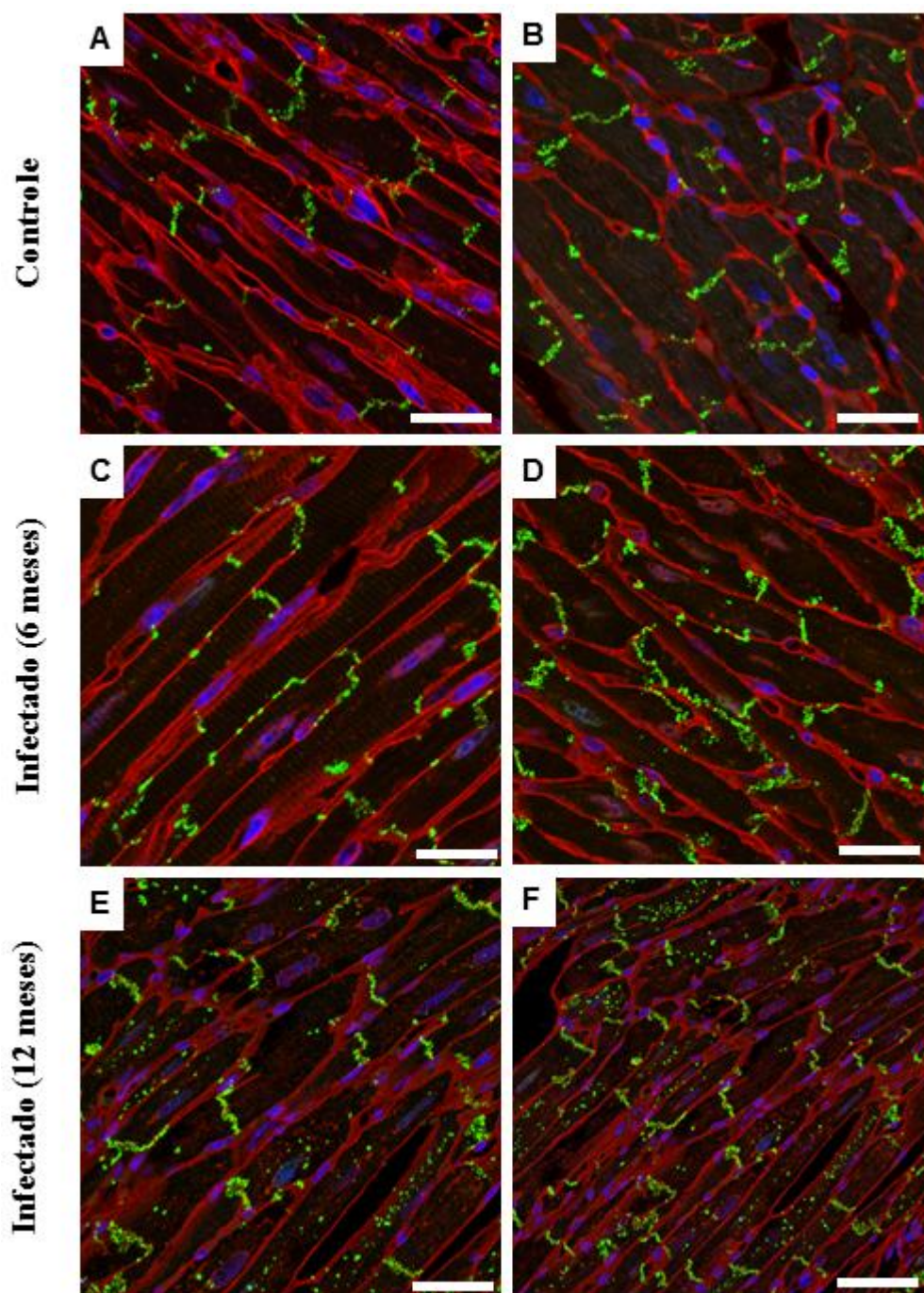
### 5.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DA CX43 EM CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS

Amostras de tecido muscular cardíaco coletados após eutanásia dos camundongos foram utilizadas para análise da distribuição da Cx43 por imunofluorescência. Em amostras de camundongos controles não infectados, a expressão de Cx43 total está localizada predominantemente nos discos intercalares (figura 11). Já nos corações de camundongos chagásicos, observamos já com 6

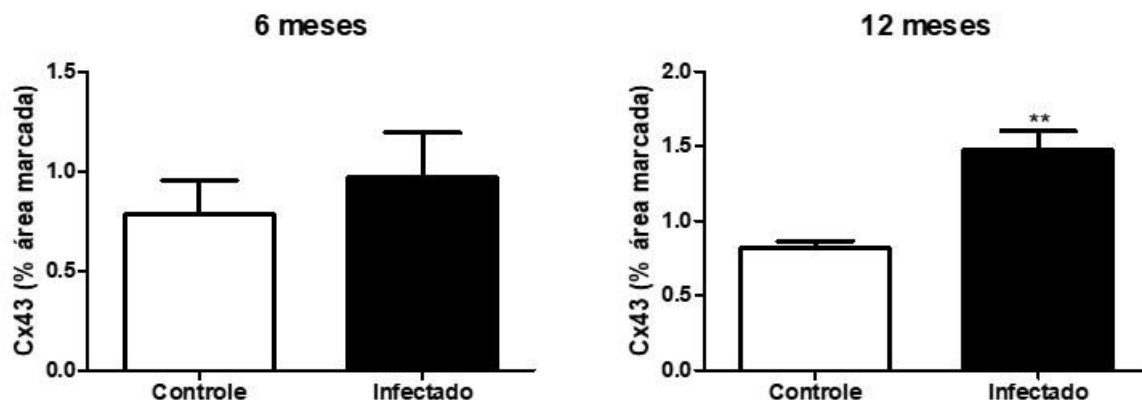
meses de infecção alterações no padrão de localização da proteína, presente também fora dos discos intercalares, como na membrana lateral e no interior dos cardiomiócitos. Essas alterações ficam mais evidentes no tempo de 12 meses pós-infecção, sobretudo a marcação no citoplasma dos cardiomiócitos (figura 11). A quantificação da marcação no tempo de 6 meses não apresentou diferença significativa dos corações infectados quando comparados ao controle não-infectado, enquanto no tempo de 12 meses mostrou um aumento na área marcada com o anticorpo contra Cx43 total nos corações dos animais infectados, quando comparados ao de corações do grupo controle (figura 12).

Secções de corações dos animais foram também marcadas com anticorpo anti-Cx43 fosforilada (S368). Enquanto que nos cortes de corações não infectados encontramos pouca marcação com esse anticorpo, nos corações de animais infectados por *T. cruzi* observamos uma intensa marcação, não apenas na região dos discos intercalares, mas também na membrana e no citoplasma, sobretudo no tempo de 12 meses pós-infecção (figura 13).

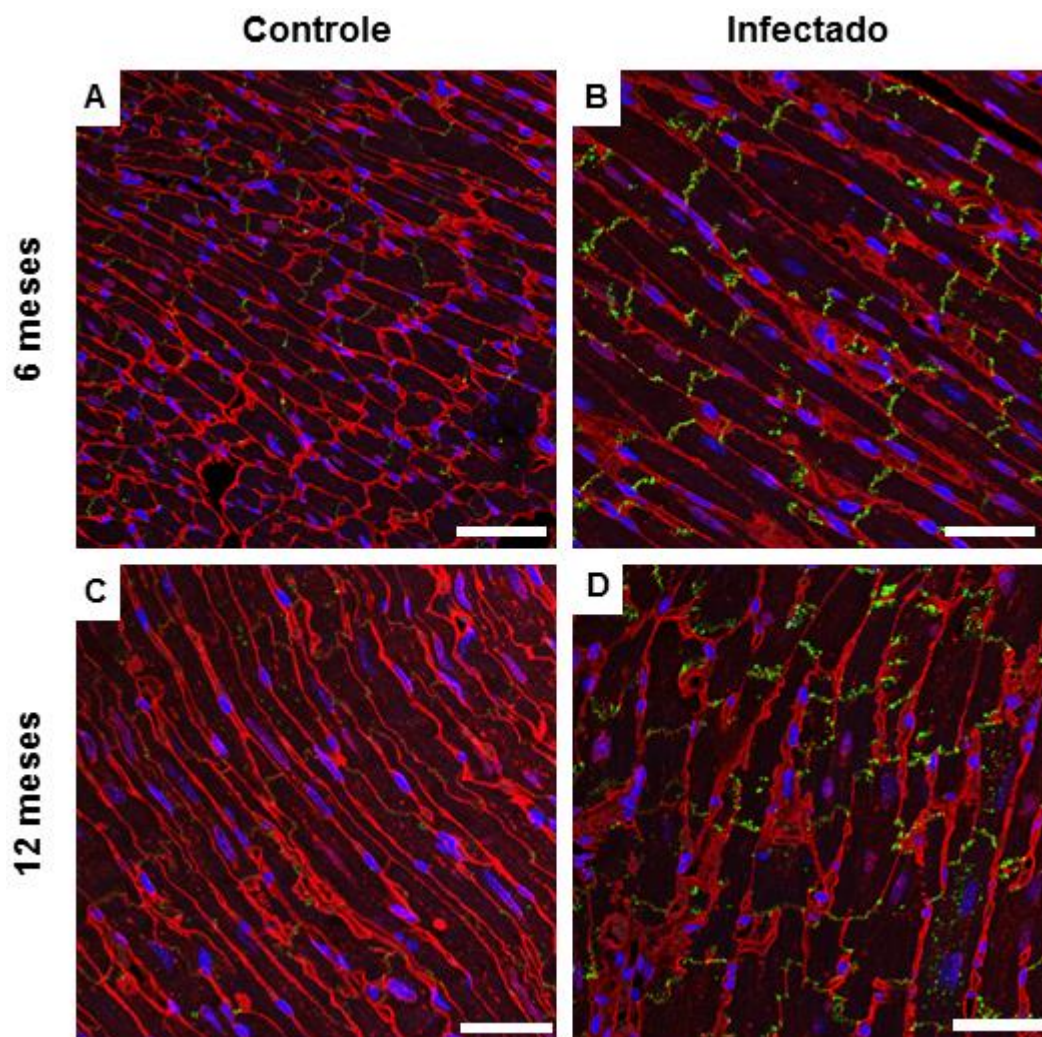




**Figura 11. Distribuição da Cx43 total em tecido muscular cardíaco de camundongos chagásicos e controles.** Cortes de corações de camundongos não infectados do grupo controle (A e B) e de camundongos com 6 (C e D) e 12 (E e F) meses pós-infecção por *T. cruzi*. As amostras foram marcadas com WGA (vermelho), os núcleos celulares marcados com DAPI (azul), e com o anticorpo anti-Cx43 total (verde), e as imagens foram analisadas por microscopia confocal. Barras = 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12. Quantificação da Cx43 total em tecido muscular cardíaco de camundongos com 6 e 12 meses de infecção.** Secções de corações marcadas com anticorpo anti-Cx43 total foram analisadas por microscopia confocal e digitalizadas para quantificação da marcação, utilizando o programa Image-pro plus. Os valores representam a média±SEM de 5 animais/grupo. \*\*\* $p < 0,001$ .

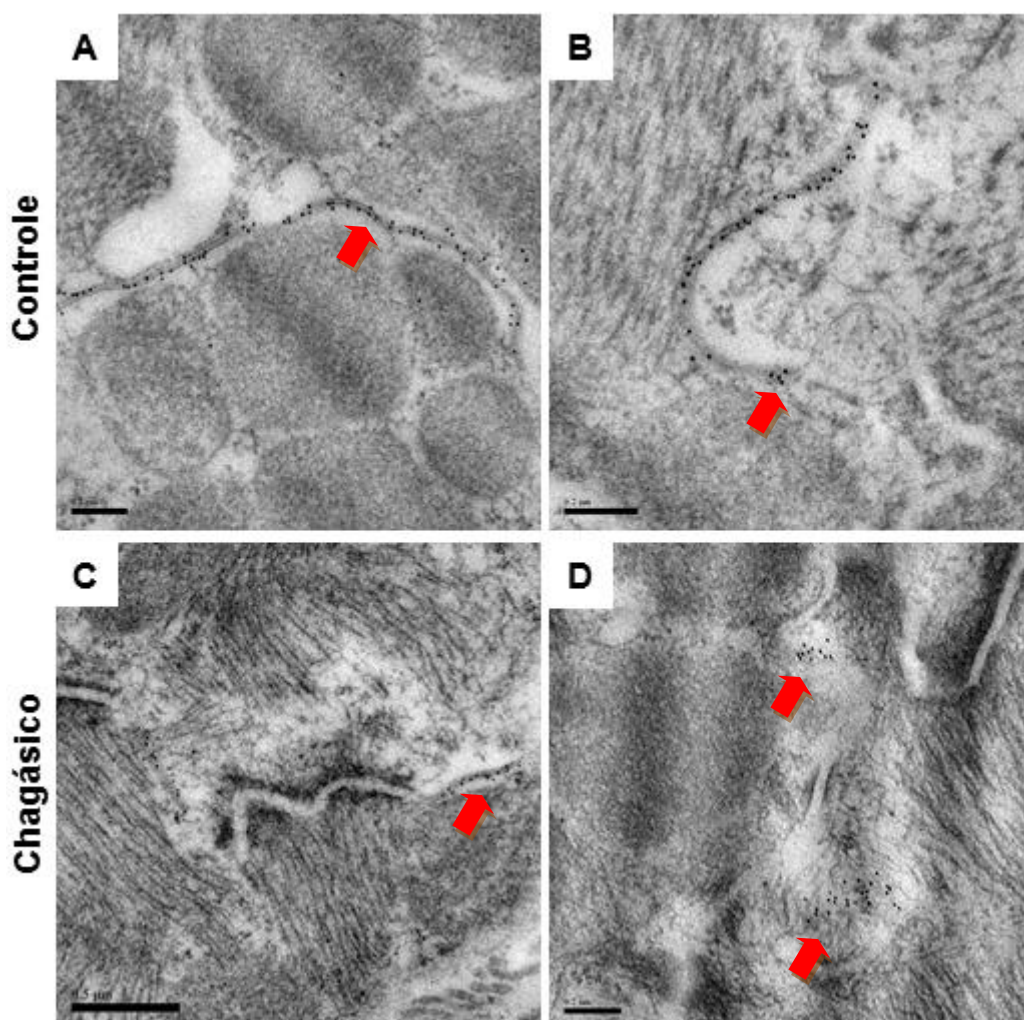


**Figura 13. Marcação da Cx43 fosforilada (S368) em tecido muscular cardíaco de camundongos chagásicos e controles.** Cortes do ventrículo de corações de animais não infectados do grupo controle (A e C) e de animais com 6 (B) e 12 (D) meses pós-infecção por *T. cruzi*. As amostras foram marcadas com WGA (vermelho), os núcleos celulares marcados com DAPI (azul), e Cx43 total (verde). Barras = 50  $\mu\text{m}$ .



#### 5.4. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA DISTRIBUIÇÃO DA CX43

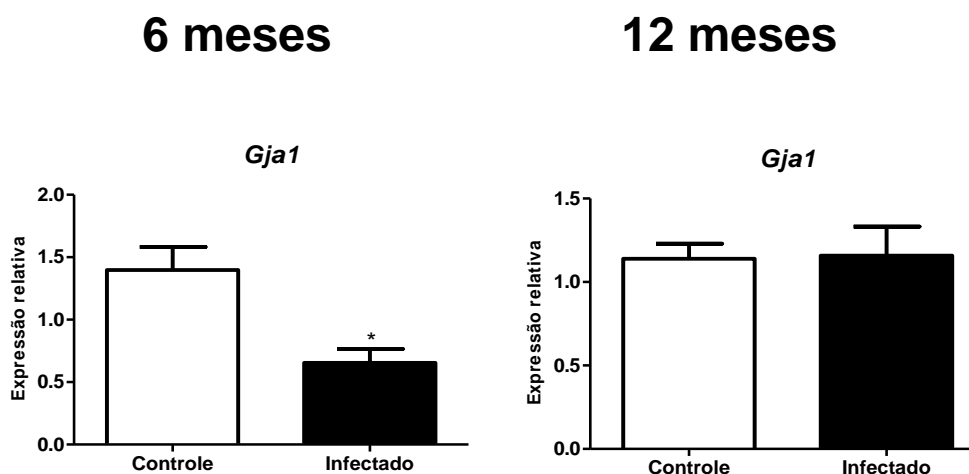
A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão em amostras de tecido muscular cardíaco dos camundongos confirmaram que há mudança na localização da Cx43, como observado na análise por imunofluorescência. Através da técnica denominada *Immunogold*, observamos que a Cx43 total se encontra localizada nos discos intercalares em corações controles (figura 14). Já nas amostras de corações de camundongos chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção), observamos uma marcação da Cx43 menos intensa na região dos discos intercalares e redistribuição, frequentemente marcando estruturas semelhantes a vasículas (figura14).



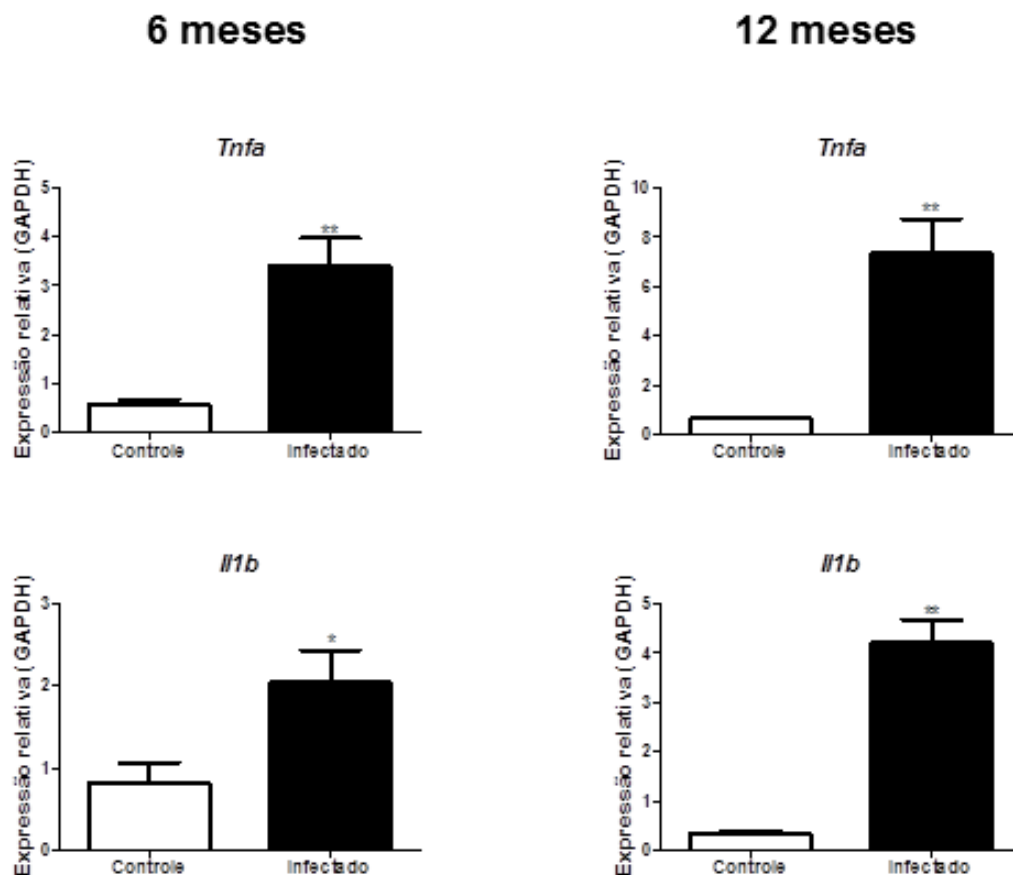
**Figura 14. Análise ultraestrutural da expressão de Cx43 total.** Corações de camundongos controles e chagásicos (6 meses pós-infecção) foram processados para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Cortes ultrafinos foram incubados com anticorpo anti-Cx43 total e a marcação foi revelada pela técnica de *Immunogold*. A e B: cortes representativos de animais controles não infectados; C e D: cortes representativos de animais chagásicos. Barras = 0,2  $\mu$ m e 0,5  $\mu$ m (C).

## 5.5. EXPRESSÃO GÊNICA DA CX43 E DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Análise de expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e da Cx43 foi realizada em tecido muscular cardíaco dos camundongos chagásicos crônicos com 6 e 12 meses de infecção, e seus respectivos controles não-infectados. Como apresentado na figura 15, os níveis de expressão da Cx43 estão reduzidos nos animais chagásicos com 6 meses, e aumentados nos animais chagásicos com 12 meses, enquanto os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram aumentados nos animais chagásicos em ambos períodos (figura 16).



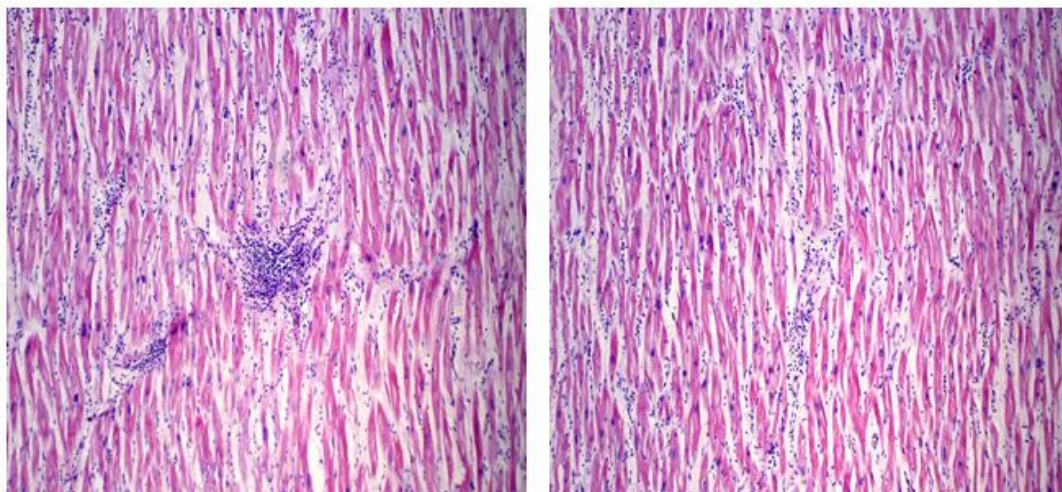
**Figura 15. Análise da expressão gênica da Cx43 em corações de camundongos.** Fragmentos de corações de animais não infectados (controle) e com 6 e 12 meses de infecção foram analisados por RT-qPCR para a expressão do gene da Cx43 (*Gja1*). Os valores são expressos em relação ao gene GAPDH, e representam a média $\pm$ SEM de 5 animais/grupo. \* $p < 0,05$ .



**Figura 16. Análise da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em corações de camundongos.** Fragmentos de corações de animais não infectados (controle) e com 6 e 12 meses de infecção foram analisados por RT-qPCR para a expressão do gene do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os valores são expressos em relação ao gene GAPDH, e representam a média $\pm$ SEM de 5 animais/grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## 5.6. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM CORAÇÕES CHAGÁSICOS HUMANOS

Secções de corações de pacientes chagásicos crônicos coradas em HE apresentaram hipertrofia miocítica e intenso infiltrado inflamatório multifocal composto predominantemente por células mononucleares (figura 17).

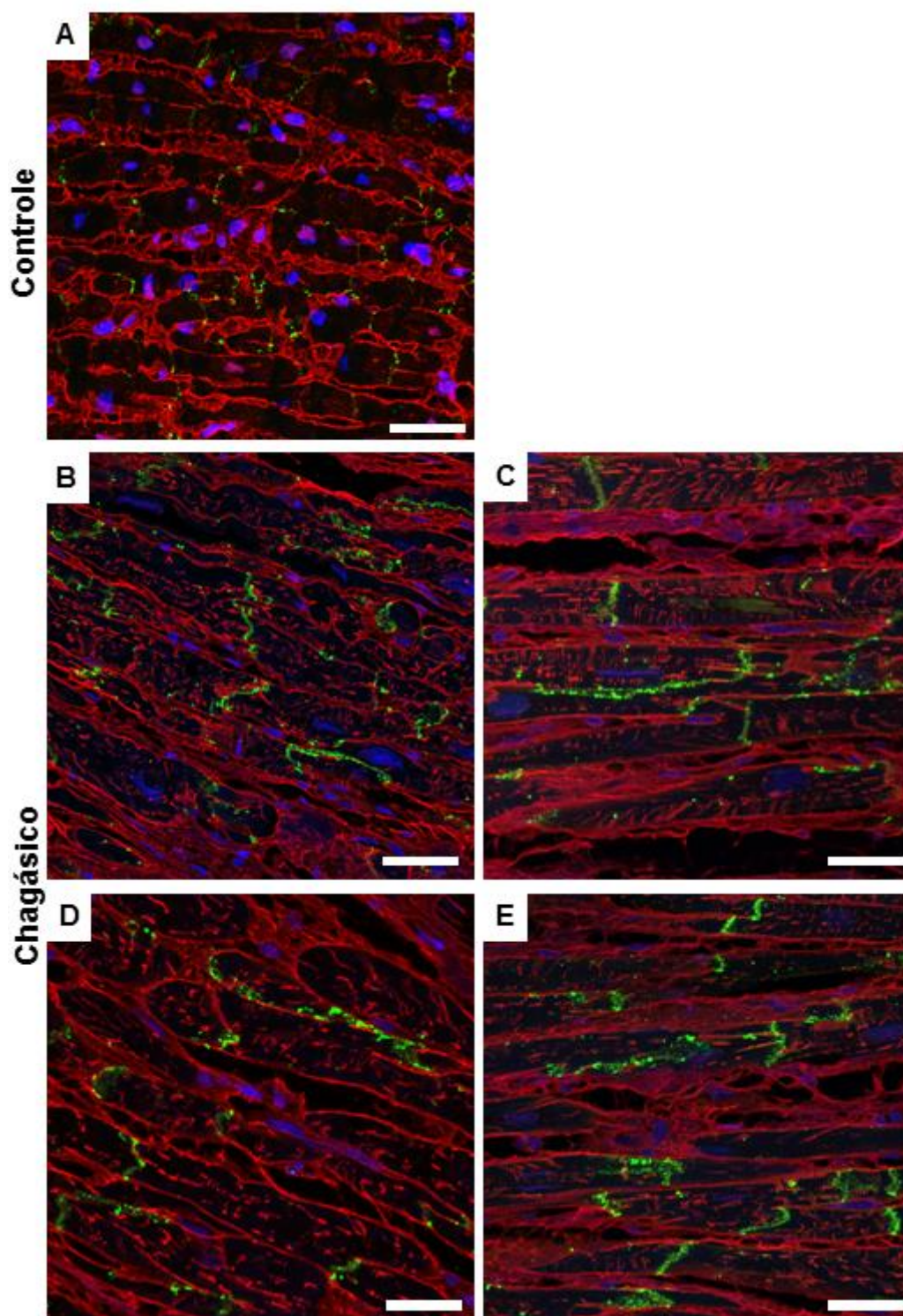


**Figura 17. Infiltrado inflamatório em corações de pacientes chagásicos crônicos.** Cortes representativos de corações de pacientes chagásicos crônicos corados com hematoxilina e eosina. Aumento: 200x.

#### 5.7. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DA CX43 EM CORAÇÕES CHAGÁSICOS HUMANOS

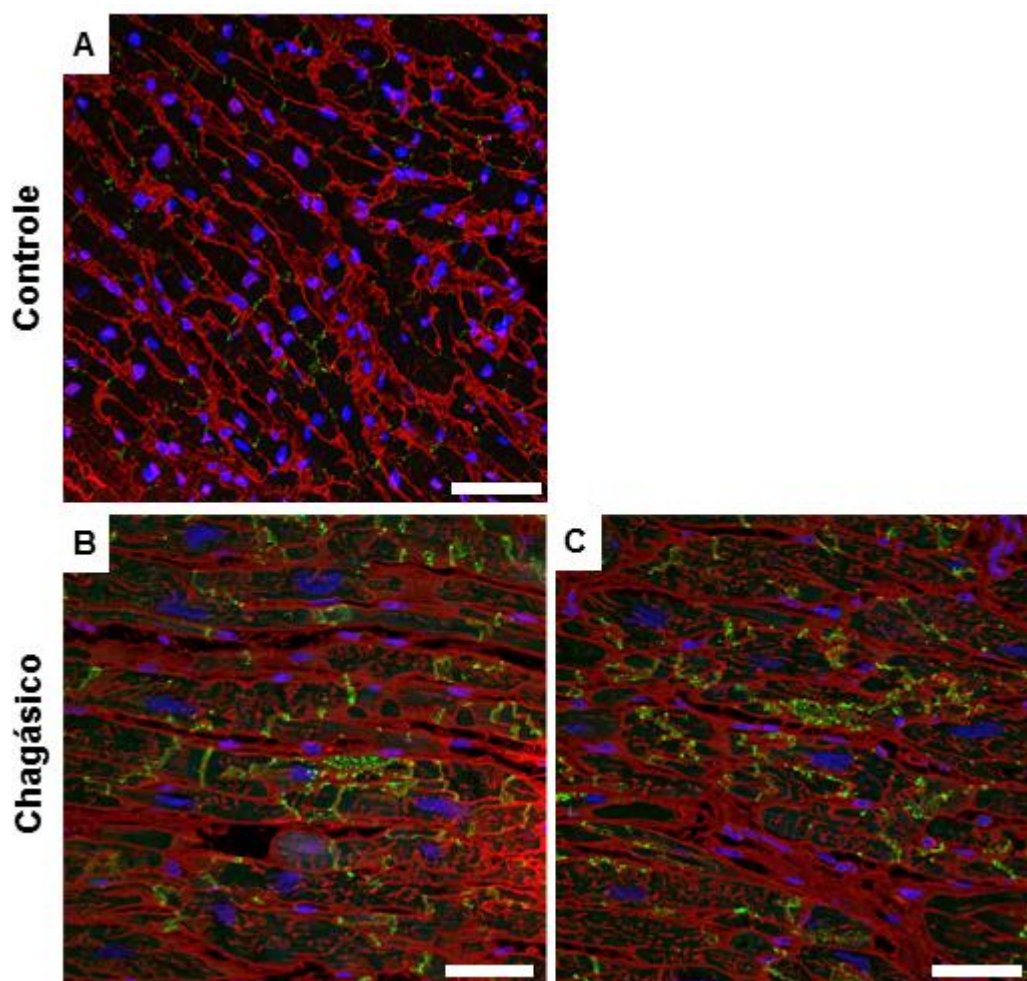
Amostras de tecido muscular cardíaco de pacientes portadores de insuficiência cardíaca de etiologia chagásica também foram avaliadas quanto à expressão de Cx43. Observamos alterações também no tecido humano, tais como a lateralização da Cx43 e marcação no citoplasma, semelhante ao observado nos corações de camundongos chagásicos crônicos. Já nas amostras obtidas por punção cardíaca de corações saudáveis apresentaram maior concentração da Cx43 na região dos discos intercalares (figura 18).





**Figura 18. Expressão de Cx43 total em tecido muscular cardíaco humano.** Biópsia miocárdica de corações normais (A) e seções de corações explantados de pacientes chagásicos submetidos à transplante cardíaco (B – E) foram analisadas por imunofluorescência. As seções de corações foram marcadas com WGA (vermelho), os núcleos celulares marcados com DAPI (azul), e Cx43 total (verde). Barras= 50  $\mu$ m.

Secções de corações de pacientes chagásicos foram também marcadas com anticorpo anti-Cx43 fosforilada (S368). Assim como observados nos corações de animais chagásicos, nos corações de pacientes chagásicos foi observado uma intensa marcação, tanto na região dos discos intercalares, quanto na membrana e no citoplasma, enquanto que nas amostras de tecido muscular cardíaco de corações normais obtidos por biópsia cardíaca, a intensidade da marcação foi baixa e mais restrita à região dos discos intercalares (figura 19).



**Figura 19. Expressão de Cx43 fosforilada (S368) em tecido muscular cardíaco humano.** Biópsia miocárdica de corações normais (A) e secções de corações explantados de pacientes chagásicos submetidos à transplante cardíaco (B e C) foram analisadas por imunofluorescência. As secções de corações foram marcadas com WGA (vermelho), os núcleos celulares marcados com DAPI (azul), e Cx43 fosforilada em S368 (verde). Barras= 50  $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

A cardiopatia chagásica crônica é a principal manifestação clínica da doença de Chagas, e que ainda é um grande problema socioeconômico na América Latina com elevada morbi-mortalidade (RASSI et al., 2007; SIMÕES et al., 2018). Tendo em vista que as arritmias cardíacas são uma das principais causas de morte súbita em pacientes chagásicos crônicos, e que ainda não há muitos trabalhos na literatura que caracterizem as alterações na expressão da Cx43, que é uma proteína crucial para a formação das junções comunicantes e condução do impulso elétrico no coração, neste trabalho caracterizamos a expressão e distribuição da Cx43 no tecido muscular cardíaco chagásico crônico, tanto no modelo da doença em camundongos, quanto em amostras de corações explantados de pacientes chagásicos submetidos ao transplante de coração. Através de marcações realizadas com anticorpos específicos, nossos resultados demonstram que o padrão de expressão de Cx43 está alterado na doença de Chagas, indicando que essa proteína está envolvida na ocorrência das alterações eletrofisiológicas cardíacas encontradas nessa doença.

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que camundongos na fase crônica da infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* têm a função cardíaca comprometida (MACAMBIRA et al., 2009), apresentando distúrbios de condução elétrica e capacidade reduzida de realizar exercício. No presente trabalho, camundongos com CCC foram submetidos ao teste ergométrico e ECG e, após as avaliações, observamos que os animais infectados (6 e 12 meses de infecção) tiveram capacidade de realizar exercício na esteira ergométrica comprometida, visto a significativa redução da distância percorrida e do tempo total de corrida quando comparados com os animais não-infectados. De acordo com Solana e colaboradores (2012), além do comprometimento cardíaco, a infecção crônica causada pelo *T. cruzi* afeta também o músculo esquelético, causando intensa miosite, o que pode contribuir para a locomoção prejudicada dos camundongos chagásicos.

Além disso, os camundongos com CCC apresentaram distúrbios de condução que foram observados no ECG, tais como taquicardia ventricular monomórfica (6 meses de infecção) e polimórfica (12 meses de infecção), ritmo juncional, dissociação atrioventricular e bloqueio atrioventricular (6 e 12 meses de infecção). Como descrito por Henao-Matínez e colaboradores (2012), a CCC se desenvolve em

20-30% dos indivíduos infectados e se manifesta através de anormalidades do sistema de condução cardíaco, resultando na ocorrência de arritmias cardíacas. Esse comprometimento da atividade cardíaca está associado ao intenso processo inflamatório e fibrótico que ocorre no coração, característicos da CCC, o que contribui para a ocorrência de lesões microvasculares e autonômicas (TANOWITZ et al., 2015). De fato, como demonstrado aqui e em estudos anteriores, no nosso modelo animal e no tecido humano, observamos a presença de intenso infiltrado inflamatório e de fibrose intersticial.

Alterações na expressão e distribuição da Cx43 no tecido muscular cardíaco causada por esses processos inflamatórios e fibróticos (TANOWITZ et al., 2009), bem como pela fosforilação de diferentes resíduos de serina e/ou tirosina na cauda C-terminal da proteína (AXELSEN et al., 2013; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2017), contribuem para o desacoplamento elétrico cardíaco, resultando na diminuição da velocidade de condução de estímulos, formando um circuito de reentrada que possibilita o surgimento de arritmias ventriculares (MICHELA et al., 2015; BARBOSA et al., 2015).

Neste trabalho, a análise por imunofluorescência da distribuição da Cx43 total, tanto em tecido muscular cardíaco de camundongos quanto de explantes cardíacos de pacientes chagásicos crônicos, demonstrou um padrão de distribuição alterado da proteína. Enquanto que nos corações controles não-infectados a Cx43 total está presente prevalentemente na região dos discos intercalares, onde favorece a condução “ponta-a-ponta” entre cardiomiócitos vizinhos, nos corações chagásicos a marcação de Cx43 total se mostrou frequentemente lateralizada e internalizada, com marcação reduzida nos discos intercalares, sobretudo no tempo de 12 meses de infecção. Essas alterações podem ser resultado de eventos de autofagia, conforme descrito por Hesketh e colaboradores (2010) em modelo canino de falência cardíaca, e podem contribuir para a redução da velocidade do potencial elétrico no coração e, conseqüentemente, para a ocorrência de arritmias (KOHUTOVA et al., 2018), porém ainda são necessárias novas avaliações para confirmar se esses eventos também ocorrem em modelo de cardiomiopatia chagásica.

A fosforilação da Cx43 no resíduo S368 também foi avaliada por imunofluorescência. Essa isoforma da Cx43 está associada à alteração na estrutura



da proteína e montagem dos canais, contribuindo para o desacoplamento elétrico (LAMPE et al. 2000). No nosso estudo, observamos que, em comparação com os animais não-infectados, os animais com CCC, tanto com 6 quanto com 12 meses de infecção, apresentaram maior expressão da Cx43 (S368), e um padrão disperso no cardiomiócito. A fosforilação da Cx43 no resíduo S368 reflete na redução da permeabilidade dos canais em modelo experimental de isquemia cardíaca (EK-VITORIN et al., 2006; SOLAN & LAMPE., 2014), internalização e redução dos canais que formam a junção comunicante nos cardiomiócitos somado à defosforilação do resíduo S365, que é um inibidor natural (“*gatekeeper*”) da fosforilação do resíduo S368 (LAMPE et al, 2000; SOLAN & LAMPE., 2014; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2017). Desse modo, é possível que o aumento observado da fosforilação em S368 da Cx43 contribua para a ocorrência das arritmias cardíacas encontradas nos animais com CCC, bem como nos pacientes.

As alterações na distribuição da Cx43 total nos cardiomiócitos foram confirmadas por análise ultraestrutural, através da técnica de *Immunogold*. Observamos a localização da Cx43 total nos discos intercalares em corações controles não-infectados, enquanto que em corações camundongos chagásicos crônicos, a marcação da Cx43 apresentou-se menos intensa na região dos discos intercalares e mais fortemente em estruturas semelhantes a pequenas vesículas o que reforça a ideia de que a distribuição da Cx43, presente inicialmente nos discos intercalares, está alterada sob condições patológicas, sendo observada áreas fora dos discos intercalares.

Além disso, nossas análises de expressão gênica por RT-qPCR confirmaram que há alterações na expressão da proteína Cx43 no tempo de 6 meses pós-infecção. Já na avaliação das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , observamos que houve aumento nos níveis da expressão no tecido muscular cardíaco de animais chagásicos, tanto com 6 quanto com 12 meses de infecção. A produção de citocinas inflamatórias no coração tem sido associada à alteração na expressão de Cx43 em doenças cardíacas (FERNANDEZ-COBO et al., 1999). Em ambos os tempos de infecção analisados, encontramos aumento de transcrição dos genes de TNF $\alpha$  e de IL-1 $\beta$ , duas citocinas pró-inflamatórias que estão correlacionadas a alterações no padrão de expressão de Cx43. O aumento da expressão do TNF- $\alpha$  promove uma

regulação negativa da Cx43 em células cardíacas, visto que no trabalho realizado por Fernandez-Cobo e colaboradores (1999) eles observaram que o TNF- $\alpha$  produzido em resposta à estimulação com LPS em cultura de cardiomiócitos prejudica a atividade da região promotora do RNAm da Cx43 reduzindo sua expressão, enquanto a IL-1 $\beta$  está envolvida no aumento da fosforilação do resíduo S368, através da ativação da via p38 MAPK, promovendo o aumento do intervalo QRS e, conseqüentemente, o surgimento de arritmias (ZHONG et al, 2018), o que reforça nossos achados para a diminuição da Cx43 nos animais de 6 meses.

Além disso, outra possível justificativa para a redução dos níveis de Cx43 que observamos neste estudo nos animais com 6 meses de infecção seria a ocorrência de modificações pós-transcricionais promovidas por ação de microRNAs (miRNA), que são pequenos fragmentos de RNA não-codificantes que desempenham um papel regulatório da expressão gênica em processos fisiopatológicos (AMBROS., 2004). Dentre os miRNAs já descritos, o miRNA206 (JIN et al., 2018) e o miRNA-1 (BIAN et al., 2017) têm sido associados à doenças cardíacas arritmogênicas, tendo como alvo o gene que codifica a Cx43 (*Gaj1*), suprimindo a expressão da Cx43 no átrio e no ventrículo, e possibilitando a ocorrência de eventos arrítmicos.

Por outro lado, ainda há não dados na literatura que justifiquem claramente o os níveis da Cx43 nos corações chagásicos como observamos neste estudo com os camundongos com 12 meses de infecção semelhantes aos níveis encontrados no grupo controle não-infectado, o que nos sugere que esse fato seja uma resposta adaptativa do órgão a fim de compensar o comprometimento da atividade elétrica que ocorre em virtude da redução, redistribuição ou inativação da Cx43 pela fosforilação, assim como possíveis modificações pós-transcricionais. No entanto, novos estudos devem ser realizados para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessa regulação positiva da Cx43 observada nos camundongos com 12 meses de infecção.

A Cx43 é de extrema importância para o bom funcionamento cardíaco e adequada condução elétrica no coração (SOLAN e LAMPE., 2009) e alterações na sua expressão, estrutura ou distribuição podem servir como substrato para a ocorrência de arritmias. Neste estudo demonstramos vez alterações na distribuição da Cx43 em tecido muscular cardíaco de 4 pacientes portadores de cardiomiopatia

chagásica. As análises histopatológicas apresentaram intenso infiltrado inflamatório e as análises por imunofluorescência confirmaram que as alterações observadas na marcação para anticorpo da Cx43 total em tecido muscular cardíaco de camundongos chagásicos, como lateralização e internalização, também estão presentes nos corações de pacientes chagásicos. Além disso, foram feitas também marcações com o anticorpo para Cx43 fosforilada (S368), e observamos que houve uma marcação intensa no tecido muscular cardíaco chagásico, diferente do observado no tecido normal, confirmando o nosso achado no modelo experimental.

Diante disso, este trabalho abre portas para que novos estudos sejam realizados, buscando entendimento mais aprofundado sobre possíveis vias de sinalização que podem ser ativadas pelas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), tal como a p38 MAPK, por exemplo, a qual está envolvida na regulação da Cx43 e na fosforilação do resíduo S368 da proteína, o que contribui para a ocorrência de arritmias cardíacas pela inativação da Cx43 (ZHONG et al., 2018), além da investigação a respeito da atividade de microRNAs reguladores, tais como miRNA206 e miRNA-1, que estão envolvidos na patogênese de doenças cardíacas de outras etiologias (LIAO et al., 2016; BIAN et al., 2017; JIN et al., 2018), visando dessa forma contribuir para a identificação de possíveis alvos moleculares para o desenvolvimento de novos tratamentos para a doença de Chagas.

## 7. CONCLUSÃO

Com este trabalho concluímos que a expressão e o padrão de distribuição da Cx43 total no tecido muscular cardíaco de camundongos com 6 e 12 meses e infecção estão alterados, o que foi confirmado nas análises de tecido muscular cardíaco de pacientes chagásicos, e que essas alterações podem estar associadas com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como observamos nas análises de expressão gênica para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Além disso, as marcações realizadas com a isoforma Cx43 (S368) foram mais intensas nos corações chagásicos tanto no modelo experimental, quando no material humano, o que podem contribuir para o perfil arritmico da doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS

ADESSE, Daniel *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces changes in cardiac connexin43 expression. **Microbes and infection**, v. 10, n. 1, p. 21-28, 2008. Adesse D, Goldenberg RC, Fortes FS, et al. Gap junctions and chagas disease. **Advances Parasitology**, v. 76, p. 63-81, 2011.

AMBROS, Victor. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350, 2004.

ANDRADE, Daniela V.; GOLLOB, Kenneth J.; DUTRA, Walderez O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e3010, 2014.

ARAÚJO-JORGE, Tania C. *et al.* Pivotal role for TGF- $\beta$  in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardiopathy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 5-6, p. 405-413, 2008.

ARAÚJO-JORGE, Tania C. *et al.* The TGF- $\beta$  Pathway as an Emerging Target for Chagas Disease Therapy. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 5, p. 613-621, 2012.

AUFDERHEIDE, Arthur C. *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2034-2039, 2004.

AXELSEN, Lene Nygaard *et al.* Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 130, 2013.

BARBOSA, Marco Paulo Tomaz *et al.* Ventricular arrhythmias in Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 4-10, 2015.

BASQUIERA, A. L. *et al.* Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. **Heart**, v. 89, n. 10, p. 1186-1190, 2003.

BENZIGER, Catherine Pastorius; DO CARMO, Gabriel Assis Lopes; RIBEIRO, Antonio Luiz Pinho. Chagas cardiomyopathy: clinical presentation and management in the Americas. **Cardiology Clinics**, v. 35, n. 1, p. 31-47, 2017.

BESTETTI, Reinaldo B.; MARTINS, Cláudia A.; CARDINALI-NETO, Augusto. Justice where justice is due: a posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879–1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). **International Journal of Cardiology**, v. 134, n. 1, p. 9-16, 2009.

BIAN, Bo *et al.* Role of miRNA-1 in regulating connexin 43 in ischemia–reperfusion heart injury: a rat model. **Cardiovascular Pathology**, v. 27, p. 37-42, 2017.

BOCCHI, Edimar Alcides *et al.* The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 71, n. 6, p. 1833-1838, 2001..

BOULAKSIL, Mohamed *et al.* Heterogeneous Connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. **European Journal of Heart Failure**, v. 12, n. 9, p. 913-921, 2010.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*, v. 465, suppl. S12-S15, 2010.

CHAGAS, Carlos. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da tripanossomíase americana: retrospecto histórico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.67-76. 1922.

CONTEH, Lesong; ENGELS, Thomas; MOLYNEUX, David H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239-247, 2010.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301\_suppl, p. S6, 2010.

DE JESUS, Nicole M. *et al.* Antiarrhythmic effects of interleukin 1 inhibition after myocardial infarction. **Heart rhythm**, v. 14, n. 5, p. 727-736, 2017.

DIAS, João Carlos Pinto; COURA, José Rodrigues. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: SciELO-Editora FIOCRUZ, 1997.

DUFFY, Heather S.; FORT, Alfredo G.; SPRAY, David C. Cardiac connexins: genes to nexus. In: **Cardiovascular Gap Junctions**. Karger Publishers, 2006. p. 1-17.

DUNCAN, David J. *et al.* TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  increase Ca<sup>2+</sup> leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes. **Cell calcium**, v. 47, n. 4, p. 378-386, 2010.

EK-VITORIN, Jose F. *et al.* Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C–dependent phosphorylation. **Circulation Research**, v. 98, n. 12, p. 1498-1505, 2006.

ESSELTINE, Jessica L.; LAIRD, Dale W. Next-generation connexin and pannexin cell biology. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 12, p. 944-955, 2016.

FERNANDEZ-COBO, Mariana *et al.* Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. **Cytokine**, v. 11, n. 3, p. 216-224, 1999.

GIRONÈS, Núria; FRESNO, Manuel. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 19-22, 2003.

GROOM, Zoe C.; PROTOPAPAS, Aristotle D.; ZOCHIOS, Vasileios. Tropical diseases of the myocardium: a review. **International Journal of General Medicine**, v. 10, p. 101, 2017.

GUHL, Felipe *et al.* Chagas disease and human migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 553-555, 2000.

HEALY, Chris *et al.* Arrhythmias in chagasic cardiomyopathy. **Cardiac Electrophysiology Clinics**, v. 7, n. 2, p. 251-268, 2015.

HESKETH, Geoffrey G. *et al.* Ultrastructure and regulation of lateralized connexin43 in the failing heart. **Circulation Research**, v. 106, n. 6, p. 1153, 2010.

JELICKS, Linda A. *et al.* Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 11, p. 923-935, 2014.

JIN, Yan *et al.* MicroRNA-206 Downregulates Connexin43 in Cardiomyocytes to Induce Cardiac Arrhythmias in a Transgenic Mouse Model. **Heart, Lung and Circulation**, 2018.

JR, Anis Rassi; RASSI, Anis; LITTLE, William C. Chagas' heart disease. **Clinical Cardiology**, v. 23, n. 12, p. 883-889, 2000.

JUNIOR, Policarpo Ademar Sales *et al.* Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.

KOHUTOVA, Jana *et al.* Anti-arrhythmic cardiac phenotype elicited by chronic intermittent hypoxia is associated with alterations in connexin-43 expression, phosphorylation and distribution. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 789, 2018.

KOTINI, Maria *et al.* Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3846, 2018.

KUMAR, Vineet. Ventricular arrhythmias in chronic Chagas cardiomyopathy: Can studying myocardial sympathetic denervation provide the answers? 2018.

LAMPE, Paul D. *et al.* Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. **The Journal of Cell Biology**, v. 149, n. 7, p. 1503-1512, 2000.

LI, Jifen; PATEL, Vickas V.; RADICE, Glenn L. Dysregulation of cell adhesion proteins and cardiac arrhythmogenesis. **Clinical Medicine & Research**, v. 4, n. 1, p. 42-52, 2006.

- LIAO, Caixiu *et al.* The regulatory function of microRNA-1 in arrhythmias. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 2, p. 328-333, 2016. Lidani, Kárita CF, et al. "The complement system: a prey of *Trypanosoma cruzi*." **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 607, 2017.
- MACAMBIRA, Simone G. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 11, p. 3843-3850, 2009.
- MARIN-NETO, Jose Antonio *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-1123, 2007.
- MARIN-NETO, José Antonio; SIMÕES, Marcus Viníciu; Sarabanda, Álvaro V. Lima. "Chagas' heart disease." **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 72.3 (1999): 247-280.
- MICHELA, Pecoraro *et al.* Role of connexin 43 in cardiovascular diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 768, p. 71-76, 2015.
- MONNERAT, Gustavo *et al.* Macrophage-dependent IL-1 $\beta$  production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. **Nature communications**, v. 7, p. 13344, 2016.
- NOYA-RABELO, Marcia Maria *et al.* The Presence and Extension of Myocardial Fibrosis in the Undetermined Form of Chagas' Disease: A Study Using Magnetic Resonance. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 2, p. 124-131, 2018.
- PERACCHIA, Camillo. Chemical gating of gap junction channels: roles of calcium, pH and calmodulin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1662, n. 1-2, p. 61-80, 2004.
- PEREIRA, Isabela Resende *et al.* Pentoxifylline reverses chronic experimental chagasic cardiomyopathy in association with repositioning of abnormal CD8+ T-cell response. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003659, 2015.
- PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.
- RASSI Jr A.; RASSI, A.; RASSI, S. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. **Circulation**, v. 115, p.1101-1108, 2007.
- REIFENBERG, Kurt *et al.* Interferon- $\gamma$  induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 2, p. 463-472, 2007.
- RIBEIRO-RODRIGUES, Teresa M. *et al.* Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication—gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. **Journal Cell Science**, v. 130, n. 21, p. 3619-3630, 2017.
- ROSENBAUM, Mauricio B. Chagasic myocardopathy. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 7, n. 3, p. 199-225, 1964.



ROSSI, Marcos A. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. **International Journal of Cardiology**, v. 30, n. 3, p. 335-340, 1991.

ROSSI, Marcos A.; RAMOS, Simone G. Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis: an overview. **Cardiovascular Pathology**, v. 5, n. 4, p. 197-202, 1996.

SAKURAI, Takashi *et al.* Cardiomyocyte FGF signaling is required for Cx43 phosphorylation and cardiac gap junction maintenance. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 14, p. 2152-2165, 2013.

SALVARANI, Nicolò *et al.* TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1) plays a pivotal role in cardiac myofibroblast arrhythmogenicity. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 10, n. 5, p. e004567, 2017.

SCHMUNIS, Gabriel A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-86, 2007.

SEVERS, Nicholas J. Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence?. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 5, n. 4, p. 355-366, 2001.

SIMÕES, Marcus Vinicius *et al.* Cardiomiopatia da Doença de Chagas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 31, n. 2, p. 173-189, 2018.

SOARES, Milena Botelho Pereira *et al.* Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 3, p. 416-426, 2010.

SOARES, Milena Botelho Pereira *et al.* Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. **Cell Cycle**, v. 10, n. 9, p. 1448-1455, 2011.

SOBRINHO, José Lamartine Soares *et al.* Doença de Chagas: 100 anos de descoberta. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 4, p. 283-289, 2009.

SÖHL, Goran; WILLECKE, Klaus. Gap junctions and the connexin protein family. **Cardiovascular Research**, v. 62, n. 2, p. 228-232, 2004.

SOLAN, Joell L.; LAMPE, Paul D. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. **Biochemical Journal**, v. 419, n. 2, p. 261-272, 2009.

TANOWITZ, Herbert B. *et al.* Developments in the management of Chagas cardiomyopathy. **Expert review of cardiovascular therapy**, v. 13, n. 12, p. 1393-1409, 2015.

TANOWITZ, Herbert B. *et al.* Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 51, n. 6, p. 524-539, 2009.

TAVORA, Fabio *et al.* Quantitative immunohistochemistry of desmosomal proteins (plakoglobin, desmoplakin and plakophilin), connexin-43, and N-cadherin in arrhythmogenic cardiomyopathy: an autopsy study. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, V. 7, p. 28, 2013.

URBINA, Julio A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010.

VASCONCELOS, Juliana F. *et al.* Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces immunomodulation, recruitment of T regulatory cells, reduction of myocarditis and decrease of parasite load in a mouse model of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 12, p. 4691-4702, 2013.

VOLPE, Gustavo J. *et al.* Left ventricular scar and prognosis in chronic chagas cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 72, n. 21, p. 2567-2576, 2018.

WAGHABI, Mariana C. *et al.* Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor- $\beta$  treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1083-1090, 2009.

WHO. World Health Organization. **Chagas' disease: important advances in elimination of transmission in four countries in Latin America**. WHO. Press Office Feature no. 183. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1995.

WHO. World Health Organization. **Fact sheet: Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2019. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

YANG, Baofeng *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. **Nature Medicine**, v. 13, n. 4, p. 486, 2007.

ZHONG, Chunlian *et al.* Up-regulated Cx43 phosphorylation at Ser368 prolongs QRS duration in myocarditis. **Journal of Cellular and Molecular medicine**, v. 22, n. 7, p. 3537-3547, 2018.