UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

LYGIA MARIA MOURI MALVESTIO

**Soro de animais submetidos à sépsis grave ou infectados
experimentalmente com o *Trypanosoma cruzi* induz perda da
distrofina em culturas de cardiomiócitos: o papel da ativação e
bloqueio da calpaína**

Ribeirão Preto
2014

LYGIA MARIA MOURI MALVESTIO

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível no Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP

Soro de animais submetidos à sépsis grave ou infectados experimentalmente com o *Trypanosoma cruzi* induz perda da distrofina em culturas de cardiomiócitos: o papel da ativação e bloqueio da calpaína

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia Experimental.
Curso: Patologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Simone G. Ramos

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Malvestio, Lygia Maria Mouri

Soro de animais submetidos à sépsis grave ou infectados experimentalmente com o *Trypanosoma cruzi* induz perda da distrofina em culturas de cardiomiócitos: o papel da ativação e bloqueio da calpaína, 2014.

81 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo/USP. Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientadora: Ramos, Simone Gusmão

1. Cultura de cardiomiócitos; 2. Soro de animais submetidos à sépsis grave; 3. Soro de animais infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*; 4. Distrofina; 5. Calpaína; 6. Dantrolene; 7. ALLN.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LYGIA MARIA MOURI MALVESTIO

Soro de animais submetidos à sépsis grave ou infectados experimentalmente com o *Trypanosoma cruzi* induz perda da distrofina em culturas de cardiomiócitos: o papel da ativação e bloqueio da calpaína.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia

Curso: Patologia Experimental

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este Trabalho

Ao meu eterno orientador Prof. Dr. Marcos A. Rossi,

Que nos deixou tão repentinamente antes mesmo de eu agradecer pelo privilégio de ter sido sua orientada e poder desfrutar dia a dia de sua imensurável sabedoria, cultura, senso crítico e atenção sempre dispensada a mim. Sei o quanto estaria em feliz em ver a finalização deste trabalho que enfrentou tantos obstáculos todos superados graças a sua força, inteligência e entusiasmo. Aprendi com o senhor muito mais do que ser uma pesquisadora, conheci o verdadeiro amor, dedicação e vida doada à ciência. Aprendi que devemos levar a honestidade e generosidade como lemas de vida, a reconhecer e valorizar meus verdadeiros amigos e também que as verdadeiras e mais prazerosas conquistas da minha vida seriam uma consequência do meu esforço e mérito. Com o senhor pude conhecer os mais nobres e admiráveis valores de um ser humano: caráter, sinceridade e decência. A ti, meu eterno, sincero e incansável agradecimento que me motivou a continuar sem a sua insubstituível presença. Que Deus juntamente com todos os anjos celestiais lhe entregue neste momento um abraço sincero e apertado representando toda a minha gratidão, admiração e eterna saudade!! Descanse em paz e até um dia inesquecível mestre.

Arrivederci Maestro.....

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus pais Álvaro e Célia

Exemplos de honestidade, trabalho e total dedicação à família.

Meus melhores amigos, sempre dispostos a ouvir, aconselhar e incentivar à busca pelos meus ideais.

Vocês, que nunca mediram esforços para tornar minha vida mais feliz e meus sonhos possíveis, mesmo que para isso tivessem que abdicar dos seus.

Pela base familiar sólida, amor sincero e incondicional diariamente ofertado a mim e ao meu irmão.

Por me fazerem sorrir quando eu acreditava que isso nunca mais aconteceria e pelo abraço apertado que tanta segurança tranquilidade me passa.

Todas as pessoas desse mundo mereciam ter pais como vocês. Que Deus os proteja e os mantenha sempre próximos a mim!!!

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha santa protetora Menina Izildinha, pelo dom da vida e por todas as bênçãos diariamente derramadas sobre mim. Por encher meu coração de sabedoria, paciência e consolo nos momentos difíceis. Minhas forças motrizes que me motivam a preservar na busca do bem.

*“ Nos caminhos mais seguros junto d'Ele eu vou
E pra sempre o Seu nome eu honrarei
Se eu encontro mil abismos nos caminhos eu vou
Segurança sempre tenho em suas mãos.”*

Ao meu irmão João Álvaro, pelo incentivo, preocupação e carinho que sempre demonstrou a mim. Agradeço também pela amizade, conselhos, momentos de descontração e pelas caronas às sextas-feiras que sempre foram providencias.

Aos meus queridos avós João e Augusta, por todo o amor e carinho que me oferecem. Pelas constantes orações e torcida que tanto me fortalecem e estimulam a progredir.

Ao meu namorado Paulo Roberto, pelo carinho, companheirismo, paciência, conselhos e motivação na busca dos meus ideais. Pela força e preocupação constante. Por me ensinar a enxergar a vida de uma maneira muito mais fácil.

À Profa. Dra. Simone G. Ramos, por ter me amparado e aceito como orientada no momento que mais precisei. Pelas palavras de motivação, conselhos, valiosas sugestões e ajuda na finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Santana Silva, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, por ter aberto as portas do seu laboratório de Imunoparasitologia para que eu iniciasse minha vida na USP ainda como estagiária. Por permitir o uso de seu laboratório, equipamentos e reagentes quando ainda não possuíamos a sala de cultura celular.

À banca examinadora pela presença e disposição para avaliar esse trabalho.

À Cibeles M. Prado, pelo exemplo de pesquisadora que executa a ciência com total dedicação, seriedade e amor, ao qual me espelho e motivo. Pela amizade sincera, carinho e impagável ajuda na execução e finalização deste trabalho. Pela paciência e disposição em me ensinar a cultura dos cardiomiócitos. Pela companhia e bons momentos nas viagens, nos horários de almoço e no nosso dia-a-dia. Por nunca medir esforços para solucionar as minhas dúvidas, ouvir meus desabafos e inseguranças.

À Cristiane Tefé da Silva e Gisele Faria, pela amizade sincera, conselhos e ajuda na execução e finalização deste trabalho. Por estarem ao meu lado em todos os momentos, compartilhando minhas angústias, desabafos e alegrias. Pelos nossos momentos de descontração sempre regados a muitas risadas.

À Mara Rúbia N. Celes e Érica C. Campos, pela ajuda nas cirurgias de CLP e execução das culturas de cardiomiócitos quando ainda não possuíamos a sala de cultura celular. Agradeço a amizade, constante disposição em ajudar como também a companhia nas viagens.

À Mônica A. Abreu, técnica do laboratório de Patologia celular e molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela competência na realização das reações de imunofluorescência que tanto abrilhantaram esse trabalho. Pelo alto astral, amizade e carinho sempre dispensados a mim.

À Lígia G.V.B. Santoro, técnica do laboratório de Patologia celular e molecular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela competência profissional, amizade, preocupação e disposição em solucionar os problemas do nosso laboratório.

À Maria Elena Riul, técnica do laboratório de Patologia celular e molecular e Elaine M. Floriano, técnica do laboratório de Patologia Pulmonar, ambas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelas conversas, amizade e convivência prazerosa.

Aos colegas de laboratório e de departamento Maria José Figueiredo, Ana Carolina de Freitas, Valdecir Blefari, Patrícia Ferezin, Daniele, Fernanda, Lenaldo B. Rocha, Marcela Oliveira, Karina A. Matta e Cleverson R. Fernandes, Nathalia Pallazin agradeço todo carinho, amizade e ajuda nos momentos que precisei.

Aos **pós-graduandos**, alguns já docentes em importantes instituições, **do laboratório de Imunoparasitologia** pela gentileza com que me receberam no laboratório, pela ajuda e troca de experiências durante os experimentos.

À **Cristiane Milanezi**, técnica do laboratório de Imunoparasitologia Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela amizade, conselhos, paciência e ajuda nos experimentos de real time PCR e cultura celular.

Ao técnico do laboratório de Imunoparasitologia Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, **Wander Silva** pela cordialidade e ajuda nas infecções dos camundongos com o *Trypanosoma cruzi*.

Aos funcionários do biotério central **Sr. Rinaldo B. Ferreira, Sra. Angela Cristina C. Amadio e Sr. Jacinto Aparecido Epifânio**, pela amizade e gentileza no fornecimento dos camundongos recém-nascidos e aos funcionários do biotério da Patologia **Carlos Henrique de Carvalho e Ana Carolina Veloni**, pelo cuidado e dedicação no manuseio dos animais.

Às secretárias do Departamento de Patologia **Neide T. Gonçalves, Rosângela N. Paiva, Camila L. Zambonini**, ao técnico de informática **Felipe D. Coelho** e ao técnico em Patologia **Antonio P. Martins** pela amizade, gentileza e atenção sempre dispensadas a mim.

Às minhas amigas de infância **Juliana Papine, Carolina Lépure, Fernanda Ferreira, Tatiane Roberts e Letícia Mondello**, pela amizade que já atravessa anos, pela torcida e apoio em todos os momentos.

À **Prof. Dra. Adriana Coelho de Souza** por permitir que eu acompanhasse as aulas de patologia geral e especial no curso de medicina veterinária da faculdade Barão de Mauá que tanto enriqueceu minha formação. Agradeço pelos ensinamentos e disposição em solucionar minhas dúvidas.

Aos meus amados cachorros **Caio Marcelo, Mike Antônio e Théo Augusto**, meus grandes companheiros, responsáveis por tornarem meus finais de semana mais felizes.

À todos aqueles que estiveram ao meu lado me dando força e consolo no momento do falecimento do Prof. Dr. Marcos A. Rossi.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado direto (projeto 2010/18629-4) e auxílio à pesquisa (projeto 2009/53544-2).

“O coração dos animais é o fundamento de suas vidas, o soberano de todo o seu interior, o sol de seu microcosmo, aquele do qual depende todo o crescimento e de onde provém todo o poder.”

William Harvey

RESUMO

Malvestio, LMM. “Soro de animais submetidos à sépsis grave ou infectados experimentalmente com o *Trypanosoma cruzi* induz perda da distrofina em culturas de cardiomiócitos: o papel da ativação e bloqueio da calpaína”. 2014. 81f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O complexo distrofina-glicoproteínas associadas (DGC) localiza-se no sarcolema das células musculares esqueléticas e cardíacas e tem como função principal proporcionar ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular. Estudos prévios realizados em nosso laboratório, focalizando o complexo DGC, demonstraram perda de proteínas importantes desse complexo. As situações avaliadas anteriormente foram: infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e sépsis experimental. Em ambas as situações verificou-se a perda da distrofina acompanhada por disfunção contrátil e aumento nos níveis da calpaína, protease dependente de cálcio implicada na proteólise da distrofina. Todavia, o mecanismo responsável pela ativação das calpaínas e proteólise da distrofina na infecção experimental por *T. cruzi* e na sépsis experimental não está totalmente definido. O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* o mecanismo responsável pela ativação das calpaínas nas culturas de cardiomiócitos desafiadas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental. Camundongos C57BL/6 foram submetidos à sépsis grave ou infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. No pico de expressão das citocinas pró-inflamatórias, 12 dias após inoculação do parasito ou 6 horas após a indução da sépsis, o sangue foi coletado e o soro separado. Corações de camundongos recém-nascidos foram isolados para o cultivo dos cardiomiócitos. No quinto dia após o início das culturas, as células foram estimuladas com 10% do soro de animais infectados com *T. cruzi* ou o soro de animais submetidos à sépsis grave durante 24 horas. Após, as células foram coletadas para análises de Western blotting e imunofluorescência para verificar a expressão da distrofina e calpaína-1. Avaliou-se também, por imunofluorescência, a expressão do NF- κ B. Os cardiomiócitos foram estimulados e tratados com o dantrolene, inibidor da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, ou ALLN, inibidor da calpaína-1, e após coletados para verificar a expressão da distrofina e calpaína-1 por Western blotting e imunofluorescência. Nossos resultados mostraram uma redução significativa na expressão da distrofina com desarranjo das miofibrilas contráteis e formação de bolhas citoplasmáticas, além de um aumento nos níveis da calpaína-1 e do NF- κ B. O tratamento com dantrolene nas culturas estimuladas com o soro de animais infectados

experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave, recuperou a expressão da distrofina e reduziu os níveis da calpaína-1. O tratamento com ALLN nos cardiomiócitos estimulados com o soro de animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* recuperou a expressão da distrofina e não alterou os níveis da calpaína-1. Nas culturas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave, o tratamento com o ALLN recuperou a expressão da distrofina e reduziu os níveis da calpaína-1. Nossos resultados demonstraram que citocinas pró-inflamatórias presentes no soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* como também no soro dos animais submetidos à sépsis grave induziriam um aumento no influxo de cálcio com consequente ativação das calpaínas, as quais atuariam na ativação do NF-κB e na degradação da distrofina. Esse mecanismo poderia ser responsável pela proteólise da distrofina cardíaca observada na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* como também sépsis experimental. Mais estudos são necessários para elucidar este mecanismo, principalmente em relação a inibidores dos canais de cálcio, das citocinas pró-inflamatórias e das calpaínas, com o objetivo de fornecer novas vias de intervenção na prevenção de alterações cardíacas observadas na doença de Chagas e na sépsis.

Palavras chave: cultura de cardiomiócitos, soro de animais submetidos à sépsis grave, soro de animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*, distrofina, calpaína, dantrolene, ALLN.

ABSTRACT

Malvestio, LMM. “Serum from animals subjected to severe sepsis or experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* induces dystrophin loss in cardiomyocytes cultured: role of calpain activation and blocked”. 2014. 81f. Thesis (Doctoral). Department of Pathology – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2014.

The dystrophin-glycoprotein complex (DGC), located in the sarcolemma of cardiac and skeletal muscle cells and concentrated along the plasma membrane in costameric structures provides a framework that connects the intracellular cytoskeleton to the extracellular matrix. Previous studies from our laboratory clearly demonstrated disruption of DGC proteins in experimentally-induced *T. cruzi* infection and experimental sepsis. Both situation presented dystrophin disruption associated with contractile dysfunction and increased calpain levels, calcium dependent protease responsible for dystrophin proteolysis. However, the mechanism responsible for calpain activation and dystrophin proteolysis in experimentally-induced *T. cruzi* infection and experimental sepsis is not totally understood. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the mechanism responsible for calpain activation in cultured cardiomyocytes challenged with serum from animals experimentally infected with *T. cruzi* or subjected to severe sepsis. Mice C57BL/6 were subjected to sepsis induction or infected with Y strain from *T. cruzi*. At the peak of proinflammatory cytokines expression, 12 days after parasite inoculation or 6 hours after sepsis induction, the blood was collected and the serum separated. Hearts from newborn mice were isolated for culture of cardiomyocytes. After 5 days of incubation, the cardiac cells were stimulated with 10% of serum from animals experimentally infected with *T. cruzi* or subjected to severe sepsis during 24 hours, and collected for Western blotting and immunofluorescence analysis to verify dystrophin and calpain-1 expression. The expression of NF- κ B was evaluated by immunofluorescence. The treatments with dantrolene, inhibitor of calcium release from sarcoplasmic reticulum, or ALLN, calpain-1 inhibitor, were performed in cultured cardiomyocytes stimulated during 24 hours with serum from animals infected with *T. cruzi* or subjected to severe sepsis, and dystrophin and calpain-1 expression were analyzed by Western blotting and immunofluorescence. Our results demonstrated loss of dystrophin associated with myofibers derangement and presence of cytoplasmic blebs as well increase of calpain-1 and NF- κ B expression. The dantrolene treatment in cultures stimulated with serum from animals infected with *T. cruzi* or subjected to severe sepsis recover dystrophin expression and reduced calpain-1 levels. The ALLN treatment in cardiomyocytes

stimulated with serum from animals infected with *T. cruzi* recovery dystrophin expression and preserved calpain-1 levels. In cultures stimulated with serum from animals subjected to severe sepsis, the ALLN treatment recovery dystrophin expression and decreased calpain-1 levels. Our results demonstrated that proinflammatory cytokines in serum from mice infected with *T. cruzi* or subjected to severe sepsis could induce an increase calcium influx with calpain activation, which could act in NF- κ B activation and dystrophin disruption. Possibly, this mechanism could be responsible to dystrophin proteolysis observed in experimentally-induced acute *T. cruzi* infection and experimental sepsis. More studies are needed to elucidate this mechanism, especially in relation to calcium channel blockers and inhibitors of pro-inflammatory cytokines and calpains, which may provide new routes for intervention to prevent cardiac damage in Chagas disease and sepsis.

Keywords: cultured cardiomyocytes, serum from mice with severe sepsis, serum from mice experimentally-infected with *T. cruzi*, dystrophin, calpain, dantrolene, ALLN.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALLN- N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal

ARAc- Ara-C hydrochloride

BSA- Albumina do soro bovino

CLP- Ligação e perfuração do ceco

CO₂- Gás carbônico

DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DMD- Distrofia Muscular Duchenne

DMEM- Meio Dulbecco Modificado Por Eagle

g- Gramas

HCl- Ácido clorídrico

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

I κ B- α - I-kappa-B-alfa

KCl- Cloreto de potássio

KDa- Quilodaltons

LPS- Lipopolissacarídeo bacteriano

M- Molar

MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófago 1 alpha

mL- Mililitros

mm- Milímetros

mM- Milimolar

mm³ - Milímetro cúbico

n- Número

Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico

NaCl - Cloreto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NF-κB - Fator nuclear kappa B

O₂ - Oxigênio

°C - Graus célsius

PBS - Tampão salina fosfato

PDTC - Pyrrolidine dithiocarbamate

pH - Potencial hidrogeniônico

PMSF - Fenilmetilsulfonil

PVDF - Polyvinylidene Fluoride

RPM - Rotações por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

T. cruzi - *Trypanosoma cruzi*

TNF-α - Fator de necrose tumoral alpha

UA - Unidades arbitrárias

μl - Microlitros

μmol - Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Animais de Experimentação	27
3.2	Execução das culturas de cardiomiócitos	27
3.3	Infecção experimental por <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
3.4	Indução da sépsis grave experimental.....	29
3.5	Adição de diferentes estímulos às culturas de cardiomiócitos	29
3.5.1	Soro dos camundongos infectados experimentalmente com <i>T. cruzi</i> ou submetidos à sépsis grave	29
3.5.2	Tratamento das culturas estimuladas com Dantrolene e ALLN	30
3.6	Técnicas utilizadas para avaliação da viabilidade celular e expressão de proteínas de interesse	30
3.6.1	Avaliação da viabilidade celular pelo método TACS [®] MTT	30
3.6.2	Imunofluorescência.....	31
3.6.3	Western blotting	32
3.7	Análise Estatística.....	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Padronização das culturas de cardiomiócitos	34
4.2	Adição dos diferentes estímulos às culturas de cardiomiócitos	36
4.2.1	Soro dos camundongos infectados experimentalmente com <i>T. cruzi</i>	36
4.2.2	Soro dos camundongos submetidos à sépsis grave experimental	49

5	DISCUSSÃO.....	62
6	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

A habilidade do cardiomiócito na manutenção da sua forma característica bem como a organização e integridade da sua estrutura interna, durante os repetitivos ciclos de contração, depende de um arcabouço intracelular conhecido como o citoesqueleto. Este aparato interno é responsável pela ligação entre as células, através de junções celulares, bem como pela ligação de cada célula com a matriz extracelular circundante (Kaprielian; Severs, 2000). As proteínas constituintes do citoesqueleto podem ser divididas em quatro diferentes subgrupos de acordo com sua estrutura e propriedades funcionais: (1) esqueleto sarcomérico (titina, C-proteína, α -actinina, miomesina e M-proteína), (2) proteínas do citoesqueleto (tubulina, desmina e actina), (3) proteínas associadas à membrana (distrofina, espectrina, talina, vinculina) e (4) proteínas do disco intercalar (desmossomos, junções aderentes e junções do tipo *gap*) (Hein et al., 2000).

O complexo distrofina-glicoproteínas associadas (DGC) (distrofina, distroglicanas, sarcoglicanas, sarcospana, distrobrevina e sintrofinas) é responsável por proporcionar forte ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular, além de desempenhar um papel importante no estabelecimento de conexões entre o meio intracelular e a membrana basal externa. Apresenta três funções básicas: (a) estabilização da membrana durante ciclos de contração; (b) transdução de força; e (c) organização de especializações da membrana celular (Lapidos et al., 2004). A distrofina é um dos principais componentes do DGC (Figura 1) localizando-se logo abaixo do sarcolema, co-localizada com a β -espectrina e a vinculina. A sua porção N-terminal liga-se à actina enquanto a porção C-terminal está conectada à proteína transmembrana β -distroglicana (Allikian; McNally, 2007). Estudos demonstraram que a distrofina e o DGC desempenham um papel fundamental na proteção e estabilização da membrana plasmática contra o estresse mecânico induzido pela contração muscular (Rybakova et al., 2000; Danialou et al., 2001; Lapidos et al., 2004). Dessa forma, a redução ou ausência de distrofina nos cardiomiócitos resulta na ruptura da ligação física que ancora a actina ao citoesqueleto subsarcolemal e os sarcômeros ao sarcolema, resultando em prejuízo na transmissão do estímulo com consequente disfunção contrátil (Danialou et al., 2001). Além disso, os cardiomiócitos que perdem a distrofina são mais vulneráveis ao estresse mecânico imposto sobre a célula resultando na perda da integridade sarcolemal (Danialou et al., 2001; Heydemann; McNally, 2007). Essa perda pode provocar um elevado influxo de cálcio para as células musculares, com consequente ativação de calpaínas, proteases dependentes de cálcio, que são responsáveis em degradar proteínas do citoesqueleto,

proteínas associadas à membrana, entre outras (Spencer et al., 1995; Mallouk et al., 2000; Goll et al., 2003; Briguet et al., 2008).

Figura 1: Esquema do complexo distrofina-glicoproteínas associadas.

Neste sentido, o estudo da organização e da interação entre a distrofina e as glicoproteínas associadas à distrofina é importante para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na disfunção mecânica observada nas cardiomiopatias (Stevenson et al., 1998; Xi et al., 2000). É sabido que mutações no gene que codifica a distrofina resultam na distrofia muscular de Duchene (DMD) e distrofia muscular de Becker que estão frequentemente acompanhadas por cardiomiopatias (Allikian; McNally, 2007). Ademais, estudos demonstraram o papel da distrofina e das glicoproteínas associadas à distrofina em biópsias miocárdicas de humanos com cardiomiopatia dilatada (Vatta et al., 2002), na insuficiência cardíaca crônica induzida pelo infarto agudo do miocárdio (Yoshida et al., 2003), na isquemia miocárdica aguda através da ligadura da artéria coronária esquerda (Rodríguez et al., 2005), na lesão miocárdica aguda induzida pelo isoproterenol (Campos et al., 2008) e na cardiomiopatia induzida pela doxorubicina (Campos et al., 2011). Em todas essas situações verificou-se uma redução da expressão da distrofina que estaria correlacionada com disfunção cardíaca contrátil.

Estudos do nosso laboratório demonstraram perda primária de distrofina nos corações de animais submetidos à infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Prado et

al., 2012; Malvestio et al., manuscrito em fase final preparação) como também nos submetidos a sépsis experimental (Celes et al., 2010; 2013).

Os resultados encontrados nessas situações serão descritos a seguir:

Infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*: foram utilizados camundongos C57Bl/6 que receberam intraperitonealmente 1000 formas tripomastigotas da cepa Y do parasita *T. cruzi*. Os animais infectados tiveram a parasitemia e mortalidade avaliadas e foram submetidos à eutanásia em diferentes dias após a infecção. O pico de parasitemia desses animais foi observado no dia 9 e o pico de mortalidade evidenciado no dia 20, quando não havia mais a presença de parasita no sangue. A avaliação histopatológica demonstrou que a partir do 14º dia foram observados pequenos focos difusos de infiltrado inflamatório; 20 dias após a infecção, observou-se intensa miocardite com a presença de focos de células inflamatórias, predominantemente linfomononucleares, difusamente distribuídos nos átrios, ventrículos e áreas perivascularares. Além disso, observou-se edema, destruição de fibras cardíacas e o aparecimento de pequenas áreas de fibrose. A avaliação por Western blotting e imunofluorescência mostrou que distrofina apresentou-se significativamente reduzida no 20º dia após a infecção com o *T. cruzi*. Observou-se ainda, por Western blotting e imunofluorescência, um aumento na expressão da calpaína-1 no 14º dia após infecção com o *T. cruzi*, antecedendo o pico de perda da distrofina (Malvestio et al., manuscrito em fase final de preparação) (Figura 2). Outro estudo realizado pelo nosso grupo mostrou na infecção experimental crônica por *T. cruzi*, utilizando camundongos CD1 infectados com a cepa Brazil de *T. cruzi*, uma redução na expressão da distrofina ao 30º dia que se manteve até o 100º dia após a infecção com *T. cruzi*. Concomitantemente, uma redução na fração de ejeção, dilatação ventricular direita e alteração no metabolismo celular também foram verificadas aos 30º e 100º dias após a infecção com *T. cruzi* (Prado et al., 2012).

Figura 2: Análise qualitativa da expressão de distrofina (verde) e actina (vermelho) no miocárdio de animais controles e infectados pelo *T.cruzi* por imunofluorescência. Verifica-se uma redução no sinal imunofluorescente da distrofina ao 14º dia que se torna mais acentuado ao 20º dia se mantendo reduzida até o 26º e 32º dia após a infecção com *T. cruzi* (Malvestio et al, manuscrito em fase final preparação).

Sépsis experimental: para indução da sépsis experimental foi adotado o modelo de sépsis polimicrobiana em camundongos pela ligação e perfuração do ceco. Os animais foram divididos em três grupos de animais: falso-operados (sham), submetidos ao estímulo séptico moderado (ESM) e submetidos ao estímulo séptico grave (ESG) e o sacrifício realizado em diferentes horas após a cirurgia. Na avaliação histopatológica, vinte e quatro horas após a indução da sépsis grave, observou-se claramente a presença de focos disseminados de miocitólise com ruptura das proteínas miofilamentares actina e miosina. A avaliação da ultra-estrutura miocárdica mostrou alterações significativas nas estruturas que compõem as miofibrilas cardíacas e os discos intercalares do miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico grave. A análise quantitativa do sinal fluorescente das moléculas de distrofina e β -distroglicana mostrou que a porcentagem de área média e a intensidade de fluorescência de ambas estavam diminuídas no miocárdio dos animais submetidos ao ESM e ESG. A quantificação de distrofina por Western blotting mostrou que a indução da sépsis promoveu uma redução nos níveis de distrofina 24 horas após a indução dos diferentes estímulos sépticos. A expressão de distrofina foi acentuadamente reduzida nos corações dos animais do grupo ESG quando comparados aos valores obtidos nos animais dos grupos ESM e falso-operado (redução de 40% e 50%, respectivamente). Esses achados sugerem que a redução ou ausência de distrofina no tecido cardíaco dos animais submetidos à sépsis grave

poderia ser um indicativo de lesão miocitolítica com perda de proteínas e consequente desestabilização do miócito. A redução ou perda da expressão de distrofina seria o evento que ocorreria associado à degeneração miofilamentar ou lise dos cardiomiócitos (Celes et al., 2010) (Figura 3). Mais recentemente, em outro trabalho do grupo, verificou-se que a perda da distrofina foi coincidente com maiores níveis de calpaína-1 em corações de camundongos submetidos ao ESG. Além disso, houve uma redução significativa na função cardíaca, avaliada através da fração de ejeção e encurtamento (Celes et al., 2013.)

Figura 3: Análise quantitativa da expressão de distrofina no miocárdio de animais sham e submetidos à sépsis severa (SSI) por Western blotting e imunofluorescência. O sinal imunofluorescente e a expressão da distrofina (verde) foram fortemente reduzidos no miocárdio dos animais sépticos (SSI) quando comparados aos miocárdios controles (Sham). Na análise de Western blotting observa-se a redução da expressão da distrofina nos animais SSI e MSI (sépsis moderada) (Celes et al., 2010).

Todavia, o mecanismo ou mecanismos implicados na ativação das calpaínas com consequente proteólise da distrofina na infecção experimental por *T. cruzi* e na sépsis experimental não estão totalmente definidos. Em virtude dos resultados acima discutidos, uma questão candente durante esses estudos foi: Qual o mecanismo responsável pela perda de distrofina? Dois fenômenos poderiam estar envolvidos na ativação das calpaínas: influxo de cálcio e/ou fenômenos inflamatórios.

Influxo de Cálcio: elevadas concentrações de cálcio intracelular foram demonstradas em biópsias cardíacas de pacientes chagásicos (López et al., 2011) e em estudos *in vitro* utilizando miócitos cardíacos estimulados com uma fração solúvel de tripomastigostas de *T.*

cruzi (Barr et al., 1996). Da mesma maneira, um aumento no extravasamento de cálcio do retículo sarcoplasmático foi observado nos cardiomiócitos isolados de ratos submetidos a diferentes modelos de septicemia (Zhu et al., 2005; Hassoun et al., 2008). Elevações nos níveis intracelulares de cálcio com ativação das calpaínas seria o evento inicial na patogênese do processo de proteólise da distrofina (Goll et al., 2003; Whitehead et al., 2006). Neste sentido, um aumento no influxo de cálcio com altas de taxas de proteólise das calpaínas foi observado em mioblastos de camundongos mdx e em células musculares de pacientes com DMD (Fong et al., 1990; Alderton et al., 2000; Whitehead et al., 2006).

Fenômenos Inflamatórios: um estudo do nosso laboratório mostrou concentrações significativamente aumentadas de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MIP-1 α 6 horas após a indução da sépsis no lavado peritoneal e soro dos animais submetidos à sépsis severa quando comparados aos animais submetidos à sépsis moderada e falso-operados (Celes et al., 2010). Da mesma maneira, a presença de citocinas pró-inflamatórias e iNOS foi detectável nos corações dos camundongos infectados com *T. cruzi* após 36 horas mantendo-se até o 15º dia após a inoculação do parasita (Chandrasekar et al., 1998). Além disso, níveis elevados de IL-6 (Panis et al., 2011) e TNF- α (Starobinas et al., 1991) foram demonstrados no 12º dia após a infecção com *T. cruzi*. As citocinas pró-inflamatórias aumentariam a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Duncan et al., 2010) tendo como consequência a ativação das calpaínas (Nozaki et al., 2011). O tratamento de camundongos mdx com um inibidor do NF- κ B melhorou parâmetros morfológicos, bioquímicos e funcionais na musculatura esquelética desses animais, sugerindo o papel deste fator de transcrição na progressão do dano distrófico (Messina et al., 2006).

Baseado nessas informações, a hipótese desse estudo foi que alterações na homeostase do cálcio, com consequente ativação das calpaínas, poderia ser um dos mecanismos responsáveis o mecanismo responsável pela redução da expressão da distrofina observada nos miócitos de animais infectados pelo *T. cruzi* e submetidos à sépsis experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Apoiados nos resultados *in vivo* obtidos em nosso laboratório, referentes à perda da distrofina nos corações de animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou submetidos à sépsis experimental grave, o presente estudo propõe avaliar *in vitro* o mecanismo responsável pela ativação das calpaínas nas culturas de cardiomiócitos desafiadas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental. De posse desses resultados, buscaremos estudar possíveis estratégias terapêuticas que busquem prevenir ou reduzir a perda da distrofina mediada pela calpaína nas situações avaliadas.

2.2 Objetivos Específicos

Para testar esta hipótese propomos: (a) avaliar a expressão da distrofina, calpaína-1 e NF- κ B nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou soro dos animais submetidos à sépsis grave, (b) verificar a ação do bloqueador dos canais de cálcio sarcoplasmáticos (dantrolene) na expressão da distrofina e da calpaína-1 nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou soro dos animais submetidos à sépsis grave (c) verificar a ação do inibidor da calpaína-1, Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal (ALLN), na expressão da distrofina e da calpaína-1 nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

Para a execução das culturas de cardiomiócitos foram utilizados 160 camundongos isogênicos C57BL/6 com 1 dia de vida, por experimento, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Para os experimentos *in vivo*, envolvendo a indução da sépsis experimental grave e a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, foram utilizados camundongos C57BL/6 com seis a oito semanas de idade provenientes do Biotério Central da FMRP-USP e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia em condições de temperatura constante (23° a 25°C), com livre acesso a água e dieta sólida de laboratório. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com Protocolo nº 183/2010 em 20/12/2010 (Anexo A).

3.2 Execução das culturas de cardiomiócitos

Para o isolamento dos cardiomiócitos provenientes dos corações de camundongos recém-nascidos modificamos o protocolo previamente descrito por Suadicaní et al., 2000. Inicialmente, lâminas Lab-Tek (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) de 8 poços e placas de cultura de 6 poços (Corning, NY, USA), foram revestidas com gelatina de porco tipo I (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) e fibronectina (Sigma-Aldrich). Para tal, uma solução de fibronectina/gelatina na proporção 1:200 µl, foi adicionada aos poços das placas de cultura ou lâminas Lab-Teks a fim de formar um filme líquido bem fino no fundo das placas. As placas e lâminas de cultura revestidas com gelatina e fibronectina foram transferidas para estufa a 37° C por no mínimo 6 horas até o plaqueamento dos cardiomiócitos. Para a coleta das células do miocárdio, os animais foram sacrificados por decapitação, e tiveram os corações removidos e transferidos para placa de petri de 35 mm contendo PBS-1X onde foram dissecados um a um. Os átrios e vasos da base foram removidos e os corações foram colocados em placas de petri de 35 mm com 1 mL de solução de dissociação. Os ventrículos foram cortados em fragmentos de aproximadamente 0,5 mm³ juntamente com 3 mL de solução de dissociação (volume final 4 mL) na placa de petri de 35 mm. Os fragmentos do coração juntamente com a solução de dissociação foram transferidos com o auxílio de uma pipeta para um frasco Erlenmeyer (25 mL) com uma pulga. A mistura contendo fragmentos e

solução de dissociação foi mantida em agitação em banho maria por 10 minutos a 37°C. O sobrenadante do frasco Erlenmeyer foi retirado com uma pipeta e transferido para um tubo cônico. Os fragmentos remanescentes no frasco Erlenmeyer passaram novamente pelo processo anterior: receberam 3 mL de solução de dissociação e permaneceram em banho a 37°C por 10 minutos, esse processo foi repetido por 3x ou até que os pedaços de coração tenham desaparecido. O sobrenadante retirado do frasco Erlenmeyer, resultante da dissociação, recebeu 3 mL de meio de cultura DMEM (Cellgro, Manassas, VA, EUA) enriquecido com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e 10% soro bovino fetal (meio de cultura completo) (ambos Invitrogen – Life technologies, EUA). Esse tubo com o sobrenadante obtido do frasco Erlenmeyer foi centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi retirado e 1 mL de meio de cultura acrescentado para ressuspender o pellet celular. O tubo, com os sobrenadantes coletados após as centrifugações, permaneceu em estufa a 37°C com 5% CO₂. Após a última centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e o pellet ressuspensionado em 1 mL de meio e depositado ao tubo presente na estufa. O volume do tubo foi completado com meio até atingir a marca de 10 mL. Após, os 10 mL foram retirados do tubo e colocados em placas de 100 mm, que permaneceram em estufa a 37°C por 2 h, para permitir a adesão das células aderentes. Na sequência, foi retirado o sobrenadante da placa e colocado em um tubo de 10 mL. Para confirmar a viabilidade celular, foram retirados 10 µL do sobrenadante presente no tubo, misturados com 10 µL de azul de Trypan e realizada a contagem das células em câmara de Neubauer. Foram depositadas 5x10⁵ células por poço nas placas de 6 poços e/ou 1x10⁶ células/poço em lâminas Lab-Teks. Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi removido e acrescentado ARAc (Sigma-Aldrich) para inibir o crescimento de fibroblastos, na proporção de 13 µL de ARAc para cada 4 mL de meio e deixados nessa mistura por mais 24 horas. As culturas foram mantidas em estufa a uma atmosfera de 95% O₂ e 5% CO₂ a 37°C. Decorridas 48 horas do plaqueamento, as células começaram a apresentar contrações espontâneas. No 5º dia após o plaqueamento, quando os cardiomiócitos apresentaram batimentos espontâneos e confluência de 70-80%, foram adicionados os estímulos de interesse.

3.3 Infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Camundongos machos C57BL/6, pesando entre 23-25g, foram infectados intraperitonealmente com 1000 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y diluídas em 200 µL de PBS. Os animais controles receberam somente 200µL de PBS. Os parasitos foram

mantidos por passagens seriadas em camundongos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. No 12º dia após a infecção, pico de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico (Starobinas et al., 1991; Pannis et al., 2011), os animais infectados e os animais controles foram anestesiados com solução de tribromoetanol a 2,5% (250mg/kg) (Sigma-Aldrich), administrado intraperitonealmente, e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O sangue foi armazenado em um tubo Eppendorff e incubado 1h à temperatura ambiente. Após, foi centrifugado à 2500 rpm por 10 minutos. Terminado este período, o soro foi coletado e armazenado em tubo Eppendorff no freezer -80°C até o momento da utilização.

3.4 Indução da sépsis grave experimental

Camundongos machos C57BL/6, pesando entre 22-25g, foram submetidos à sépsis grave induzida pela ligação e perfuração do ceco (CLP) ou a falsa operação (controle). Para tal, os animais foram anestesiados com solução de tribromoetanol a 2,5% (250mg/kg) (Sigma-Aldrich), administrado intraperitonealmente. O ceco dos animais foi localizado, exposto e ligado com linha de seda estéril. Após este procedimento o mesmo foi perfurado duas vezes com agulha 18G para indução do estímulo séptico grave. O grupo de animais controles foi submetido ao mesmo procedimento, porém sem a ligação e perfuração do ceco. Após o processo cirúrgico, o ceco dos animais foi recolocado em sua posição original dentro do abdômen, e o mesmo fechado em duas camadas. Imediatamente após a cirurgia cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 1 mL de salina e colocados em incubadora a 37°C por 1 hora. Após 6 horas de indução da sépsis, pico de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico (Celes et al., 2010), os animais submetidos à sépsis experimental e os animais controles foram anestesiados com tribromoetanol e realizada coleta de sangue por punção cardíaca. O sangue foi armazenado em um tubo Eppendorff e incubado 1h a temperatura ambiente. Após, houve a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. Terminado este período, o soro foi coletado e armazenado em tubo tipo Eppendorff no freezer -80° até o momento da utilização.

3.5 Adição de diferentes estímulos às culturas de cardiomiócitos

3.5.1 Soro dos camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou submetidos à sépsis grave

Os cardiomiócitos foram plaqueados em placas de 6 e 96 poços bem como em Lab-Teks e no 5º dia após o início das culturas foram adicionados 10% do soro dos animais infectados pelo *T. cruzi* ou 10% do soro dos animais submetidos à sépsis grave. Utilizamos como controle 10% do soro dos animais saudáveis. O soro dos animais foi diluído em um volume final de 4000µl, 200µl ou 500µl de meio de cultura DMEM incompleto (sem soro bovino fetal) nas placas de 6 (n=3 para cada soro investigado), 96 poços (n=12 para cada soro investigado) como também nas Lab-Teks (n=4 para cada soro investigado), respectivamente. Nas placas de 96 poços, utilizamos 12 poços como controle sem soro de camundongos, recebendo 200µl de DMEM com 10% soro bovino fetal e 1% de antibiótico. Nas placas de 6 poços os estímulos foram incubados por 24 horas, após esse período foram processadas para avaliações de Western Blotting. As placas de 96 poços foram incubadas com os soros durante 24 horas e após foi analisada pelo método de TACS® MTT (Trevigen®, Helgerman Ct., Gaithersburg, EUA) para verificar a viabilidade celular. As Lab-Teks permaneceram incubadas com os soros durante 24 horas e após foram processadas para as avaliações imunofluorescência.

3.5.2 Tratamento das culturas estimuladas com Dantrolene e ALLN

No quinto dia de cultivo dos cardiomiócitos, o meio de cultura foi retirado da placa de 6 poços como também das Lab-Teks. Foram adicionadas às placas ou lâminas uma solução contendo 20µM de dantrolene ou 3µM ALLN juntamente com 10% do soro dos animais infectados pelo *T. cruzi*, ou soro dos animais submetidos à sépsis grave ou soro dos animais saudáveis (controle) em um volume final de 2000µl de DMEM incompleto nos poços da placa de 6 poços (n=4 para cada soro+tratamento investigado) ou 300µl de DMEM incompleto nas Lab-Teks (n=3 para cada soro+tratamento investigado). Esta solução contendo os soros e o tratamento permaneceu incubada com os cardiomiócitos durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS-1X. O tampão de extração de proteínas foi adicionado aos poços da placa de 6 poços, as células coletadas com o auxílio de uma espátula para dar prosseguimento às avaliações de Western Blotting. As Lab-Teks foram lavadas e fixadas com paraformaldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) a 4% para dar prosseguimento às reações de imunofluorescência.

3.6 Técnicas utilizadas para avaliação da viabilidade celular e expressão de proteínas de interesse

3.6.1 Avaliação da viabilidade celular pelo método TACS[®] MTT

A avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT concentra-se na redução do sal de tetrazólio de coloração amarela (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MTT) em um composto de coloração roxa (formazan). Assim, o MTT quando incubado com células vivas tem seu substrato quebrado pela ação de enzimas mitocondriais, modificando a coloração amarela inicial em um composto roxo que pode ser quantificado e reflete o estado funcional da cadeia respiratória. Dessa forma, seguindo as recomendações do fabricante do Kit TACS[®] MTT (Trevigen®, Helgerman) foram distribuídos 200µl de uma solução com 5×10^4 cardiomiócitos cultivados/mL em 48 dos 96 poços de uma microplaca. Após 5 dias, tempo necessário para a completa confluência das células, os seguintes estímulos foram distribuídos aos poços: meio de cultura completo (controle), meio incompleto com 10% de soro de animais saudáveis, meio incompleto com 10% do soro dos animais infectados com *T. cruzi*, meio incompleto com 10% do soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental; foram utilizados 12 poços para cada estímulo. Ao final de 20 horas, foi adicionado 20µl MTT reagente (Kit TACS[®] MTT) a cada um dos poços plaqueados e a microplaca incubada em estufa de CO₂ até o momento da visualização pelo microscópio invertido do corante roxo (formazan). Após a visualização do corante, foram adicionados 100µl do Reagente Detergente (Kit TACS[®] MTT) a todos os poços plaqueados e a placa incubada a temperatura ambiente, protegida da luz, “overnight”. Ao final desse período, foi realizada a leitura da placa no comprimento de onda de 595nm no espectrofotômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).

3.6.2 Imunofluorescência

No quinto dia após o plaqueamento dos cardiomiócitos, o meio de cultura das células foi retirado e as células lavadas gentilmente com PBS-1X para completa retirada do meio, procedimento que foi repetido 3 vezes. Após, as Lab-Teks foram fixadas em paraformaldeído 4% diluído em PBS-1X por 20 minutos e, lavadas com PBS-1X (3 vezes de 10 minutos). Realizou-se a incubação das lâminas com 30 mM de glicina diluída em PBS-1X por 5 minutos. Em seguida, houve a lavagem com PBS-1X (3 vezes de 10 minutos) e incubação em 0,1% de Triton X-100 diluído em PBS-1X para permeabilização das células. Novamente houve a lavagem com PBS-1X (3 vezes de 10 minutos) e o bloqueio das ligações inespecíficas com BSA 0,1%, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após, as lâminas foram incubadas “overnight” a 4°C com anticorpo primário diluído em BSA 1%. Os

anticorpos primários utilizados foram: anti-miosina (anticorpo monoclonal de camundongo - Abcam Laboratories, Cambridge, Inglaterra, diluição 1:200), troponina C (anticorpo policlonal de cabra, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:200) distrofina (anticorpo policlonal de coelho, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:500), actina sarcomérica (anticorpo monoclonal de camundongo, Sigma-Aldrich, diluição 1:500), calpaína-1 (anticorpo policlonal de cabra, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:300) e NF- κ B (anticorpo monoclonal de camundongo, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:300). Após isso, as Lab-Teks foram lavadas com PBS-1X e incubadas com anticorpo secundário diluído em BSA 0,1% por 1 hora a temperatura ambiente. Os anticorpos secundários conjugados utilizados foram: anti-camundongo, anti-cabra e anti-coelho (Vector Laboratories) 1:200 diluídos em HEPES 0,01 M. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 10 minutos). Para marcação da F-actina foi utilizada Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) 1:1000 diluída em BSA 0,1%. As lâminas foram mantidas a temperatura ambiente por 1 hora e lavadas novamente com PBS-1X (3 vezes de 10 minutos). A marcação nuclear foi realizada com DAPI (Molecular Probes) durante 3 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS-1X (3 vezes de 10 minutos) e montadas com Prolong[®] (Invitrogen, Molecular Probes). A análise foi feita em microscópio de deconvolução Leica D6000 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), videocâmera (Leica DC350F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e computador *online*.

3.6.3 Western blotting

No quinto dia após o plaqueamento dos cardiomiócitos, o meio de cultura das células foi retirado e os poços (n=3) foram lavados 3 vezes com PBS-1X. Em seguida, foram adicionados 200 μ l/poço do tampão de extração de proteínas contendo inibidores de fosfatase (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1% SDS e 1 mM PMSF; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, EUA) e inibidores de protease (Protease inhibitor cocktail, Amresco LLC, Solon, Ohio, EUA). As células foram destacadas com o auxílio de uma espátula e depositadas em um eppendorff onde foram estocadas no -80° C até o momento de uso. A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método de “Bradford”. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (iMark Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories) utilizando-se o filtro específico para o comprimento de onda correspondente à 595 nm. As amostras contendo 20 μ g de proteínas foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE a 5% para distrofina e 10% para calpaína-1. Terminada a corrida do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (BioRad Laboratories). A transferência completa

das proteínas foi confirmada pela coloração de ambos, o gel e a membrana com os corantes Coomassie blue (Bio-Rad Laboratories) e Ponceau S (Sigma-Aldrich), respectivamente, conforme instruções do fabricante. As membranas carregando as proteínas foram colocadas em solução de bloqueio com BSA 5% por 24 horas a 4°C. Após, as membranas foram lavadas em solução tampão PBS-T 1X (3 vezes de 5 minutos) e incubadas “overnight” à 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-distrofina (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:500) e anti-calpaína-1 (Sigma Aldrich, diluição 1:1000) diluídos em solução de PBS-T 1X com BSA à 1%. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as membranas foram lavadas com tampão PBS-T 1X (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho conjugados com HRP (horseradish peroxidase, Santa Cruz Biotechnology) diluídos em solução com PBS-T 1X com BSA à 2% por 45 minutos à 4°C. Por último, as membranas foram lavadas novamente com PBS-T 1X, e incubadas com solução de revelação (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Abcam) de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, as membranas foram expostas e documentadas através do equipamento de fotodocumentação ChemiDoc XRS (BioRad Laboratories). A quantificação das bandas foi realizada com o software Image J através da função *Gel Analyzes*. Os valores de cada banda foram proporcionais ao valor de intensidade integrada e expresso em unidades arbitrárias (UA). O anticorpo anti- α -tubulina (anticorpo monoclonal de camundongo, diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc.) e o anti-GAPDH (1:10.000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) foram usados como controle da quantidade de proteína aplicada nos géis de alto e baixo peso molecular, respectivamente.

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, California, EUA). O teste *t* de *Student* foi utilizado para comparação entre duas variáveis com distribuição normal. Comparações múltiplas foram feitas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância escolhido foi de 5% e os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização das culturas de cardiomiócitos

É muito difundida no meio científico a extrema dificuldade do cultivo dos cardiomiócitos de camundongos recém-nascidos. Dessa forma, antes de se iniciar os experimentos envolvendo os estímulos elencados, foi executada uma série de experimentos pilotos a fim de se obter uma população celular praticamente “homogênea” de cardiomiócitos, em que o requisito avaliado foi a presença de batimentos espontâneos em 85-90% das células em cultura. Além disso, foram realizadas marcações por imunofluorescência para verificar expressão de troponina C (Figura 4), miosina sarcomérica e faloidina (marcador da F-actina) (Figura 5), proteínas presentes na composição da arquitetura de células cardíacas, para confirmar que as células evidenciadas eram realmente cardiomiócitos e não outro tipo celular, como fibroblasto por exemplo. Verificou-se na marcação para faloidina organização das estriações transversais da fibra muscular cardíaca. Além disso, observou-se um intenso sinal fluorescente para troponina C e miosina sarcomérica em toda a extensão dos cardiomiócitos.

Figura 4: Imunofluorescência para troponina C (verde) e faloidina (vermelho). Núcleos foram corados pelo DAPI (azul). A) Observa-se intensa marcação da troponina C em toda extensão dos cardiomiócitos. B) Na marcação com faloidina notam-se as estriações transversais da fibra muscular cardíaca que se apresenta íntegra e organizada. C) Merge. Barra=50µm.

Figura 5: Imunofluorescência para miosina (verde) e faloidina (vermelho). Núcleos foram corados pelo DAPI (azul). A) Na marcação com faloidina observa-se completa organização das miofibrilas do citoesqueleto contrátil dos cardiomiócitos. B) A miosina sarcomérica apresenta intensa marcação em toda a extensão do cardiomiócito C) Merge. Barra=50µm.

4.2 Adição dos diferentes estímulos às culturas de cardiomiócitos

4.2.1 Soro dos camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi*

Baseado nos resultados obtidos em nosso laboratório, referentes às alterações estruturais observadas nos corações dos camundongos submetidos à infecção experimental por *T. cruzi* (Prado et al., 2012), surgiu o interesse de se avaliar *in vitro* este processo. Para isto, incubamos durante 24 horas o soro dos camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi* nas culturas de cardiomiócitos provenientes dos corações de camundongos recém-nascidos.

Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT

A prova do MTT consiste em um método de avaliação da viabilidade celular baseado na redução enzimática do sal de tetrazólio gerando um composto chamado formazan pelas desidrogenases mitocondriais nas células viáveis (Mosmann, 1983).

Foram adotados como controle da viabilidade celular os cardiomiócitos incubados somente com o meio de cultura. Atribuímos que essas células incubadas somente com meio de cultura apresentariam 100% de viabilidade celular. Sendo assim, observou-se um aumento significativo, em torno de 20% ($123 \pm 4.7\%$) ($p < 0.05$), na viabilidade celular dos cardiomiócitos incubados durante 24 horas com o soro dos animais controles. A incubação do soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* não induziu nenhuma alteração na viabilidade celular dos cardiomiócitos ($102 \pm 5.4\%$) (Figura 6).

Figura 6: Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT. Observa-se um aumento significativo na viabilidade celular dos cardiomiócitos estimulados com o soro dos camundongos controles (Soro Ctrl) e nenhuma alteração no metabolismo celular das células estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) em relação às células que receberam somente o meio de cultura (Meio).

4.2.1.1 Avaliação da expressão da distrofina, calpaína-1 e NF- κ B

Avaliação da expressão da distrofina

A análise de imunofluorescência indicou que a adição do soro proveniente dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* induziu uma redução no sinal fluorescente para distrofina como também a formação de inúmeros vacúolos/bolhas citoplasmáticos. Além disso, notou-se um desarranjo miofibrilar na avaliação para faloidina nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos camundongos infectados experimentalmente com *T. cruzi* quando comparado às células estimuladas com o soro dos animais controles durante 24 horas.

A quantificação da expressão da distrofina por Western blotting revelou uma redução significativa (0.778 ± 0.245 UA), representando uma diminuição de 50% ($p < 0.005$), nos níveis desta proteína estrutural nos miócitos cardíacos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* em relação às células cardíacas que receberam o soro dos animais controles (1.677 ± 0.375 UA). Esses dados corroboram com os achados descritos na reação de imunofluorescência (Figura 7).

Avaliação da expressão da calpaína-1

A avaliação de imunofluorescência mostrou um aumento do sinal fluorescente da calpaína-1 nos cardiomiócitos cultivados que receberam o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Observou-se ainda, na marcação para actina sarcomérica, uma perda marcante do arranjo e organização das miofibrilas contráteis nas células cardíacas desafiadas com o soro dos animais infectados pelo *T. cruzi*.

O aumento nos níveis de calpaína-1 foi confirmado pela avaliação de Western blotting. A expressão da calpaína-1 mostrou-se significativamente aumentada, em torno de 33%, (1.574 ± 0.040 UA) nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* quando comparada aos valores encontrados nos cardiomiócitos que receberam o soro dos animais controles (1.247 ± 0.062 UA) ($p < 0.0001$) (Figura 8).

Avaliação da expressão do NF- κ B

A adição do soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* induziu um aumento no sinal fluorescente para o NF- κ B nos cardiomiócitos em cultura. Verificou-se na marcação para actina sarcomérica uma ruptura das miofibrilas contráteis e redução no

tamanho celular induzido pelo estímulo com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* em relação às células que receberam o soro dos animais controles (Figura 9).

Figura 7: Painele à esquerda: Imunofluorescência para distrofina (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle) durante 24 horas. Observa-se uma redução na expressão da distrofina com a formação de vacúolos intracitoplasmáticos e desarranjo miofibrilar nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* em relação aos estimulados com o soro dos animais controles. Barra= 50µm. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão da distrofina avaliada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controle (Soro Ctrl). Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Figura 8: Paine à esquerda: Imunofluorescência para calpaína (verde) e actina sarcomérica (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle) durante 24 horas. Observa-se um aumento no sinal fluorescente para calpaína-1, além de uma desorganização miofibrilar com aparente ruptura das fibras contráteis nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* em relação às estimuladas com o soro dos animais controles. Barra= 50µm. **Paine à direita:** Gráfico representativo da expressão de calpaína-1 avaliada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Ctrl). Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Figura 9: Imunofluorescência para NF- κ B (verde) e actina sarcomérica (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais controles (A,B,C) ou com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (D,E,F) durante 24 horas. Nota-se um intenso sinal fluorescente na marcação para o NF- κ B nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* em relação às estimuladas com o soro dos animais controles. Observa-se uma perda da organização miofibrilar com ruptura das fibras contráteis nos cardiomiócitos submetidos ao estímulo com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Barra= 50 μ m.

4.2.1.2 Efeitos do tratamento com dantrolene nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*

Estudos prévios indicam que as calpaínas seriam ativadas mediante específicas concentrações de cálcio e teriam a capacidade de hidrolisar extratos de distrofina *in vitro* (Cottin et al., 1992, Goll et al., 2003). Baseados nessas informações e nos nossos resultados, testamos a ação de 20 μ M dantrolene, inibidor dos canais de cálcio sarcoplasmáticos, na expressão de distrofina e calpaína-1 nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*.

Avaliação da expressão da distrofina

Como observado anteriormente, a análise da expressão da distrofina por imunofluorescência mostrou que a incubação do soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* aos cardiomiócitos induziu uma redução na marcação fluorescente para esta proteína estrutural. Todavia, o tratamento com dantrolene recuperou a expressão da distrofina nas células cardíacas em cultura.

A quantificação da distrofina, por Western blotting, confirmou o observado na reação de imunofluorescência, isto é, o tratamento com dantrolene preveniu a perda da distrofina nas células cardíacas desafiadas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Observou-se os seguintes valores para as células cardíacas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (0.7378 ± 0.026 UA) ou com o soro dos animais controles (0.8415 ± 0.027 UA) ($p < 0.01$). O tratamento com dantrolene apresentou os seguintes valores nos cardiomiócitos incubados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (0.8950 ± 0.088 UA) ou com o soro dos animais controles (0.7273 ± 0.023 UA) ($p < 0.0001$). Observamos que os cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratados com dantrolene apresentaram um aumento, em torno de 20%, na expressão da distrofina em relação às células cardíacas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* sem tratamento (Figura 10).

Figura 10: Painele à esquerda: Imunofluorescência para distrofina (verde) e faloïdina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com 20 μ M dantrolene durante 24 horas. Observa-se uma recuperação no sinal fluorescente para distrofina nas células cardíacas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratadas dantrolene. Barra= 50 μ m. **Painele à direita:** Gráfico representativo da expressão de distrofina analisada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com dantrolene. Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Avaliação da expressão da calpaína-1

A avaliação de imunofluorescência mostrou uma discreta expressão da calpaína-1 nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* tratados com dantrolene.

A quantificação por Western blotting da expressão da calpaína-1 apresentou os seguintes valores para as células cardíacas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (1.596 ± 0.11 UA) ou com o soro dos animais controles (1.407 ± 0.09 UA) ($p < 0.01$). O tratamento com dantrolene apresentou os seguintes valores nos cardiomiócitos incubados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (1.201 ± 0.085 UA) ou com o soro dos animais controles (1.021 ± 0.012 UA) ($p < 0.01$). Verificamos que os cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratados com dantrolene apresentaram uma redução, em torno de 25%, na expressão da calpaína-1 em relação às células cardíacas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* sem tratamento (Figura 11).

4.2.1.3 Efeitos do tratamento com inibidor da calpaína-1 (ALLN) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*

Após os resultados obtidos com o dantrolene, realizamos uma nova série de experimentos a fim de avaliar eficácia do inibidor da calpaína-1, ALLN, na expressão da distrofina e calpaína-1 nas culturas de cardiomiócitos desafiadas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*.

Figura 11: Paineis à esquerda: Imunofluorescência para calpaína-1 (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com 20 μ M dantrolene durante 24 horas. Nota-se uma redução no sinal fluorescente para calpaína-1 nos cardiomiócitos em cultura estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratados dantrolene. Barra= 50 μ m. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão de calpaína-1 analisada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com dantrolene. Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Avaliação da expressão da distrofina

Por meio da análise de imunofluorescência observou-se que o tratamento das culturas com ALLN recuperou a expressão da distrofina nas culturas desafiadas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*.

A quantificação da distrofina, por Western blotting, confirmou o observado na reação de imunofluorescência, indicando que o tratamento com ALLN preveniu a perda da distrofina nas células cardíacas desafiadas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Observou-se os seguintes valores para as células cardíacas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (0.7378 ± 0.024 UA) ou com o soro dos animais controles (0.8415 ± 0.02 UA) ($p < 0.05$). O tratamento com ALLN apresentou os seguintes valores na quantificação da distrofina dos cardiomiócitos incubados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (0.8955 ± 0.06 UA) ou com o soro dos animais controles (0.7686 ± 0.10 UA) ($p < 0.005$). Verificamos que os cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratados com ALLN apresentaram um aumento, em torno de 21%, na expressão da calpaína-1 em relação às células cardíacas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* sem tratamento (Figura 12).

Avaliação da expressão da calpaína-1

Observamos na análise de imunofluorescência uma discreta marcação da calpaína-1 nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratados com ALLN.

A análise quantitativa da calpaína-1 por Western blotting apresentou os seguintes valores para as células cardíacas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (1.574 ± 0.03 UA) ou com o soro dos animais controles (1.247 ± 0.05 UA) ($p < 0.005$). O tratamento com ALLN apresentou os seguintes valores nos cardiomiócitos incubados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (1.631 ± 0.20 UA) ou com o soro dos animais controles (1.206 ± 0.19 UA) ($p < 0.005$). Não houve diferença significativa na expressão da calpaína-1 entre os cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* tratados e não tratados com ALLN (Figura 13).

Figura 12: Painel à esquerda: Imunofluorescência para distrofina (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controle (Soro Controle), tratadas ou não com 3 μ M ALLN durante 24 horas. Nota-se uma preservação do sinal fluorescente para distrofina nos cardiomiócitos em cultura estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratados ALLN. Barra= 50 μ m. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão de distrofina analisada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com o inibidor da calpaína-1. Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Figura 13: Painel à esquerda: Imunofluorescência para calpaína-1 (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com 3 μ M ALLN durante 24 horas. Nota-se uma redução na marcação fluorescente para calpaína-1 nos cardiomiócitos em cultura estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* e tratados ALLN. Barra= 50 μ m. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão de calpaína-1 analisada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* (Soro Chagas) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com ALLN. Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

4.2.2 Soro dos camundongos submetidos à sépsis grave experimental

Baseados nos prévios resultados *in vivo* envolvendo as alterações estruturais nos corações dos camundongos submetidos à sépsis grave experimental (Celes et al., 2010; 2013) e, seguindo a mesma linha de pensamento adotada nos experimentos envolvendo o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*, executamos uma nova série de experimentos. Desta vez, utilizamos o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e o estímulo foi incubado durante 24 horas com os cardiomiócitos em cultura.

Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT

Foram adotados como controle da viabilidade celular os cardiomiócitos incubados somente com o meio de cultura. Atribuímos que essas células incubadas somente com meio de cultura apresentariam 100% de viabilidade celular. Sendo assim, verificou-se um aumento significativo, em torno de 20% ($123 \pm 4.7\%$) ($p < 0.001$), na viabilidade celular das culturas de cardiomiócitos incubadas por 24 horas com o soro de camundongos controles. A incubação do soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental pelo mesmo período induziu uma redução significativa, em torno de 20% ($72 \pm 7.3\%$) ($p < 0.01$), na viabilidade celular dos cardiomiócitos.

Figura 14: Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT. Observa-se um aumento significativo na viabilidade celular dos cardiomiócitos estimulados com 10% do soro dos camundongos controles (Soro Ctrl) e uma redução significativa na viabilidade dos cardiomiócitos desafiados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) em relação aos cardiomiócitos que receberam somente o meio de cultura (Meio).

4.2.2.1 Avaliação da expressão da distrofina, calpaína-1 e NF- κ B

Avaliação da expressão da distrofina

A avaliação de imunofluorescência evidenciou que a incubação do soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental induziu uma redução na expressão da distrofina e a formação de inúmeros vacúolos citoplasmáticos. Verificou-se também um desarranjo nas miofibrilas contráteis com clara diminuição no tamanho celular em relação às células cardíacas que receberam o soro dos animais controles.

A quantificação da expressão da distrofina revelou uma redução significativa (0.6702 ± 0.03 UA), representando uma diminuição de 43% ($p < 0.0001$), nos níveis desta proteína estrutural nos miócitos cardíacos estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental em relação às células cardíacas que receberam o soro dos animais controles (1.142 ± 0.12 UA). Esses dados corroboram com os achados descritos na reação de imunofluorescência (Figura 15).

Avaliação da expressão da calpaína-1

A análise da expressão da calpaína-1 nos cardiomiócitos desafiados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental revelou uma intensa marcação fluorescente desta protease dependente de cálcio no citoplasma das células cardíacas cultivadas.

A avaliação de Western blotting confirmou os achados da imunofluorescência, um aumento significativo nos níveis de calpaína-1 (2.62 ± 0.03), em torno de 168% ($p < 0.0001$), nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental em relação às células cardíacas que receberam o soro dos animais controles (0.98 ± 0.02) (Figura 16).

Avaliação da expressão do NF- κ B

A avaliação de imunofluorescência evidenciou um aumento no sinal fluorescente para o NF- κ B nas culturas de cardiomiócitos submetidas ao estímulo com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental em relação às células cardíacas que receberam o soro dos animais controles (Figura 17).

Figura 15: Painel à esquerda: Imunofluorescência para distrofina (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle) durante 24 horas. Nota-se uma redução na expressão da distrofina e a formação de vacúolos citoplasmáticos nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental em relação aos estimulados com o soro dos animais controles. A marcação para faloidina evidencia um desarranjo miofibrilar com redução do tamanho celular nos cardiomiócitos desafiados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental. Barra= 50µm. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão da distrofina avaliada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Ctrl). Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Figura 16: Painel à esquerda: Imunofluorescência para calpaína-1 (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle) durante 24 horas. Nota-se uma intensa marcação para calpaína-1 nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental em relação aos estimulados com o soro dos animais controles. Barra= 50µm. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão da calpaína-1 avaliada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Ctrl). Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Figura 17: Imunofluorescência para faloidina (vermelho) e NF- κ B (verde) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais controles (A,B,C) ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (D,E,F) durante 24 horas. Nota-se um intenso sinal fluorescente na marcação para o NF- κ B nas culturas de cardiomiócitos desafiadas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental em relação às estimuladas com o soro dos animais controles. Barra= 50 μ m.

4.2.2.2 Efeitos do tratamento com dantrolene nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental

Avaliação da expressão da distrofina

A avaliação da expressão da distrofina por imunofluorescência mostrou que os cardiomiócitos submetidos ao estímulo com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados com 20 μ M de dantrolene apresentaram uma recuperação na expressão da distrofina.

A quantificação da distrofina, por Western blotting, confirmou o observado na reação de imunofluorescência, indicando que o tratamento com dantrolene preveniu a perda da distrofina nas células cardíacas desafiadas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental. Observou-se os seguintes valores para as células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (0.4667 ± 0.100 UA) ou com o soro dos animais controles (0.8481 ± 0.026 UA) ($p < 0.0001$). O tratamento com dantrolene apresentou os seguintes valores nos cardiomiócitos incubados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (1.049 ± 0.015 UA) ou com o soro dos animais controles (0.8724 ± 0.152 UA) ($p < 0.05$). Verificamos que o tratamento com dantrolene provocou um aumento significativo nos níveis de distrofina, em torno de 50%, nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados com dantrolene em relação às células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental sem tratamento (Figura 18).

Avaliação da expressão da calpaína-1

A análise de imunofluorescência indicou uma discreta marcação para a calpaína-1 nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados com dantrolene.

A quantificação da expressão da calpaína-1 por Western blotting apresentou os seguintes valores para as células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (1.417 ± 0.03 UA) ou com o soro dos animais controles (1.249 ± 0.03 UA) ($p < 0.0001$). O tratamento com dantrolene apresentou os seguintes valores nos cardiomiócitos incubados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (1.170 ± 0.046 UA) ou com o soro dos animais controles (1.277 ± 0.053 UA) ($p < 0.001$). Verificamos que o tratamento com dantrolene provocou uma redução nos níveis de calpaína, em torno de 20%, nos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais submetidos à

sépsis grave experimental e tratados com dantrolene em relação às células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental sem tratamento (Figura 19).

Figura 18: Painel à esquerda: Imunofluorescência para distrofina (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com 20 μ M dantrolene durante 24 horas. Observa-se uma recuperação no sinal fluorescente para distrofina nas células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratadas dantrolene. Barra= 50 μ m. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão de distrofina analisada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com dantrolene. Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Figura 19: Painele à esquerda: Imunofluorescência para calpaína-1 (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com 20 μ M dantrolene durante 24 horas. Nota-se uma redução no sinal fluorescente para calpaína-1 nos cardiomiócitos em cultura estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados dantrolene. Barra= 50 μ m. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão de calpaína-1 analisada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com dantrolene. Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

4.2.2.3 Efeitos do tratamento com inibidor da calpaína-1 (ALLN) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental

Avaliamos a ação do inibidor da calpaína-1, ALLN, sobre a expressão da distrofina e calpaína-1 nas culturas de cardiomiócitos submetidas ao estímulo com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental.

Avaliação da expressão da distrofina

A análise de imunofluorescência mostrou que o tratamento das culturas com ALLN notadamente recuperou a expressão da distrofina nas culturas desafiadas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental.

A quantificação da distrofina por Western blotting apresentou os seguintes valores nas células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (0.4667 ± 0.10 UA) ou com o soro dos animais controles (0.8481 ± 0.02 UA) ($p < 0.0001$). O tratamento com ALLN apresentou os seguintes valores nos cardiomiócitos incubados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (1.017 ± 0.12 UA) ou com o soro dos animais controles (1.033 ± 0.10 UA) ($p < 0.05$). Verificou-se que o tratamento com ALLN provocou um aumento significativo nos níveis de distrofina, em torno de 50%, nos cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados com ALLN em relação às células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental sem tratamento (Figura 20).

Avaliação da expressão da calpaína-1

Verificou-se pela avaliação de imunofluorescência uma reduzida marcação da calpaína-1 nos cardiomiócitos em cultura desafiados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados com ALLN.

A análise quantitativa da calpaína-1 por Western blotting apresentou os seguintes valores para as células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (1.417 ± 0.03 UA) ou com o soro dos animais controles (1.249 ± 0.03 UA) ($p < 0.05$). O tratamento com ALLN apresentou os seguintes valores nos cardiomiócitos incubados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (1.132 ± 0.14 UA) ou com o soro controle dos animais controles (1.153 ± 0.06 UA) ($p > 0.05$). Verificou-se que o tratamento com ALLN provocou uma redução significativa nos níveis de calpaína-1, em torno

de 20%, nos cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados com ALLN em relação às células cardíacas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental sem tratamento (Figura 21).

Figura 20: Painel à esquerda: Imunofluorescência para distrofina (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com 3 μ M ALLN durante 24 horas. Nota-se uma recuperação do sinal fluorescente para distrofina nos cardiomiócitos em cultura estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados ALLN. Barra= 50 μ m. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão de distrofina analisada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com o inibidor da calpaína-1. Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

Figura 21: Painel à esquerda: Imunofluorescência para calpaína-1 (verde) e faloidina (vermelho) sendo os núcleos corados pelo DAPI (azul) nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com 3 μ M ALLN durante 24 horas. Nota-se uma evidente redução na marcação fluorescente para calpaína-1 nos cardiomiócitos em cultura estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental e tratados ALLN. Barra= 50 μ m. **Painel à direita:** Gráfico representativo da expressão de calpaína-1 analisada por Western blotting nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave experimental (Soro Sépsis) ou com o soro dos animais controles (Soro Controle), tratadas ou não com ALLN. Abaixo do gráfico estão as bandas representativas do Western blotting dos grupos estudados.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo verificamos que culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave apresentaram uma reduzida expressão da distrofina, formação de bolhas citoplasmáticas e desarranjo miofibrilar. Observamos ainda um aumento nos níveis da protease dependente de cálcio, calpaína-1 e um aumento expressão do NF-κB. O tratamento com dantrolene nas culturas estimuladas com o soro de animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave, recuperou a expressão da distrofina e reduziu os níveis da calpaína-1. Por outro lado, o tratamento com ALLN nos cardiomiócitos estimulados com o soro de animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* preservou a expressão da distrofina e não alterou os níveis da calpaína-1. Verificou-se ainda que tratamento com o ALLN nas culturas estimuladas com o soro dos animais submetidos à sépsis grave preservou a expressão da distrofina e reduziu os níveis da calpaína-1.

A viabilidade dos cardiomiócitos em cultura foi confirmada pela análise de MTT após a adição do soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou o soro dos animais submetidos à sépsis grave. A avaliação de MTT é uma prova que avalia a função mitocondrial através da quantificação da redução do tetrazólio (sal de coloração amarela) a formazan (sal de coloração arroxeada) pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis (Mosmann, 1983). Dessa forma, a redução do sal de tetrazólio a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. O presente estudo mostrou que a adição do soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* não alterou a viabilidade celular dos cardiomiócitos em cultura. Por outro lado, a incubação do soro dos animais submetidos à sépsis grave provocou uma redução de 20% na viabilidade celular das células cardíacas. Todavia, essa redução não comprometeu a execução dos experimentos, uma vez que observamos 80 a 90% desses cardiomiócitos apresentando contração espontânea. Verificamos ainda, um aumento em torno de 20% na viabilidade celular dos cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais controles, fato que poderia ser explicado devido um aumento na atividade das desidrogenases mitocondriais nessas células (Dell'Ovo et al., 2008)

Após os resultados das análises de MTT demos prosseguimento às investigações propostas. Verificamos nas avaliações de imunofluorescência e Western blotting que os cardiomiócitos em cultura incubados durante 24 horas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave apresentaram uma redução significativa na expressão da distrofina, em relação às células que

receberam o soro dos animais controles. Nossos resultados corroboram com os achados de estudos *in vivo* realizados por nosso grupo anteriormente: a perda da distrofina foi observada em animais infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* na fase aguda e na fase crônica da doença. Os animais infectados com a cepa Y apresentaram perda focal de distrofina na fase aguda, aos 14 e 20 dias após a infecção (Malvestio et al., manuscrito fase final de preparação). Os animais infectados com cepa Brazil apresentaram perda focal de distrofina na fase aguda (30 dias após a infecção) e esta perda manteve-se até a fase crônica (100 dias após a infecção). Esses achados foram somados à diminuição da função cardíaca do ventrículo esquerdo (Prado et al., 2012). Em outro estudo *in vivo* do nosso grupo utilizando o modelo de CLP para indução da sépsis experimental grave em camundongos, demonstramos que distrofina cardíaca é uma das primeiras proteínas a ser degradada entre as estruturas que conectam a actina à matriz extracelular (Celes et al., 2010). Mais recente, foi mostrado nos corações dos camundongos submetidos à sépsis experimental grave uma reduzida expressão da distrofina, da actina sarcomérica e da miosina. Além disso, verificou-se uma redução significativa na função cardíaca, avaliada através da diminuição das frações de ejeção e encurtamento (Celes et al., 2013). Esses achados sugerem que perda da distrofina estaria relacionada à disfunção cardíaca observada na sépsis. A distrofina, um dos principais componentes do complexo DGC, localiza-se logo abaixo do sarcolema, co-localizada com a β -espectrina e a vinculina, sendo responsável por conectar a actina à matriz extracelular através de sua porção N-terminal (Allikian; McNally, 2007). Outra função fisiológica da distrofina é a de prevenir a expansão excessiva do sarcolema durante a contração muscular (Xi et al., 2000). Dessa maneira, a distrofina protege a célula do estresse mecânico o qual provoca dano à integridade celular e prejudica o desempenho da função contrátil do coração (Rybakova et al., 2000; Danialou et al., 2001). É conhecido que os cardiomiócitos que perdem a distrofina são mais vulneráveis ao estresse mecânico imposto a célula, resultando na perda da integridade do sarcolema e degeneração miofibrilar (miocitólise), com consequente disfunção contrátil (Danialou et al., 2001; Heydemann; McNally, 2007). Dessa forma, a perda de distrofina tem sido relacionada à fase final das cardiomiopatias e proposta como via comum para ocorrência da disfunção miocárdica e progressão para insuficiência cardíaca avançada (Toyo-Oka et al., 2004; Kawada et al., 2005).

As avaliações de imunofluorescência mostraram que os cardiomiócitos incubados durante 24 horas com o soro de animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave apresentaram um rearranjo dos filamentos de F-

actina, mudanças na forma celular e a formação de inúmeros vacúolos/bolhas citoplasmáticas. Um estudo *in vitro* utilizando células dos túbulos renais de coelhos expostas ao HgCL₂, agente altamente tóxico que atua aumentando os níveis de cálcio citosólico, mostrou que elevações nas concentrações intracelulares de cálcio precederiam a formação de bolhas citoplasmáticas (Smith et al., 1991). Similarmente, hepatócitos de ratos expostos a cistamina, ATP e A23187, agentes responsáveis em elevar os níveis de cálcio intracelular, exibiram bolhas na membrana celular e no citoplasma, além de alta de proteólise mediada por proteases dependentes de cálcio. O pré-tratamento das células com leupeptina (inibidor de proteases) preveniu a formação de bolhas como também diminui a taxa de proteólise (Nicotera et al., 1986). A ativação das proteases dependentes de cálcio seria responsável pelo rearranjo dos filamentos de F-actina, que uma vez alterados precipitariam mudanças na forma celular induzindo a formação de bolhas, sendo este um evento precoce na injúria celular (Eliget et al., 1991). Ademais, essas alterações na homeostase do cálcio, devido uma ruptura do retículo sarcoplasmático e/ou aumento no influxo pela membrana, seriam tóxicas para as células uma vez ativariam proteases dependentes de cálcio, como as calpaínas, responsáveis por degradar proteínas intracelulares, membrana, DNA e envolvidas em diversos processos celulares (Goll et al., 2003; Nozaki et al., 2011).

Os achados de imunofluorescência e Western blotting mostraram um aumento significativo na expressão da calpaína-1 nos cardiomiócitos incubados durante 24 horas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave. Corroborando com os nossos resultados, recente estudo do nosso laboratório mostrou um aumento significativo na expressão da calpaína nos corações de camundongos no 14º dia após a infecção pelo *T. cruzi*, antecedendo o pico de redução da expressão da distrofina que se deu no 20º dia após a infecção com o parasita (Malvestio et al., manuscrito em fase final de preparação). Similarmente, níveis marcadamente aumentados de calpaína-1 foram observados nos corações de camundongos 6 e 24 horas após a indução da sépsis grave, correlacionando a este último período o pico de redução da distrofina cardíaca (Celes et al., 2013). As calpaínas são proteases endógenas dependentes de cálcio pertencentes à família das cisteíno-proteases e compostas por duas principais isoformas: (a) calpaína 1 ou μ que necessita de concentrações micromolares de cálcio para sua ativação e (b) calpaína 2 ou m que requer concentrações milimolares de cálcio para sua atividade (Goll et al., 2003). Foi demonstrado em culturas de mioblastos provenientes de camundongos mdx um aumento no influxo de cálcio com consequente elevação da taxa de proteólise da calpaína durante a

atividade contrátil dessas células (Alderton et al., 2000; Whitehead et al., 2006). Além disso, elevadas concentrações intracelulares de cálcio associadas a altas taxas de proteólise foram observadas nos miotúbulos de camundongos mdx e de pacientes com DMD (Fong et al., 1990). Foi demonstrado que as calpaínas digerem a distrofina muito rapidamente quando a concentração de cálcio é compatível com sua ativação (Cottin et al., 1992; Goll et al., 2003). Dessa forma, a detecção de um aumento significativo na expressão da calpaína-1 aponta para a possível implicação desta protease dependente de cálcio no mecanismo de perda de distrofina nos cardiomiócitos incubados com soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave.

Um possível mecanismo para explicar a ativação das calpaínas em nosso estudo seria a presença do fenômeno inflamatório. Estudos indicam que o processo inflamatório poderia estimular o aumento na liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Duncan et al., 2010) tendo como consequência a ativação das calpaínas (Nozaki et al., 2011). É conhecido que a homeostase intracelular de cálcio seria mantida principalmente pelo retículo endoplasmático. Dessa forma, em resposta a estímulos externos ocorreria a liberação do cálcio do lúmen do retículo para o citoplasma celular (Corbett; Michalak, 2000). Foi demonstrado que o tratamento de miócitos isolados de ratos com TNF- α e IL-1 β durante 3 horas provocou um aumento na saída de cálcio do retículo sarcoplasmático com diminuição da contratilidade dessas células cardíacas (Duncan et al., 2010). Além disso, um aumento na atividade das calpaínas foi demonstrado em mioblastos isolados de ratos incubados com IFN- γ ou TNF- α (Nozaki et al., 2011). É importante salientar que a coleta do sangue para obtenção do soro que foi usado como estímulo às culturas de cardiomiócitos foi realizada no pico de expressão das citocinas pró-inflamatórias no sangue dos animais submetidos à sépsis grave, 6 horas após a indução da sépsis, bem como nos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*, 12º dia após infecção. Estudos demonstram que 36 horas após a inoculação do *T. cruzi* já é possível detectar citocinas pró-inflamatórias e iNOS no coração dos animais infectados (Chandrasekar et al., 1998). A produção de mediadores inflamatórios nesses corações teria início antes da detecção microscópica de células inflamatórias e parasitas, e continuaria ao longo da fase aguda do parasitismo miocárdico. Verificou-se níveis de mRNA para IL-1 β , IL-6 e TNF- α por pelo menos 15 dias nesses corações infectados, concluindo que o padrão de citocinas pró-inflamatórias é associado com a fase aguda da doença de Chagas. Além disso, níveis marcadamente acentuados de IL-6 (Panis et al., 2011) e TNF- α (Starobinas et al., 1991) foram observados no plasma de camundongos no 12º dia após a infecção com *T. cruzi*.

Corroborando com a nossa hipótese, alterações nos níveis intracelulares de cálcio foram demonstradas em cardiomiócitos isolados de biópsias endomiocárdicas de pacientes chagásicos (López et al., 2011) como também em miócitos isolados de cães estimulados com uma fração solúvel de tripomastigostas de *T. cruzi* (Barr et al., 1996). Da mesma maneira, Bayston e Cohen (1990) afirmam que durante a sépsis, uma cascata de eventos imunológicos é iniciada através do reconhecimento de um ou mais componentes do microrganismo invasor, que estimulam a liberação local e sistêmica de uma ampla gama de mediadores inflamatórios endógenos. Resultados do nosso laboratório demonstraram concentrações significativamente aumentadas de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MIP-1 α no lavado peritoneal e soro dos animais 6 horas após a indução da sépsis severa quando comparados aos animais submetidos à sépsis moderada e falso-operados (Celes et al., 2010). Em outro estudo do nosso laboratório o aumento na expressão de TNF- α foi observado no miocárdio de corações sépticos em humanos (Rossi et al., 2007). Como consequência, cardiomiócitos de ratos submetidos à sépsis experimental pelo modelo de CLP apresentaram um aumento na saída do cálcio do retículo sarcoplasmático com reduzida função contrátil (Zhu et al., 2005). Similarmente, uma elevação no extravasamento do cálcio do retículo sarcoplasmático associado a um acúmulo deste íon nas mitocôndrias foi observado nos cardiomiócitos isolados de ratos submetidos à sépsis por injeção de LPS. Pode-se sugerir que esses eventos poderiam contribuir para falência metabólica e disfunção cardíaca observada na sépsis experimental (Hassoun et al., 2008).

Neste contexto, a avaliação de imunofluorescência mostrou que os cardiomiócitos em cultura estimulados com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave apresentaram uma intensa marcação para o NF- κ B em relação às células cardíacas estimuladas com o soro dos animais controles. O NF- κ B é um fator de transcrição que regula expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, no sistema imune e no estresse agudo (Kumar et al., 2004). Seu processo de ativação, mediado por moléculas inflamatórias como o IL-1 β , o TNF- α e as metaloproteinases, consiste na degradação da sua proteína inibitória I κ B- α com translocamento para o núcleo celular onde irá promover a expressão de diferentes genes de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas inflamatórias, metaloproteinases e fosfolipase A2 (Kumar; Boriek, 2003; Kumar et al., 2004; Messina et al., 2006). Estudos indicam que as calpaínas também estariam envolvidas na ativação do NF- κ B via liberação da subunidade inibitória I κ B- α (Lin et al., 1995; Ruetten; Thiemermann, 1997; Shumway et al.,

1999). Recente trabalho mostrou que camundongos com deleção do gene *Capn4*, indispensável para estabilidade e atividade das calpaínas 1 e 2, tiveram uma atenuação no remodelamento ventricular esquerdo e melhora da função cardíaca com redução da mortalidade quando submetidos ao infarto miocárdico. Esses efeitos seriam devido à prevenção da degradação do I κ B- α impedindo assim a ativação do NF- κ B o que resultaria na inibição do processo inflamatório (Ma et al., 2012). Foi sugerido que o NF- κ B também atuaria na ativação e manutenção do processo distrófico. Verificou-se um aumento na atividade do NF- κ B nos músculos esqueléticos de pacientes com DMD (Monici et al., 2003) e em camundongos mdx (Kumar; Boriek, 2003). Observou-se em músculos esqueléticos de camundongos mdx tratados com PDTC, um inibidor do NF- κ B, uma redução da área de necrose com aumento na regeneração muscular, indicando o importante papel do NF- κ B na manutenção do dano distrófico (Messina et al., 2006). Podemos sugerir que as citocinas pró-inflamatórias presentes no soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* como também no soro dos animais submetidos à sépsis grave induziriam um aumento no influxo de cálcio com ativação das calpaínas, que juntamente com as citocinas pró-inflamatórias, participariam da ativação do NF- κ B com consequente liberação de vários agentes inflamatórios, formando assim um círculo vicioso neste processo.

Após a obtenção desses resultados fomos à busca de possíveis estratégias terapêuticas que pudessem impedir ou prevenir o aumento nos níveis da calpaína-1 e a consequente perda da distrofina nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave. Para tal objetivo, avaliamos a ação do dantrolene, inibidor dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, e do ALLN, inibidor específico da calpaína-1, na expressão da distrofina e calpaína-1 nas culturas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave.

Inicialmente estudamos o dantrolene, agente que atua bloqueando os receptores de rianodina que são responsáveis pela liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático com consequente influxo para o citoplasma (Kobayashi et al., 2009). Sumariamente, o processo de contração muscular consiste na despolarização da membrana celular que permite o influxo de cálcio através dos canais do tipo L, esse influxo desencadeia a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático via RyR2 elevando os níveis de cálcio de aproximadamente 100 nM durante a diástole para 1 μ M na sístole (Wehrens et al., 2005). Todavia, alterações no equilíbrio do cálcio intracelular durante o processo de contração e relaxamento muscular poderiam ativar

proteases dependentes de cálcio, como as calpaínas. No presente estudo verificamos que o tratamento com dantrolene recuperou a expressão da distrofina nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave, que passou a apresentar valores 20 e 50% maiores, respectivamente. Observamos ainda, que o tratamento com o dantrolene reduziu os níveis da calpaína-1, em torno de 20%, nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave. Estudo recente do nosso grupo mostrou que o tratamento de camundongos submetidos à sépsis grave com dantrolene preveniu o aumento da calpaína-1 e preservou os níveis da distrofina, da actina e da miosina. Verificou-se ainda uma recuperação da função cardíaca e redução da taxa de mortalidade dos animais (Celes et al., 2013). Ademais, o tratamento com dantrolene de ratos submetidos à cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina preservou a expressão das proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas associadas, além de melhorar a taxa de sobrevivência e a função ventricular esquerda desses animais (Campos et al., 2011).

O ALLN, inibidor da calpaína-1, atua bloqueando cisteíno proteases e dessa forma impedindo a degradação do I κ B- α , prevenindo assim a ativação do NF- κ B (Lin et al., 1995). Nossos resultados demonstram que a adição do ALLN juntamente com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* preveniu a perda da distrofina, que passou a apresentar valores 21% maiores em relação às células não tratadas. No entanto, não observamos alterações nos níveis da calpaína-1 após o tratamento com ALLN nas culturas estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi*. Estudos indicam que a atividade enzimática e a expressão proteica das calpaínas nem sempre estariam correlacionadas (Smith et al., 2011). Neste estudo verificamos somente a expressão proteica da calpaína-1 e não a sua atividade enzimática que possivelmente estaria reduzida o que explicaria a redução da proteólise da distrofina. A atividade enzimática das calpaínas é regulada pela calpastatina, inibidor endógeno das calpaínas (Tidball; Spencer, 2002). Possivelmente, a redução da atividade proteolítica da calpaína-1 seria em virtude do desequilíbrio da interação entre a calpaína e a calpastatina mediado possivelmente pelo ALLN.

Verificamos ainda que os cardiomiócitos estimulados com o soro dos animais submetidos à sépsis grave e tratados com ALLN apresentaram uma marcante recuperação na expressão da distrofina, valores 50% maiores, além de uma redução nos níveis da calpaína-1

em torno de 20%. Foi demonstrado que o pré-tratamento de ratos submetidos ao choque endotóxico com o inibidor da calpaína-1, ALLN, atenuou a falência circulatória e a disfunção múltipla de órgãos nesses animais (Ruetten; Thiernemann, 1997). Similarmente, ratos que receberam endotoxina e o inibidor da calpaína-1, ALLN, mostraram uma atenuação no grau na disfunção cardíaca e na inflamação (Tissier et al., 2004).

Nossos achados confirmam a hipótese de que as citocinas pró-inflamatórias presentes no soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* bem como no soro dos animais submetidos à sépsis grave induziriam um aumento nos níveis de cálcio citosólico com consequente ativação da calpaína-1 e proteólise da distrofina. O tratamento com dantrolene ou ALLN mostrou-se eficaz na redução da proteólise da distrofina mediada pela calpaína-1 nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave.

Os resultados aqui apresentados foram parcialmente publicados na revista PLoS One em 2013. O artigo está anexado no final desta tese (Anexo C).

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram o papel das citocinas pró-inflamatórias como um dos mecanismos responsáveis pela ativação das calpaínas nas culturas de cardiomiócitos estimuladas com o soro de animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* ou com o soro dos animais submetidos à sépsis grave. Uma das possíveis vias de degradação da distrofina seria através do aumento no influxo de cálcio, induzido por citocinas pró-inflamatórias presentes no soro dos animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* como também no soro dos animais submetidos à sépsis grave, com consequente ativação das calpaínas, as quais atuariam na ativação do NF- κ B e na degradação da distrofina. O tratamento com dantrolene e ALLN reverteu essa degradação da distrofina, aumentando os níveis de distrofina e diminuindo a ativação das calpaínas. Possivelmente, esse mecanismo seria o responsável pela proteólise da distrofina cardíaca observada na infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* como também sépsis experimental. Mais estudos são necessários para elucidar este mecanismo, principalmente em relação a inibidores dos canais de cálcio, das citocinas pró-inflamatórias e das calpaínas, com o objetivo de fornecer novas vias de intervenção na prevenção de alterações cardíacas observadas na doença de Chagas e na sépsis.

REFERÊNCIAS

- Alderton JM, Steinhardt RA. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem*. 2000 Mar;275(13):9452-9460.
- Allikian MJ, McNally EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic*. 2007 Mar;8(3):177-83.
- Barr SC, Han W, Andrews NW, Lopez JW, Ball BA, Pannabecker TL, Gilmour RF Jr. A factor from *Trypanosoma cruzi* induces repetitive cytosolic free Ca^{2+} transients in isolated primary canine cardiac myocytes. *Infect Immun*. 1996 May;64(5):1770-7.
- Bayston KF, Cohen J. Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *J Med Microbiol*. 1990 Feb;31(2):73-83.
- Briguet A, Erb M, Courdier-Fruh I, Barzaghi P, Santos G, Herzner H, Lescop C, Siendt H, Henneboehle M, Weyermann P, Magyar JP, Dubach-Powell J, Metz G, Meier T. Effect of calpain and proteasome inhibition on Ca^{2+} -dependent proteolysis and muscle histopathology in the mdx mouse. *FASEB J*. 2008 Dec;22(12):4190-200.
- Campos EC, O'Connell JL, Malvestio LM, Romano MM, Ramos SG, Celes MR, Prado CM, Simões MV, Rossi MA. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol*. 2011 Nov;670(2-3):541-53.
- Campos EC, Romano MM, Prado CM, Rossi MA. Isoproterenol induces primary loss of dystrophin in rat hearts: correlation with myocardial injury. *Int J Exp Pathol*. 2008 Oct;89(5):367-81.
- Celes MR, Torres-Dueñas D, Malvestio LM, Blefari V, Campos EC, Ramos SG, Prado CM, Cunha FQ, Rossi MA. Disruption of sarcolemmal dystrophin and beta-dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. *Lab Invest*. 2010 Apr;90(4):531-42.

Celes MR; Malvestio, L.M; Suadicani, S.O; Prado, C.M; Figueiredo, M.J; Campos, E.C; Freitas, A.C.S; Spray, D.C; Tanowitz, H.B; Silva, J.S; and Rossi, M.A. Disruption of Calcium Homeostasis in Cardiomyocytes Underlie Cardiac Structural and Functional Changes in Severe sepsis. PLoS One. 2013 Jul;8(7): e68809.

Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, Colston JT, Freeman GL. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. Am J Pathol. 1998 Apr;152(4):925-34.

Corbett EF, Michalak M. Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? Trends Biochem Sci. 2000 Jul;25(7):307-11.

Cottin P, Poussard S, Mornet D, Brustis JJ, Mohammadpour M, Leger J, Ducastaing A. In vitro digestion of dystrophin by calcium-dependent proteases, calpains I and II. Biochimie. 1992 Jun;74(6):565-70.

Danielou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, Des Rosiers C, Petrof BJ. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. FASEB J. 2001 Jul;15(9):1655-7.

Dell'Ovo V, Bandi E, Coslovich T, Florio C, Sciancalepore M, Decorti G, Sosa S, Lorenzon P, Yasumoto T, Tubaro A. In vitro effects of yessotoxin on a primary culture of rat cardiomyocytes. Toxicol Sci. 2008 Dec;106(2):392-9.

Duncan DJ, Yang Z, Hopkins PM, Steele DS, Harrison SM. TNF-alpha and IL-1beta increase Ca²⁺ leak from the sarcoplasmic reticulum and susceptibility to arrhythmia in rat ventricular myocytes. Cell Calcium. 2010 Apr;47(4):378-86.

Elliget KA, Phelps PC, Trump BF. HgCl₂-induced alteration of actin filaments in cultured primary rat proximal tubule epithelial cells labelled with fluorescein phalloidin. Cell Biol Toxicol. 1991 Jul;7(3):263-80.

Fong PY, Turner PR, Denetclaw WF, Steinhardt RA. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. Science. 1990 Nov ;250(4981):673-6.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801.

Hassoun SM, Marechal X, Montaigne D, Bouazza Y, Decoster B, Lancel S, Neviere R. Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction. *Crit Care Med.* 2008 Sep;36(9):2590-6.

Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000 Jan;45(2):273-8.

Heydemann A, McNally EM. Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy. *Trends Cardiovasc Med.* 2007 Feb;17(2):55-9.

Kaprielian RR, Severs NJ. Dystrophin and the cardiomyocyte membrane cytoskeleton in the healthy and failing heart. *Heart Fail Rev.* 2000 Oct;5(3):221-38.

Kawada T, Masui F, Tezuka A, Ebisawa T, Kumagai H, Nakazawa M, Toyo-Oka T. A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Aug;1751(1):73-81.

Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, Mochizuki M, Xu X, Uchinoumi H, Okuda S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol.* 2009 May;53(21):1993-2005.

Kumar A, Boriek AM. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.* 2003 Mar;17(3):386-96.

Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl).* 2004 Jul;82(7):434-48.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res.* 2004 Apr;94(8):1023-31.

Lin YC, Brown K, Siebenlist U. Activation of NF-kappa B requires proteolysis of the inhibitor I kappa B-alpha: signal-induced phosphorylation of I kappa B-alpha alone does not release active NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jan;92(2):552-6.

López JR, Espinosa R, Landazuru P, Linares N, Allen P, Mijares A. Dysfunction of diastolic $[Ca^{2+}]$ in cardiomyocytes isolated from chagasic patients. *Rev Esp Cardiol*. 2011 Jun;64(6):456-62.

Ma J, Wei M, Wang Q, Li J, Wang H, Liu W, Lacefield JC, Greer PA, Karmazyn M, Fan GC, Peng T. Deficiency of *Capn4* gene inhibits nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein signaling/inflammation and reduces remodeling after myocardial infarction. *J Biol Chem*. 2012 Aug;287(33):27480-9.

Mallouk N, Jacquemond V, Allard B. Elevated subsarcolemmal Ca^{2+} in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr;97(9):4950-5.

Messina S, Bitto A, Aguenouz M, Minutoli L, Monici MC, Altavilla D, Squadrito F, Vita G. Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp Neurol*. 2006 Mar;198(1):234-41.

Monici MC, Aguenouz M, Mazzeo A, Messina C, Vita G. Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2003 Mar;60(6):993-7.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec;65(1-2):55-63.

Nicotera P, Hartzell P, Davis G, Orrenius S. The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca^{2+} is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system. *FEBS Lett*. 1986 Dec;209(1):139-44.

Nozaki K, Das A, Ray SK, Banik NL. Calpeptin attenuated apoptosis and intracellular inflammatory changes in muscle cells. *J Neurosci Res*. 2011 Apr;89(4):536-43.

Panis C, Mazzuco TL, Costa CZ, Victorino VJ, Tatakihara VL, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Cecchini R, Rizzo LV, Pinge-Filho P. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of

5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp Parasitol*. 2011 Jan;127(1):58-65.

Prado CM, Celes MR, Malvestio LM, Campos EC, Silva JS, Jelicks LA, Tanowitz HB, Rossi MA. Early dystrophin disruption in the pathogenesis of experimental chronic Chagas cardiomyopathy. *Microbes Infect*. 2012 Jan;14(1):59-68.

Rodríguez M, Cai W-J, Kostin S, Lucchesi BR, Schaper J. Ischemia depletes dystrophin and inhibits protein synthesis in the canine heart: Mechanisms of myocardial ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 May;38:723-733.

Rossi MA, Celes MR, Prado CM, Saggioro FP. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock*. 2007 Jan;27(1):10-8.

Ruetten H, Thiernemann C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I kappa B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol*. 1997 Jun;121(4):695-704.

Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *Cell Biol*. 2000 Sep;150(5):1209-14.

Shumway SD, Maki M, Miyamoto S. The PEST domain of IkappaBalpha is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain. *J Biol Chem*. 1999 Oct;274(43):30874-81.

Smith IJ, Aversa Z, Hasselgren PO, Pacelli F, Rosa F, Doglietto GB, Bossola M. Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. *Muscle Nerve*. 2011 Mar;43(3):410-4.

Smith MW, Phelps PC, Trump BF. Cytosolic Ca²⁺ deregulation and blebbing after HgCl₂ injury to cultured rabbit proximal tubule cells as determined by digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun;88(11):4926-30.

Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem*. 1995 May;270(18):10909-14.

Starobinas N, Russo M, Minoprio P, Hontebeyrie-Joskowicz M. Is TNF alpha involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Res Immunol*. 1991 Feb;142(2):117-22.

Stevenson S, Rothery S, Cullen MJ, Severs NJ. Spatial relationship of the C-terminal domains of dystrophin and beta-dystroglycan in cardiac muscle support a direct molecular interaction at the plasma membrane interface. *Circ Res*. 1998 Jan;82(1):82-93.

Suadicaní SO, Vink MJ, Spray DC. Slow intercellular Ca(2+) signaling in wild-type and Cx43-null neonatal mouse cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Dec;279(6):H3076-88.

Tidball JG, Spencer MJ. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *J Physiol*. 2002 Dec;545(Pt 3):819-28.

Tissier S, Lancel S, Marechal X, Mordon S, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R. Calpain inhibitors improve myocardial dysfunction and inflammation induced by endotoxin in rats. *Shock*. 2004 Apr;21(4):352-7.

Toyo-Oka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, Masui F, Ebisawa T, Tezuka A, Iwasawa K, Nakajima T, Uehara Y, Kumagai H, Kostin S, Schaper J, Nakazawa M, Ozawa K. Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May;101(19):7381-5.

Vatta M, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Entman ML, Noon GP, Torre-Amione G, Bowles NE, Towbin JA. Molecular remodelling of dystrophin in patients with end-stage cardiomyopathies and reversal in patients on assistance-device therapy. *Lancet*. 2002 Mar;359(9310):936-41.

Wehrens XH, Lehnart SE, Marks AR. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu Rev Physiol*. 2005 Jul;67:69-98.

Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 Jul;33(7):657-62.

Xi H, Shin WS, Suzuki J, Nakajima T, Kawada T, Uehara Y, Nakazawa M, Toyo-oka T. Dystrophin disruption might be related to myocardial cell apoptosis caused by isoproterenol. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36(Suppl 2):S25-9.

Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyo-oka T, Takeo S. Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2003 Aug;59(2):419-27.

Zhu X, Bernecker OY, Manohar NS, Hajjar RJ, Hellman J, Ichinose F, Valdivia HH, Schmidt U. Increased leakage of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} contributes to abnormal myocyte Ca^{2+} handling and shortening in sepsis. *Crit Care Med*. 2005 Mar;33(3):598-604.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 183/2010, sobre o projeto intitulado “*O papel do cálcio, da calpaína, de citocinas pró-inflamatórias e de hipoxia na expressão de distrofina em cardiomiócitos submetidos a diferentes estímulos: estudo in vitro*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Marcos Antonio Rossi** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 20 de dezembro de 2010.

(We certify that the protocol nº 183/2010, about “*The role of calcium, calpain, pro-inflammatory cytokines and hypoxia on dystrophin expression in cardiomyocytes subjected to different stimuli: an in vitro study*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 12/20/2010.

Ribeirão Preto, 20 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. Márcio Dantas
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

ANEXO B – Reagentes e Soluções

PBS (Tampão Salina Fosfato)

Para obter a solução 10X foram dissolvidos 8,17g de NaCl, 0,36g de fosfato de sódio monobásico, 1,05g de fosfato de sódio dibásico e completado para um volume final de 1 litro com água destilada. Essa solução foi diluída 9 vezes com água destilada para conseguir a solução 1X. O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4 com NaOH 2M. Para a obter a solução PBS-T 1X foi adicionado 1000µl de Tween 20 (Sigma-Aldrich) para cada L de PBS

Solução Estoque

Foram dissolvidos 8.0g NaCl, 0.2g KCl, 0.05g Na₂HPO₄, 1.0g NAHCO₃ e 2.0g glicose (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg NJ, USA) em 100mL de água deionizada em MILLI-Q.

Pancreatina 0,125%

Foram diluídas 2,5 g de pancreatina (GIBCO) em 100 mL de água deionizada em MILLI-Q. Agitou-se até completa dissolução dos grumos. Foram realizadas alíquotas de 5 mL que ficaram mantidas no congelador até o momento do uso.

Solução de Dissociação

Foram dissolvidos 0.3g BSA (Sigma-Aldrich), 10 mL de solução estoque e 5 mL de pancreatina 0,125% em 85 mL de água deionizada em MILLI-Q. O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4 com NaOH 2M e a solução filtrada em filtro de 0.2µm.

Tribromoetanol 2,5%

Foram dissolvidos 250mg 2,2,2-tribromoetanol (Sigma-Aldrich) em 10 mL de solução salina 0,9%. A solução foi aquecida a 56° C para dissolução total da droga.

ANEXO C – Trabalhos resultantes dessa tese até o momento

Parte desta Tese de Doutorado intitulada “**Soro de animais submetidos à sépsis grave ou infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* induz perda da distrofina em culturas de cardiomiócitos: o papel da ativação e bloqueio da calpaína**” foi publicada recentemente na revista PLoS One com o título: **Disruption of Calcium Homeostasis in Cardiomyocytes Underlie Cardiac Structural and Functional Changes in Severe Sepsis**. Celes MRN*, Malvestio LM*, Suadicaní SO, Prado CM, Figueiredo MJ, Campos EC, Freitas ACS, Spray DC, Tanowitz HB, Silva JS, Rossi MA (*As autoras tiveram a mesma participação no trabalho). Um novo trabalho intitulado **The possible role of inflammatory cytokines and proteases activation in the degradation of dystrophin in hearts of mice experimentally-infected with *Trypanosoma cruzi***, está fase final de preparação para submissão na revista Microbes and Infection.

Trabalhos provenientes dessa tese foram levados para seis congressos internacionais e um congresso nacional, que seguem abaixo:

- **Avaliação *in vitro* da expressão de distrofina em cardiomiócitos estimulados com soro de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi*.** XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2011 – São Paulo. Recebeu o prêmio “Cantídio de Moura Campos Filho” como melhor pesquisa básica.
- ***In vitro* evaluation of the expression of dystrophin in cardiomyocytes stimulated with serum of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*.** XXVIII International Congress of International Academy of Pathology, 2010 – São Paulo.
- ***In vitro* evaluation of the expression of dystrophin in cardiomyocytes stimulated with serum of mice experimentally-infected with *Trypanosoma cruzi*.** 15th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research, 2010, Nice – França.
- ***In vitro* evaluation of the expression of dystrophin in cardiomyocytes stimulated with serum of mice experimentally-infected with *Trypanosoma cruzi*.** 59th Annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2010, Atlanta – Estados Unidos.

- **Serum of *Trypanosoma cruzi*-infected mice induces dystrophin loss/reduction in cultured newborn mice cardiomyocytes.** 9th International Congress on Coronary Artery Disease, 2011, Veneza – Itália.
- **Proinflammatory cytokines affect dystrophin expression in cultured newborn cardiomyocytes under different stimuli.** Experimental Biology, 2012, San Diego – Estados Unidos.
- **The possible role of serum from septic mice in dystrophin proteolysis in cultured newborn mice cardiomyocytes.** Experimental Biology, 2013, Boston – Estados Unidos.

Disruption of Calcium Homeostasis in Cardiomyocytes Underlies Cardiac Structural and Functional Changes in Severe Sepsis

Mara R. N. Celes^{1,3,6*}, Lygia M. Malvestio¹, Sylvia O. Suadicaní⁴, Cibele M. Prado¹, Maria J. Figueiredo¹, Erica C. Campos¹, Ana C. S. Freitas¹, David C. Spray⁵, Herbert B. Tanowitz⁶, João S. da Silva², Marcos A. Rossi^{1†}

1 Departments of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Departments of Immunology and Biochemistry, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiás, Brazil, **4** Departments of Urology, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Bronx, New York, United States of America, **5** Department of Medicine (Cardiology), Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Bronx, New York, United States of America, **6** Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Bronx, New York, United States of America

Abstract

Sepsis, a major cause of morbidity/mortality in intensive care units worldwide, is commonly associated with cardiac dysfunction, which worsens the prognosis dramatically for patients. Although in recent years the concept of septic cardiomyopathy has evolved, the importance of myocardial structural alterations in sepsis has not been fully explored. This study offers novel and mechanistic data to clarify subcellular events that occur in the pathogenesis of septic cardiomyopathy and myocardial dysfunction in severe sepsis. Cultured neonatal mice cardiomyocytes subjected to serum obtained from mice with severe sepsis presented striking increment of $[Ca^{2+}]_i$ and calpain-1 levels associated with decreased expression of dystrophin and disruption and derangement of F-actin filaments and cytoplasmic bleb formation. Severe sepsis induced in mice led to an increased expression of calpain-1 in cardiomyocytes. Moreover, decreased myocardial amounts of dystrophin, sarcomeric actin, and myosin heavy chain were observed in septic hearts associated with depressed cardiac contractile dysfunction and a very low survival rate. Actin and myosin from the sarcomere are first disassembled by calpain and then ubiquitinated and degraded by proteasome or sequestered inside specialized vacuoles called autophagosomes, delivered to the lysosome for degradation forming autophagolysosomes. Verapamil and dantrolene prevented the increase of calpain-1 levels and preserved dystrophin, actin, and myosin loss/reduction as well cardiac contractile dysfunction associated with strikingly improved survival rate. These abnormal parameters emerge as therapeutic targets, which modulation may provide beneficial effects on future vascular outcomes and mortality in sepsis. Further studies are needed to shed light on this mechanism, mainly regarding specific calpain inhibitors.

Citation: Celes MRN, Malvestio LM, Suadicaní SO, Prado CM, Figueiredo MJ, et al. (2013) Disruption of Calcium Homeostasis in Cardiomyocytes Underlies Cardiac Structural and Functional Changes in Severe Sepsis. PLoS ONE 8(7): e68809. doi:10.1371/journal.pone.0068809

Editor: Rajesh Mohanraj, UAE University, Faculty of Medicine & Health Sciences, United Arab Emirates

Received: March 22, 2013; **Accepted:** June 2, 2013; **Published:** July 23, 2013

Copyright: © 2013 Celes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (07/58843-2, 09/17787-8, 09/54010-1, 09/02942-8, 09/53544-2, 10/19216-5, 10/18629-4, 10/13199-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (302387/2008-0, 470536/2008-0, 472419/2009-9) and by a Fogarty International Training Grant (D43-TW007129). MAR is Senior Investigator (1A) of Brazilian Research Council (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors declare that no competing interests exist.

* E-mail: mrubia.celes@usp.br

† These authors contributed equally to this work.

† Deceased.

Introduction

Sepsis, a major cause of morbidity and mortality in intensive care units worldwide, is commonly associated with cardiac dysfunction, which worsens the prognosis dramatically for patients [1]. Hemodynamic changes, microcirculatory disturbances, systemic inflammatory cytokines, mitochondrial dysfunction, autonomic deregulation have been proposed as responsible for the depressed cardiac function in sepsis [2,3]. However, conceptualizing cardiac depression in sepsis as simply the result of biochemical/functional changes oversimplifies the issue. Although in recent years the concept of septic cardiomyopathy has evolved

[4–8], in which phenotypic changes develop in response to a variety of agents acting on myocardial fibers, the importance of myocardial structural alterations in sepsis has been largely ignored. Septic cardiomyopathy, unlike the classic cardiomyopathy, involves both left and right ventricles and is potentially reversible exhibiting depressed left ventricular (LV) systolic function and normal or low ventricular filling pressures [8] that depend on right ventricular dysfunction caused by acute lung damage and/or increased LV compliance.

A previous study from our laboratory detected sarcolemmal damage with increased permeability, as an early event in myocardial injury in cecal ligation and puncture (CLP)-induced

severe sepsis in mice, due to oxidative damage to lipids and proteins [9], which could precede phenotypic changes characteristic of a septic inflammatory cardiomyopathy in man [5]. Afterwards, disruption of sarcolemmal dystrophin, the main component of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC), associated with increased sarcolemmal permeability was demonstrated in hearts of septic mice [10]. The DGC confers structural stability to the myofiber sarcolemma and transmits force between sarcomeres and cell membrane to the extracellular matrix [11]. Possibly, dystrophin disruption aggravates sarcolemmal permeability making the sarcolemma more fragile and susceptible to damage, worsening the cell membrane disruption caused by oxidative damage in septic hearts, as part of a downward spiral. This idea is reinforced by the observation that sarcolemmal permeability improved in association with marked attenuation of dystrophin expression reduction in CLP septic mice treated with sodium dismutase, a superoxide scavenger [10].

Calcium homeostasis is essential to normal myocardium contraction/relaxation cycle. During myocyte contraction, Ca^{2+} enters the cell through L-type Ca^{2+} channels ($\text{I}_{\text{Ca-L}}$) that trigger Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) from the sarcoplasmic reticulum via activation of the cardiac ryanodine calcium-sensitive receptor [12]. As a consequence there is a rapid increase of intracellular free calcium ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) that promotes myofilament activation and myocyte shortening. However, disruption of homeostasis can cause cytosolic calcium overload due to leakage from the sarcoplasmic reticulum and/or increased cell membrane influx, which is toxic to cells and can cause cell death by activating intracellular calcium-dependent proteins, such as calpain, which degrades intracellular proteins, cellular membranes, and nuclear DNA [13,14]. Disordered calcium homeostasis has been observed in *in vitro* studies in cardiomyocytes isolated from rat hearts 48 hours after CLP-induced sepsis [15], in cultured human adipocytes after lipopolysaccharide (LPS) stimulation [16], in *ex vivo* studies in smooth muscle cells of rat thoracic aorta after CLP-induced sepsis [17] and in sarcoplasmic reticulum from ventricles of rats treated with LPS [18], and in rat brains after peritoneal polymicrobial sepsis [19].

The present *in vitro* and *in vivo* studies were undertaken to test the hypothesis that alterations in calcium homeostasis in cardiomyocytes underlie cardiac structural and functional changes in severe sepsis. *In vitro* studies demonstrated changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and expression of calpain-1 and dystrophin in neonatal cultured cardiomyocytes after adding sera from septic compared to sham-operated mice to the cultures. *In vivo* studies using the calcium channel blocking drugs verapamil (VP) to selectively inhibit the influx of calcium in the myocardial cells [20] and dantrolene (DT) to abolish excitation-contraction coupling in muscle cells by inhibiting calcium release from sarcoplasmic reticulum by blocking the cardiac type-2 ryanodine receptors (RyR2) [21] restored or prevented altered expression of calpain-1, dystrophin, and the contractile proteins sarcomeric actin and myosin in response to sepsis. Moreover, VP and DT prevented the compromised cardiac function and extended survival of mice submitted to severe sepsis induced by CLP compared to sham-operated controls.

Materials and Methods

Ethics statement

The animal protocols were approved by the Committee on Animal Research of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (Protocol#s 120/2009 and 183/2010) and by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Albert Einstein College of Medicine, New York, USA and

complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH Publication No 85-23, revised 1996). All efforts were made to minimize animal suffering.

Mice

Male C57BL/6 mice weighing 22–25 g were maintained at a constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and a 12:12h light-dark cycle. They were housed at the animal Facility of the Department of Pathology of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto or at the Institute for Animal Studies of the Albert Einstein College of Medicine and given standard mouse chow and water *ad libitum*. Primary culture of neonatal mouse cardiomyocytes was performed with cardiomyocytes obtained from neonatal C57BL/6 mice from the breeding colonies of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto and of Einstein College of Medicine.

Polymicrobial sepsis (CLP model) and blood collection

A modified CLP model was used to induce polymicrobial sepsis [22]. Briefly, mice were anesthetized with 2.0% isoflurane vaporized in medical oxygen (O_2) via facemask. The abdomen was shaved and a midline incision performed. The cecum was isolated and ligated with 6–0 silk thread below the ileocecal valve without causing bowel obstruction and punctured with an 18-gauge needle to induce severe septic injury (SSI). Bowel content was gently extruded through the puncture and the cecum was then replaced to its original position and the abdomen sutured. Sham-operated animals (controls) underwent the same procedures, except for cecal ligation and puncture. All mice received subcutaneous doses of saline (50 mL/kg of body weight) immediately and 12 hours after surgical procedure to prevent dehydration. Sodium dipirone solution (10 mg/100 g body weight, i.p.) was administered at the start of surgery, then 6 and 14 hours post-surgery for pain relief. Rats were awakened from anesthesia, monitored to ensure adequate recovery, and returned to the animal facility. Mice were monitored daily for signs of disease, which typically included piloerection, hunched gait, lethargy and eye discharge. Mice displaying severe signs of distress (labored breathing, non-responsiveness to cage tapping, failure of grooming and severe eye discharge) were humanely sacrificed by injecting a mixture of ketamine (90–120 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) followed by cervical dislocation. The survival rate was monitored each 12 hours for 5 days after surgery using 8 animals per group. Six hours after CLP, vein tail blood samples from septic and sham-operated mice were collected, centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 5 min, and the serum stored at -80°C .

In vitro experiments

Primary culture of neonatal mouse cardiomyocytes and treatments. Cardiomyocytes were isolated from neonatal mice hearts as described previously [23]. Briefly, 20 neonatal mice were killed by decapitation, the hearts isolated and minced in the dissociation solution containing 1.25% pancreatin (GIBCO, Grand Island, NY, USA) and 300 mg/L bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) diluted in (in g/L) 8.0 NaCl, 0.2 KCl, 0.05 Na_2HPO_4 , 1.0 NaHCO_3 , and 2.0 dextrose. The homogenate was transferred to an Erlenmeyer flask with the dissociation solution and placed in a water bath while continuously stirring. The supernatant fraction from each digestion period was spun at 1200 rpm for 10 min, and the pellet re-suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO) and 1% penicillin/streptomycin (GIBCO). This procedure was repeated 5–7 times and then the tube with dissociated cells was placed in the

incubator (37°C, 5% CO₂). The cells were pooled and plated in 100 mm culture dishes for 2 hours. Unattached 5×10^5 cells/cm³ or 5×10^4 cells/cm³ highly rich in myocytes were then collected from the 100 mm dishes, plated in 6-well cell culture plates (Corning, NY, USA) and in glass bottomed dishes (MatTek, Ashland, MA USA) or in Permax Lab-Teks chamber slides (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA), respectively, and placed in the incubator for 24 hours. After this period, the medium was replaced by DMEM supplemented with cytosine b-D-arabino-furanoside (Sigma-Aldrich). After 48 hours, 85–90% of plated cardiomyocytes showed spontaneous contractility. After 5 days the culture medium was removed and new serum-free medium supplemented with 10% (v/v) serum from either septic or sham-operated mice was immediately added and left in the incubator for additional 2 minutes or 24 hours. Following the experimental periods, the cardiac cells were washed and processed for Western blotting, immunofluorescence labeling for detection of calpain-1 and dystrophin, and measurement of [Ca²⁺]_i in response to septic serum.

Imaging of intracellular calcium transients. The [Ca²⁺]_i in cardiomyocytes was measured as described previously [24,25]. Briefly, neonatal cardiomyocytes cultured on glass bottom dishes (MatTek) were loaded with the ratiometric calcium indicator Fura-2-acetoxymethyl ester (Fura-2 AM, 10 μM, Molecular Probes, Eugene, OR) in DMEM without phenol red (Invitrogen-GIBCO) for 45 min at 37°C in a CO₂ humidified incubator. The cultures were then rinsed three times with Tyrode solution [(in mM) 137.0 NaCl, 2.7 KCl, 0.5 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 12.0 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5.5 glucose, and 5 HEPES; pH 7.1–7.2] to remove the unincorporated indicator and kept in Tyrode solution throughout the experiments. Dishes were then placed on the stage of a Nikon TE2000-U inverted microscope (Japan) equipped with a 20× S Fluor objective (Nikon, Japan), Fura-2 filter set (Chroma, Bellows Falls, VT, USA), CoolSnap HQ² CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) and shutter system (Lambda DG-4, Sutter Instruments, Novato, CA, USA) driven by a computer through Metafluor software (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). Changes in Fura-2 fluorescence intensities emitted at two excitation wavelengths (340 and 380 nm) were acquired at 1.0 Hz and [Ca²⁺]_i was determined from Fura-2 ratio images using an *in vitro* calibration curve as previously described [25]. Cardiomyocytes were continuously imaged for 5 min before and 5 min after the cells were stimulated with either 10% serum from septic mice or 10% serum from sham-operated mice diluted in Tyrode solution. Effects of prolonged, 24 hour exposure to 10% serum from septic or control mice on cardiomyocyte intracellular calcium transients were also investigated. For this, serum was added to the cultures 24 hours prior to imaging and maintained throughout the loading of cells with Fura-2 AM, washing of the calcium indicator and imaging steps. Cells were then imaged for 5 minutes without interruption, as described above. Effects of serum on cardiomyocytes was evaluated as changes in basal [Ca²⁺]_i levels divided by the number of transients imaged in the 5 min duration of the recordings.

Immunofluorescence. Neonatal cardiomyocytes seeded in Lab-Tek chamber slides were stimulated with serum obtained from septic and sham-operated mice. After septic or sham serum challenge, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min, and then washed three times with 4°C cold PBS. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and non-specific staining was blocked with 4% BSA. Primary antibodies to calpain-1 (goat polyclonal antibody anti-calpain-1, 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and dystrophin (rabbit polyclonal antibody anti-dystrophin, 1:200; Santa Cruz

Biotechnology) were incubated overnight at 4°C; following, the cells were washed and incubated with fluorescein conjugated secondary antibodies (anti-goat IgG, diluted 1:500 or anti-rabbit IgG, diluted 1:500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). F-actin filaments were stained with Alexa fluor 594 conjugated phalloidin (Invitrogen-GIBCO) for 1 hour at room temperature and DNA was stained with DAPI. The images were analyzed with Leica DM 6000 M microscope equipped with Leica AF6000 Deconvolution System (Leica Microsystems).

Western blotting. To measure calpain-1 and dystrophin protein expression levels in cultured cardiomyocytes 24 hours after serum stimulation, the cells (n = 3 distinct cardiomyocyte cultures/group) were removed from plates and lysed with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) using cell lysis buffer in extraction buffer. Total cell protein (20 μg of protein/well) were resolved on a 5% or 10% SDS-Page gel and transferred to PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK). The membranes were blocked with 5% albumin for 2 hours and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies anti-calpain-1 (goat polyclonal antibody, 1:500; Santa Cruz Biotechnology) and anti-dystrophin (rabbit polyclonal antibody, 1:500; Santa Cruz Biotechnology) followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies goat anti-rabbit IgG and rabbit anti-goat IgG (1:10,000; Santa Cruz Biotechnology) for 1 hour at room temperature. To control for lane loading, the same membranes were probed with rabbit anti-tubulin (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology) or anti-goat anti-GAPDH (1:10,000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) after being washed with stripping buffer. The membranes were developed using ECL (Millipore, Billerica, MA, USA). Gel documentation and signals quantification were made using the Bio-Image Analysis of Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). The results were expressed as relative integrated intensity compared with that of control hearts measured in the same batch.

In vivo experiments

Groups and drugs. Male C57BL/6 mice were allocated into six groups: 1) sham; 2) SSI; 3) sham+verapamil (SH+VP); 4) SSI+verapamil (SSI+VP); 5) sham+dantrolene (SH+DT) and 6) SSI+dantrolene (SSI+DT). Half the mice received intraperitoneal (i.p.) injection of either verapamil hydrochloride (5 mg/Kg body weight, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) or dantrolene sodium salt (10 mg/Kg body weight, Sigma-Aldrich) diluted in sterile 0.9% NaCl saline (100 μl total volume/animal) two hours after CLP surgery or sham-operation. Control groups (sham and SSI) received an equivalent volume of saline alone.

Western blotting. To determine the amount of calpain-1, dystrophin, sarcomeric actin and cardiac myosin heavy chain (MHC) in the hearts of untreated and treated septic and sham-operated mice (n = 3–5 animals/group), Western blotting was performed 6 and 24 hours after CLP procedure or sham-operation. The animals were anesthetized with ip injection of ketamine (87.5 mg/kg) and xylazine (2.5 mg/kg), the hearts were collected and washed in cold saline and the left ventricles were isolated and homogenized in extraction buffer with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich).

Total protein (50 μg protein/well) was resolved on 5% or 10% SDS-Page gels and transferred to PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK). The membranes were blocked with 5% albumin for 2 hours and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: anti-calpain-1 (goat polyclonal antibody, 1:500; Santa Cruz Biotechnology), anti-dystrophin (rabbit polyclonal antibody, 1:500; Santa Cruz Biotechnology), anti-α-sarcomeric actin (goat polyclonal antibody, 1:1000; Sigma-Aldrich)

and anti cardiac myosin heavy chain (MHC) (goat polyclonal antibody 1:2000) (Sigma-Aldrich) followed by incubation with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or rabbit anti-goat IgG secondary antibodies for 1 hour at room temperature. The loading control, documentation, and quantification of membranes were performed as described above.

Electron microscopy. Small blocks (1 mm^3) of myocardial tissue from the left ventricular free wall of mice ($n = 4$ animals/group) 24 h after septic injury and sham-operation were fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide. Ultrathin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Zeiss EM109/900 electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 80 kV.

Echocardiography. Transthoracic echocardiography was used to evaluate left ventricular (LV) function in untreated and treated septic and sham-operated mice ($n = 7\text{--}10$ animals/group), immediately before surgery and 12 and 24 hours after CLP procedure or sham-operation. Mice were lightly anesthetized with inhaled isoflurane (1.5%) vaporized in medical O_2 . Thoracic hair was removed with a topical depilatory agent and ultrasound gel was placed to form an interface between chest and a RMV 707B High-Frame-Rate Scanhead (frequency band 15–45 MHz) from Vevo 770 System or a MS 400 High-Frame-Rate transducer (frequency band 18–38 MHz) (Visual Sonics, Toronto, ON, Canada). Heart rate (HR) and body temperature ($^{\circ}\text{C}$) were continuously monitored. The mice core temperatures were maintained normothermic using a heat-controlled platform. High-resolution one-dimensional M-mode images as well as high-resolution two-dimensional electrocardiogram (ECG) based kilohertz visualization (EKV) B-mode were acquired. High-resolution B-mode images were used to measure the area and volume of the LV and to calculate the ejection fraction (EF), fractional shortening (FS) and cardiac output (CO).

Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ SD. Multiple comparisons were made using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey or Bonferroni post-tests. For comparison of two groups Student's *t*-test was used. The survival rates were constructed using the Kaplan-Meier curve, and differences in mortality were compared using the log-rank (Mantel-Cox) test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Intracellular calcium concentration

Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were evaluated by epifluorescence microscopy using the ratiometric probe Fura-2-AM in cultured neonatal cardiomyocytes after addition of sera from both sham-operated and septic mice. Cardiomyocytes stimulated with serum from SSI mice exhibited a significant increase of mean $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of about 49% and 21% at 2 minutes and 24 hours, respectively, as compared to mean $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cultured cardiomyocytes subjected to serum from sham-operated mice. At 2 minutes after septic serum addition to the culture, a marked increment of mean $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed due to increased basal (diastolic) levels of the ion, resulting in a strikingly lower amplitude of Ca^{2+} transients compared with that of control cultured cardiomyocytes, with no change in frequency of Ca^{2+} transient oscillations. In contrast, at 24 hours after septic serum addition, the cardiomyocytes showed higher mean basal Ca^{2+} levels but similar amplitudes and frequency of transient Ca^{2+} oscillations (Figure 1).

In vitro Immunofluorescence and Western blotting

Calpain-1 and dystrophin expression in neonatal cardiomyocytes were evaluated 24 hours after adding serum from septic or control mice [(10% (v/v))]. The immunofluorescence analysis clearly showed an increased expression of calpain-1 in cardiomyocytes submitted to septic serum challenge as compared with cardiomyocytes treated with control serum. Western blots showed a more than 2.5 fold increment in calpain-1 level in cultured cardiomyocytes subjected to septic serum in comparison to those subjected to control serum (figure 2), corroborating the immunofluorescence results. Immunostaining showed lower dystrophin expression in cultured neonatal mice cardiomyocytes exposed to septic serum compared to cardiomyocytes exposed to normal serum. As is particularly evident in the overlaid images, the loss/reduction of dystrophin expression was associated with cytoplasmic vacuolization and disruption of actin filaments. Western blotting revealed that dystrophin abundance was significantly lower (by about 40%) in cardiomyocytes stimulated with septic serum compared to cardiomyocytes stimulated with serum from sham-operated mice (figure 3).

In vivo Western blotting

The average amount of calpain-1 in mice heart ventricles, relative to tubulin was evaluated 6 and 24 hours after sham-operation or severe septic injury in untreated (sham SH) and treated (SSI) mice with either verapamil (VP) or dantrolene (DT). Mean calpain-1 amount was significantly more than 80% higher in SSI mice at 6 hours after CLP when compared with the values observed in sham control ventricles. Twenty-four hours after CLP the mean calpain-1 amount in SSI ventricles was increased by about 30% (Figure 4A). By contrast, calpain-1 expression in ventricles of SSI mice treated with verapamil (SSI+VP) at 6 hours after CLP was similar to that of sham-operated mice given verapamil and at 24 hrs after treatment, calpain-1 in SSI mice treated with verapamil was significantly reduced than in sham-operated treated mice. Calpain-1 levels in SSI mice treated with dantrolene (SSI+DT) at 6 and at 24 hours after CLP were significantly reduced in comparison with sham-operated mice treated with dantrolene. Dantrolene treatment also decreased calpain-1 at 6 and 24 hours after CLP compared to SSI group (Figure 4A).

Dystrophin, sarcomeric actin and myosin in mice heart ventricles, with respect to tubulin were evaluated 24 hours after sham-operation or CLP in untreated verapamil- and dantrolene-treated mice.

Dystrophin levels in SSI heart ventricles were reduced by about 50% when compared with that of sham-operated mice 24 hours after CLP. Treatment of SSI mice either with verapamil or dantrolene significantly prevented the loss of dystrophin in heart ventricles with no difference compared to ventricles of sham-operated and sham-treated with VP (1.20 ± 0.14 AU) and DT (1.27 ± 0.16 AU) (Figure 4).

Sarcomeric actin was about 30% lower in SSI mouse heart ventricles compared to that of sham-operated mice 24 hours after CLP. Verapamil or dantrolene treatment abrogated the reduction of sarcomeric actin seen in SSI hearts, with values similar to those in ventricles of sham-operated and sham-treated with VP and DT (Figure 4B).

In addition, myosin protein was reduced by about 40%, in SSI mice ventricles compared to those of sham-operated mice 24 hours after CLP. Treatment of septic mice with either verapamil or dantrolene prevented the reduction of MHC protein in heart ventricles seen in the SSI group, with values not different

Figure 1. Increment of mean $[Ca^{2+}]_i$ after addition of septic serum from mice. Cardiomyocytes exposed to serum from septic mice for 2 minutes (upper panel) presented a marked increment of mean $[Ca^{2+}]_i$, around 49%, due to a rise of diastolic ion levels, with decreased amplitude of the calcium transients as compared to cardiomyocytes incubated with serum from sham-operated mice. Cardiomyocytes exposed to septic serum for 24 hours (bottom panel) demonstrated an effective mean increase of $[Ca^{2+}]_i$, around 21%, due to a rise of both systolic and diastolic ion levels, but the amplitude of systolic and diastolic $[Ca^{2+}]_i$ levels were similar in both experimental and control conditions (*, $P < 0.01$).
doi:10.1371/journal.pone.0068809.g001

from those observed in sham-operated and sham-operated treated mice with VP (Figure 4C).

Electron microscopy

Protein degradation within the heart occurs through three main pathways: (a) the calpain system, (b) the ubiquitin-proteasome system (UPS), and (c) autophagy/lysosomal degradation. These three systems degrade protein using distinct but complementary mechanisms. The process of autophagy degrades larger proteins such as sarcomere proteins and organelles that the UPS is unable to handle while calpain-mediated proteolysis is mediated by a family of calcium-dependent cysteine proteases present in all cells. Taking into account previous results from our laboratory [9,10] and the present ones demonstrating degradation (proteolysis) of sarcomeric actin and myosin, the myocardium of mice 24 hours after severe sepsis was examined under the electron microscope in order to evaluate autophagy/lysosomal degradation as compared with sham-operated controls.

Electron microscopy of myocardium from control mice was similar to that reported in the literature [26]. However, the hearts from mice with severe sepsis 24 hours after CLP showed abundant accumulation of autophagolysosomes within cardiomyocytes, their number varying from cell to cell, with many myofibers without any

inclusion and many others with a variable number of vacuoles spread out through the sarcoplasm of cardiomyocytes, most of them close to the nuclei. Moreover, the cardiomyocytes of septic hearts displayed diffuse foci of disorganized/disrupted sarcomeres, with blurring and breakage of Z-bands and increased number of electron-opaque calcium granules within mitochondria (figure 5).

Cardiac function (ECHO)

Using two-dimensional and M-mode echocardiography, the ejection fraction-Teichholz (EF) and fractional shortening (FS) were calculated and used as a determinant of LV cardiac function immediately before and 12 and 24 hours after CLP surgery.

Figure 6 shows that at 12 hours after CLP, the mean ejection fraction (EF) from SSI mice ($69.27 \pm 10.48\%$) was similar to the value found in sham-operated mice. At 24 hours after severe septic injury, the mean EF was significantly decreased by about 27% as compared to sham-operated controls. Septic mice treated with either verapamil or dantrolene showed statistically similar values of EF at 12 hours and at 24 hours after CLP. Moreover, these mean EF values of SSI treated mice were similar to the values observed in sham-operated controls and sham-operated mice treated with VP or DT (Figure 5). The mean values of EF of septic mice treated with either verapamil or dantrolene at 24 hours after CLP were

Figure 2. Increased expression and amount of calpain-1 in cultured cardiomyocytes stimulated with septic serum. The fluorescent signal for calpain-1 disclosed increased in cardiomyocytes challenged with serum from septic mice (bottom panel, green fluorescence) in comparison with the fluorescent signal in cardiomyocytes stimulated with serum from sham-operated mice (upper panel, green fluorescence). F-actin was stained with Alexa Fluor 594 dye (red fluorescence) and DNA with DAPI (blue fluorescence). Western blotting demonstrated a strikingly increased, around 168%, of calpain-1 amount in cardiomyocytes stimulated with serum from septic animals compared to cardiomyocytes stimulated with serum from sham-operated mice (*, $P < 0.01$). GAPDH was used as a protein loading control. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. Scale bars indicate 50 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0068809.g002

significantly improved in comparison when compared to the untreated SSI group in the same period (Figure 6).

The mean fractional shortening (FS) values of SSI mice were not statistically different from values observed in sham-operated mice 12 hours after CLP surgery. At 24 hours after SSI injury, the mean FS was about 42% lower than the mean FS in sham-operated controls. Similar mean values of FS were observed in septic mice given either verapamil or dantrolene at 12 hours and 24 hours after CLP surgery. Additionally, these mean FS values were not different from those observed in sham-operated mice untreated or treated with VP or DT (Figure 6). The mean values of FS from septic mice treated with either verapamil or dantrolene at 24 hours after CLP were significantly improved in comparison with the SSI group in the same period (Figure 6).

Table 1 shows the mean cardiac output (CO), heart rate (HR) and body temperature ($^{\circ}$ C) evaluated during echocardiography. The mean CO was 35% decreased in SSI mice as compared to sham-operated mice 24 hours after CLP. The mean CO values from SSI mice treated with either verapamil or dantrolene was considerably improved, with values similar to those observed in sham-operated mice treated with VP and DT at 24 hours after CLP. The mean HR was slightly reduced in SSI mice when compared to sham-operated mice 24 hours after CLP injury and treatment with either verapamil or dantrolene restored HR to those of sham-operated mice. The mean body temperature ($^{\circ}$ C) of SSI mice was significantly reduced, when compared to sham-operated controls 24 hours after CLP. This difference in body temperature was restored with treatment of either verapamil or dantrolene.

Survival rate

The remarkable protection in all of the physiological parameters usually provided by calcium channel blockers dantrolene and verapamil prompted us to evaluate their effects on the resistance and/or susceptibility of mice subjected to severe sepsis induced by CLP. For these studies, survival rates of both sham-operated and septic mice, treated and untreated, were assessed over a period of 5 days (120 hours) after sham-operation or CLP. Figure 7 shows that SSI mice had a survival rate of 50% at 24 hours after surgery decreasing to 10% at 96 hours; verapamil-treated SSI mice showed a survival rate around 75% at 24 hours decreasing to 50% at 96 hours; and dantrolene-treated SSI mice presented a survival rate around 60% at 24 hours decreasing to 50% at 96 hours after CLP. All sham-operated untreated mice survived throughout the experimental period.

Discussion

The present study demonstrates for the first time that $[Ca^{2+}]_i$ in cultured neonatal mice cardiomyocytes markedly increase in response to the addition of serum from septic mice. The acute increase is about 50% and remains elevated by 20% 24 hours later. Higher amplitude of L-type Ca^{2+} channel currents, increased Ca^{2+} release or reduced uptake by the SR or both, may explain an increased $[Ca^{2+}]_i$ after septic serum addition. At two minutes after septic serum addition to the culture medium, the marked increment of mean $[Ca^{2+}]_i$ was due to increased diastolic concentration of the ion, the systolic levels being similar to those before septic serum. The diastolic calcium increased, giving rise to the decrease of the amplitude of the calcium transients, probably reflecting decreased calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum

Figure 3. Decreased expression and amount of dystrophin in cultured cardiomyocytes stimulated with septic serum. The fluorescent signal for dystrophin (green fluorescence) presented decreased expression (bottom panel) with bleb formation in cardiomyocytes stimulated with septic serum in comparison with the fluorescence expression in cardiomyocytes expose to serum from sham-operated mice (upper panel). F-actin was stained with phalloidin conjugated Alexa Fluor 594 dye (red fluorescence) and DNA with DAPI (blue fluorescence). Alexa Fluor 594 staining showed disruption and rearrangement of F-actin filaments. Western blotting demonstrated that dystrophin amount was markedly decreased, around 41%, in cardiomyocytes stimulated with serum from septic mice compared to amounts observed in cardiomyocytes stimulated with serum from sham-operated mice (*, $P < 0.01$). α -Tubulin was used as a protein loading control. Data are expressed as mean $\pm$ S.D. Scale bars indicate 50 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0068809.g003

[27] associated with decreased myocyte shortening [28] at this very beginning of the septic serum challenge imposed to the cultured cardiomyocytes. However, the frequency of Ca^{2+} transients in experimental and control cells was not different. In contrast, at 24 hours after septic serum, there was an effective mean increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to a rise of both systolic and diastolic ion levels. But at this point of the experiment, the amplitude of systolic and diastolic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels and frequency of Ca^{2+} transients were similar in both experimental and control conditions. A >2 -fold increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in smooth muscle cells was previously demonstrated in intact perfused rat thoracic aorta excised within the first 24 hours after CLP-induced sepsis as compared to sham controls, which was blocked immediately following the addition of dantrolene to the perfusion medium [17]. Moreover, an *in vivo* study detected an early almost twofold increase (24 hours after septic process) of calcium concentration, measured with NMR spectroscopy, in brains of adults rats submitted to CLP-induced sepsis in comparison with sham animals [19]. These changes were associated with injury of approximately 0.25% of glial cells. More recently, increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was disclosed in cultured human adipocytes after LPS stimulation that was partially blocked with verapamil and blocked almost completely with 2-aminoethoxydiphenyl borate, a blocker of store-operated calcium entry and inositol triphosphate-mediated release [16]. Increased Ca^{2+} leakage from the sarcoplasmic reticulum was observed in rat cardiomyocytes isolated in the late phase of CLP-induced sepsis, which was suggested to contribute to decreased myocyte shortening in sepsis [15]. More recently, Ca^{2+} trafficking abnormalities characterized by increased sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release associated with a rise in mitochondrial

Ca^{2+} content was demonstrated in cardiomyocytes isolated from rats treated with LPS [18]. It was proposed that sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} mishandling is likely to be an early event after intravenous administration of LPS to rats, thereby contributing to mitochondrial Ca^{2+} overload with metabolic failure and consequent cardiac dysfunction.

Indirect evidence of elevated calcium concentration in sepsis has been obtained by several studies showing increased activities of calcium-dependent proteases in tissues of septic animals, such as calpain [29] and glycogen phosphorylase-b kinase [30]. The immunofluorescence findings in the present study demonstrated an increased expression of calpain-1 in cardiomyocytes submitted to septic serum challenge as compared with that observed in cardiomyocytes tested with control serum. These alterations were corroborated by the Western blotting results showing a marked increment in calpain-1 level in cultured cardiomyocytes subjected to septic serum in comparison to those subjected to control serum. Calpains are calcium-activated neutral cysteine proteases with two major isoforms besides tissue specific forms: (a) calpain-1 or μ that requires micromolar Ca^{2+} concentrations for activity and (b) calpain-2 or m that requires millimolar Ca^{2+} concentrations [13]. Binding of Ca^{2+} to calpain induces the release of constraints that are imposed by domain interactions and results in activation. Many of the cytoskeletal proteins involved in linking the cytoskeleton to the plasma membrane as well intermediate filament proteins are cleaved rapidly by calpains. Cultured neonatal mice cardiomyocytes exposed to septic serum displayed decreased immunostaining for dystrophin in comparison with cardiomyocytes exposed to normal serum. This was confirmed by Western blotting that showed substantially decreased dystrophin in cardiomyocytes stimulated

Figure 4. Verapamil (VP) and dantrolene (DT) abrogated calpain-1, dystrophin, sarcomeric actin, and myosin heavy chain changes induced by severe sepsis in mice. (The mean amount of calpain-1 in hearts from untreated mice (Sham) or in hearts of mice treated with either verapamil (SH+VP) or dantrolene (SH+DT) at 6 and 24 hours after sham operation were absolutely identical regarding each procedure and computed and represented as a single column). **A.** The mean amounts of calpain-1 in SSI hearts at 6 and 24 hours after CLP procedure were markedly increased in comparison with the mean amount in hearts of control mice after sham operation. In contrast, the mean amount of calpain-1 in SSI hearts from mice treated with verapamil at 6 hours after surgery was similar to the mean amount of calpain-1 in hearts from sham-operated treated with verapamil. The mean amount of calpain-1 in septic hearts from mice treated with verapamil at 24 hours after CLP procedure was significantly inferior to the mean amount of calpain-1 in hearts from sham controls. The mean amounts of calpain-1 in SSI hearts from mice treated with dantrolene at 6 and 24 hours after operation were significantly lower in comparison with the mean amount of calpain-1 in sham controls treated with dantrolene. **B.** The mean amount of dystrophin in SSI hearts was significantly reduced in comparison with the mean value in sham controls. The mean amounts of dystrophin in SSI hearts from mice treated with either verapamil or dantrolene were similar to those observed in sham-operated mice treated with either verapamil or dantrolene and sham-operated untreated mice. **C and D.** The mean amounts of actin and myosin in SSI hearts were markedly reduced compared to sham control values. Contrasted with these results, the values of sarcomeric actin and myosin in SSI hearts from mice treated with either verapamil or dantrolene were similar to those disclosed in hearts from sham-operated mice treated with verapamil or dantrolene and sham-operated untreated mice. (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0068809.g004

with septic serum in comparison with values in cardiomyocytes stimulated with serum from sham-operated mice. Calpains can induce proteolysis of dystrophin very rapidly when appropriately activated [31]. Moreover, the immunofluorescence study showed that cultured cardiomyocytes stimulated with septic serum showed

disruption and rearrangement of F-actin filaments causing cell shape changes with bleb formation as an early event. Previously, an elevation in calcium ion concentration *in vitro* was associated with injury in different cell types such as rabbit cardiomyocytes, rabbit proximal tubular cells and rat hepatocytes with formation of blebs

Figure 5. Electron microscopic study of the mice myocardium 24 hours after septic injury and sham-operation. **A.** The ultrastructural examination revealed that the myocardium from control mice did not differ from that reported in the literature presenting continuous and regularly spaced myofibrils that alternate with serially arranged, elongated mitochondria (mi). Sarcomeres are clearly delimited by two neighboring well-defined Z-bands. Interfibrillar mitochondria are closely related to the sarcomere. Magnification bar represents 2 μ m. **B.** The ultrastructure of the myocardium of mice with severe sepsis 24 hours after CLP showed ill-defined sarcomeres with abundant accumulation of autophagolysosomes within cardiomyocytes (arrows). Magnification bar represents 2 μ m. **C.** Higher magnification showing autophagolysosomes (arrows), foci of ill-defined and disorganized/disrupted sarcomeres and blurring/breakage of Z-bands (Z). Magnification bar represents 1 μ m. **D.** Increased number of electron-opaque calcium granules within mitochondria (arrow heads), breakage of Z band (Z) and autophagolysosome (arrow). Magnification bar represents 500 nm. M, M line; Nu, nucleus; pm, plasma membrane; IS, interstitial space; Cap, capillary.
doi:10.1371/journal.pone.0068809.g005

Figure 6. Verapamil and dantrolene restrained ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) changes induced by severe sepsis in mice. (The left ventricular ejection fraction and fractional shortening in untreated mice (Sham) or in mice treated with either verapamil (SH+VP) or dantrolene (SH+DT) at 12 and 24 hours after sham operation were absolutely identical regarding each procedure and computed and represented as a single column). **A and B.** The left ventricular ejection fraction and fractional shortening in mice submitted to CLP-induced sepsis were similar to the values in mice submitted to sham operation at 12 hours after surgical procedure. But the left ventricular ejection fraction and fractional shortening in SSI mice was markedly reduced in comparison with the mean values observed in sham controls at 24 hours after surgery. In contrast, the treatment with either verapamil or dantrolene abrogated the left ventricular ejection fraction and fractional shortening in SSI mice that presented mean values similar to those observed sham-operated mice treated with either verapamil or dantrolene and sham-operated untreated mice. (n=7 to 10 in each group; *, $P<0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0068809.g006

and cell death. [32,33,34]. Likewise, cultured rat proximal tubule cells showed disruption of F-actin filaments labeled with Alexa Fluor 594 and bleb formation when treated with mercuric chloride (HgCl_2), a highly toxic and corrosive chemical substance that raises free cytosolic ionized calcium and activates calpain [35].

In vivo studies were undertaken to evaluate indirectly the occurrence of elevated calcium myocardial concentration by determining the expression and amounts of calpain-1 in animals submitted to CLP-induced sepsis in comparison with sham-operated controls, either untreated or treated with verapamil or dantrolene. Markedly increased calpain-1 at 6 and 24 hours after CLP were observed in septic mice, confirming the *in vitro* observations. The levels of calpain-1 in septic mice treated with verapamil 6 hours after CLP were similar to the values observed in sham-operated and treated mice. However, treatment with verapamil 24 hours after CLP caused a decrease in the mean amount of calpain-1 compared to the values in sham-operated and sham-operated treated with verapamil or dantrolene. Similarly, treatment with dantrolene decreased cardiac calpain-1 amounts at either at 6 or 24 hours after severe sepsis induced by CLP in comparison with sham-operated and sham-operated treated animals.

The amounts of dystrophin, myosin heavy chain, and sarcomeric actin were evaluated 24 hours after surgery in both sham-operated and septic untreated hearts. The amount of dystrophin was strikingly reduced in septic hearts at 24 hours after sepsis induction as compared with the mean value in hearts from sham-operated mice, corroborating previous data from our laboratory [9,10]. This decrease is a direct consequence of calcium-dependent calpain-activity that cleaves dystrophin very rapidly when the calcium concentration is compatible with its activation [13,31]. This interpretation is reinforced by observations in the present study showing that in septic mice treated with verapamil or dantrolene 2 hours after surgery, heart dystrophin levels were similar to those in hearts from sham-operated mice treated with verapamil or dantrolene and sham-operated untreated mice.

Similarly, the contractile myofibrillar proteins, sarcomeric actin, and myosin were markedly reduced 24 hours after CLP, confirming observations from a previous study from our laboratory [9]. Levels of sarcomeric actin and myosin heavy chain in the hearts from septic mice treated with verapamil or dantrolene and in the hearts from sham-operated animals treated with verapamil or dantrolene were not different from the mean amount of the myofibrillar contractile proteins in the hearts of sham-operated

Table 1. Major hemodynamic variables in mice 24h after CLP.

	Sham	SSI	SH+VP	SSI+VP	SH+DT	SSI+DT
HR (bpm)	562±36.09	505±47.88	590±16.43	588±22.10	568±61.99	553±32.01
CO (mL/min)	14.57±3.74	9.15±3.78*	16.48±1.08	14.11±2.82	15.08±3.16	13.37±3.73
Body temperature (°C)	36.2±0.36	33.0±2.40*	36.8±0.46	36.4±1.02	36.0±0.80	35.5±1.46

Mice subjected to CLP or sham-operation and untreated or treated with either verapamil (VP) or dantrolene (DT).

Echocardiography procedures were performed in sham-operated or septic mice at the indicated time points as described in materials and methods.

* $P<0.001$ vs. sham.

HR, heart rate; bpm, beats per minute; CO, cardiac output; °C, body temperature.

doi:10.1371/journal.pone.0068809.t001

Figure 7. Verapamil and dantrolene improved survival rate in mice submitted to CLP-induced sepsis. Sham-operated untreated mice presented a 100% survival rate throughout the analyzed period of 120 hours. SSI mice had a survival rate of 50% at 24 hours after surgery, decreasing to 10% at 96 hours and remaining steady at this rate until 120 hours after surgery. In contrast, SSI mice treated with verapamil showed a survival rate around 75% at 24 hours, decreasing to 50% at 96 hours and remaining steady at this rate until the end of the experimental period. Similarly, SSI mice treated with dantrolene disclosed a survival rate around 60% at 24 hours, decreasing to 50% at 96 hours and remaining steady at this rate until 120 hours after CLP. The bar graph illustrates the survival rate for each group at 5 days after the surgical procedure. (n=8 animals per group). doi:10.1371/journal.pone.0068809.g007

untreated mice. Studies *in vitro* have clearly demonstrated that myosin heavy chain is degraded very slowly by calpains and sarcomeric actin is not degraded at all [13]. However, denatured myosin and actin are rapidly degraded indicating that denaturation affects rates of cleavage by calpains. On the other hand, previous investigation support the theory that calpains might be the degradative system responsible for myofibril destabilization by other proteins that are important in the structural integrity of the sarcomere [36], i.e., actin and myosin are poor substrates to calpain but other proteins important for sarcomere integrity, such as titin and nebulin, are excellent calpain substrates [37]. Sepsis has been shown to increase the expression calpain genes, to disrupt Z-bands, and to enhance the release of myofilaments in skeletal muscle [38], which supports a role for calpain activation in the septic process.

In this study, electron microscopy provided morphological evidence of diffuse foci of sarcomere disruption, blurring and breakage of Z-bands, pronounced formation of autophagolysosomes, and increased number of electron-dense granules in the mitochondrial matrix in hearts of untreated septic mice 24 hours after injury. Previous work demonstrated that the disruption of the sarcomere followed by release of actin and myosin plays an important role in sepsis induced skeletal muscle wasting [39]. Actin and myosin from the sarcomere are first disassembled by calpain or caspase and then ubiquitinated and degraded by proteasome [36,37,40,41]. The failure or overwhelming of the ubiquitin-proteasome system (UPS) to clear ubiquitinated and aggregated proteins leads to autophagy, which assists UPS, i.e., cytoplasmic contents are aggregated and ubiquitinated proteins are sequestered inside specialized vacuoles called autophagosomes and following this delivered to the lysosome for degradation forming the autophagolysosomes [36], as seen in the present study.

Previously, we demonstrated increased perinuclear autofluorescent lipofuscin in cardiomyocytes of human septic hearts [5]. Reactive oxygen species are known to promote lipofuscin pigment formation representing oxidized/cross linked proteins. Similarly, excessive accumulation of autophagosomes has been demonstrated in cardiomyocytes of failing human hearts, which might contribute to autophagic cell death and the development of contractile dysfunction in failing hearts [42]. Moreover, Z-bands, which define the lateral borders of the sarcomeres, are involved in sarcomere organization, force generation and transmission, and act as an interface between contractile proteins, other cytoskeletal proteins, and signaling proteins [43]. A wide variety of Z-band protein mutations are associated with the development of several cardiomyopathies, such as dilated cardiomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy, right ventricular cardiomyopathy, and muscular dystrophies [13,44]. Furthermore, Z-bands might also have an important role in normal protein turnover via the UPS and autophagy. The electron dense granules in mitochondrial matrix correspond to calcium deposits [45]. The increased $[Ca^{2+}]_i$ in septic heart may lead to mitochondrial calcium accumulation that decreases ATP production and increases mitochondrial generation of reactive oxygen species which further decreases ATP production [46]. This may result in disruption of plasma membrane and cell death. Moreover, increased mitochondrial calcium as occurs in ischemia has been shown to increase autophagy.

Cardiac function in septic and sham-operated mice, untreated or treated with either verapamil or dantrolene, was evaluated through the echocardiographic parameters ejection fraction (FE), a measure of the efficacy of the heart, and fractional shortening (FS), an index of left ventricle contractility. Both EF and FS values in mice submitted to CLP-induced sepsis were similar to those observed in sham-operated animals at 12 hours after CLP surgery.

However, reductions in both EF and FS were observed in septic mice in comparison with sham-operated mice at 24 hours after injury. The treatment of septic mice with either verapamil or dantrolene completely abrogated EF and FS changes with mean values similar to those observed in sham-operated untreated and treated animals.

Numerous studies have pointed out the physiopathologic role of dystrophin with its associated glycoproteins on myocardial contractile performance. The lack of dystrophin in the hearts of patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) as well as in *mdx* mice constitutes the structural basis for the development of dilated cardiomyopathy [47,48,49,50]. Also, dystrophin loss has been related to end-stage cardiomyopathies and proposed as a common route for myocardial dysfunction and progression to advanced heart failure [51,52]. Besides, alteration of contractile proteins might be a major factor determining the development of heart failure, since these alterations can have direct impact on the structural integrity of cardiomyocytes and consequently on reduction of contractile function in the failing heart [53,54]. The cardiac output (CO), heart rate (HR) and body temperature (°C) assessed during the echocardiographic study all were reduced in septic mice as compared to sham-operated controls at 24 hours after CLP. However, both verapamil and dantrolene treatments restrained CO, HR and BT alterations with mean values similar to those observed in sham-operated untreated and treated mice.

Moreover, the survival rate of septic mice treated with verapamil or dantrolene was >5 fold than septic untreated mice. The partial prevention of the mortality rate in septic mice treated with calcium channel blockers is likely attributable to other causes of death in this pathological process.

In summary, this study offers novel and mechanistic data to clarify subcellular events that occur in the pathogenesis of septic cardiomyopathy and cardiac depression in severe sepsis. Cultured neonatal mouse cardiomyocytes subjected to serum obtained from

mice with severe sepsis presented strikingly higher $[Ca^{2+}]_i$ and calpain-1 levels associated with decreased expression of dystrophin and disruption and derangement of F-actin filaments and cytoplasmic bleb formation. Severe sepsis induced in mice led to increased expression of calpain-1 in cardiomyocytes. Moreover, decreased myocardial dystrophin, sarcomeric actin, and myosin heavy chain were observed in septic hearts associated with depressed cardiac contractile dysfunction and a very low survival rate. Verapamil and dantrolene prevented the increase of calpain-1 levels and preserved dystrophin, actin, and myosin loss/reduction as well cardiac contractile dysfunction associated with strikingly improved survival rate. Actin and myosin from the sarcomere are first disassembled by calpain and then ubiquitinated and degraded by proteasome or sequestered inside specialized vacuoles called autophagosomes, which are delivered to the lysosome for degradation forming autophagolysosomes. These abnormal parameters emerge as therapeutic targets and their modulation may provide beneficial effects on future cardiovascular outcomes and mortality in sepsis. Further studies are needed to shed light on this mechanism, mainly regarding specific calpain inhibitors, which may provide new interventional pathways to prevent sepsis-induced cardiomyopathy and cardiac dysfunction.

Acknowledgments

We thank Monica A. Abreu, Maria Elena Riul, Lígia B. Santoro, Vicki L. Braunstein and Dazhi Zhao for their excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAR MRNC LMM. Performed the experiments: MRNC LMM ECC ACF SOS CMP MJF. Analyzed the data: MRNC MAR LMM SOS. Contributed reagents/materials/analysis tools: DCS HT JSS MAR. Wrote the paper: MRNC MAR LMM. Performed Pathology analyses: MAR.

References

- Celes MR, Prado CM, Rossi MA (2013) Sepsis: Going to the heart of the matter. *Pathobiology* 80: 70–86.
- Rudiger A, Singer M (2007) Mechanism of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 35: 1599–608.
- Vincent JL, De Backer D (2005) Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care* 9: S9–12.
- Muller-Werdan U, Buerke M, Ebel H, Heinroth KM, Herklotz A, et al. (2006) Septic cardiomyopathy – a not yet discovered cardiomyopathy? *Exp Clin Cardiol* 11: 226–236.
- Rossi MA, Celes MR, Prado CM, Saggioro FP (2007) Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock* 27: 10–18.
- Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, Sarma JV, Ward PA (2008) Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med* 14: 327–336.
- Hunter JD, Dodd M (2010) Sepsis and the heart. *Br J Anaesth* 104: 3–11.
- Vieillard-Baron A (2011) Septic cardiomyopathy. *Ann Intens Care* doi: 10.1186/2110-5820-1-6
- Celes MR, Torres-Dueñas D, Prado CM, Campos EC, Moreira JE, et al. (2010) Increased sarcolemmal permeability as an early event in experimental septic cardiomyopathy: A potential role for oxidative damage to lipids and proteins. *Shock* 33: 322–331.
- Celes MR, Torres-Dueñas D, Malvestio LM, Blefari V, Campos EC, et al. (2010) Disruption of sarcolemmal dystrophin and beta-dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. *Lab Invest* 90: 531–542.
- Allikian MJ & McNally EM (2007) Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex *Traffic* 8: 177–183.
- Dibb KM, Graham HK, Venetucci LA, Eisner DA, Trafford AW (2007) Analysis of cellular calcium fluxes in cardiac muscle to understand calcium homeostasis in the heart. *Cell Calcium* 42: 503–512.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731–801.
- Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG (2006) Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: Role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 657–662.
- Zhu X, Bernecker OY, Manohar NS, Hajjar RJ, Hellam J, et al. (2005) Increase leakage of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} contributes to abnormal myocyte Ca^{2+} handling and shortening in sepsis. *Crit Care Med* 33: 598–604.
- Radimerski TM, Grisouard J, Timper K, Zulewski H, Christ-Crain M, et al. (2011) Role of calcium in lipopolysaccharide-induced calcitonin gene expression in human adipocytes. *Innate Immunol* 17: 403–413.
- Song SK, Karl IE, Ackerman JJ, Hotchkiss RS (1993) Increased intracellular Ca^{2+} : A critical link in the pathophysiology of sepsis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3933–3937.
- Hassoun SM, Marechal X, Montaigne D, Bouazza Y, Decoster B, et al. (2008) Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction. *Crit Care Med* 36: 2590–2596.
- Anderson SA, Song S-K, Ackerman JJH, Hotchkiss RS (1999) Sepsis increases intracellular free calcium in brain. *J Neurochem* 72: 2617–2620.
- Lee, KS & Tsien, RW (1983) Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nifedipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302: 790–794.
- Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, Ono M, Tateishi H, et al. (2009) Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor. *J Am Coll Cardiol* 53: 1993–2005.
- Celes MR, Torres-Dueñas D, Alves-Filho JC, Duarte DB, Cunha FQ, et al. (2007) Reduction of gap and adherens junction proteins and intercalated disc structural remodeling in the hearts of mice submitted to severe cecal ligation and puncture sepsis *Crit Care Med* 35: 2176–2185.
- Suadicani SO, Vink MJ, Spray DC (2000) Slow intercellular Ca^{2+} signaling in wild-type and *Cx43*-null neonatal mouse cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H3076–3088.
- Suadicani SO, Cherkas PS, Zuckerman J, Smith DN, Spray DC, et al. (2010) Bidirectional calcium signaling between satellite glial cells and neurons in cultured mouse trigeminal ganglia. *Neuron Glia Biol* 6: 43–51.
- Suadicani SO, Flores CE, Urban-Maldonado M, Beelitz M, Scemes E (2004) Gap junction channels coordinate the propagation of intercellular Ca^{2+} signals generated by P2Y receptor activation. *Glia* 48: 217–229.

26. Rossi MA, Carillo SV (1983) Electron microscopic study on the cardiac hypertrophy induced by iron deficiency anaemia in the rat. *Br J Exp Pathol* 64: 373–37.
27. Wang S, Zhou Z, Qian H (2000) Recording of calcium transient and analysis of calcium removal mechanisms in cardiac myocytes from rats and squirrels. *Sci China C Life Sci* 43: 191–199.
28. Piacentino V, Weber CR, Chen X, Weiser-Thomas J, Margulies KB, et al. (2003) Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res* 92: 651–658.
29. Bhattacharyya J, Thompson K, Sayeed MM (1991) Calcium-dependent and calcium-independent protease activities in skeletal muscle during sepsis. *Circ Shock* 35: 117–122.
30. Liu MS, Kang GF (1987) Liver glycogen metabolism in endotoxin shock. II. Endotoxin administration increases glycogen phosphorylase activities in dog livers. *Biochem Med Metab Biol* 37: 73–80.
31. Cottin P, Poussard S, Mornet D, Brustis JJ, Mohammadpour M, et al. (1992) *In vitro* digestion of dystrophin by calcium-dependent proteases, calpains I and II. *Biochimie* 74: 565–570.
32. Armstrong SC, Shivel LC, Ganote CE (2001) Sarcolemmal blebs and osmotic fragility as correlates of irreversible ischemic injury in preconditioned isolated rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 33: 149–60.
33. Smith MW, Phelps PC, Trump BF (1991) Cytosolic Ca²⁺ deregulation and blebbing after HgCl₂ injury to cultured rabbit proximal tubule cells as determined by digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4926–4930.
34. Nicotera P, Hartzell P, Davis G, Orreniu S (2009) The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca²⁺ is mediated by activation of a non-lysosomal proteolytic system. *FEBS Lett* 209:139–144.
35. Elliget KA, Phelps PC, Trump BF (1991) HgCl₂-induced alteration of actin filaments in cultured primary rat proximal tubule epithelial cells labeled with fluorescein phalloidin. *Cell Biol and Toxicol* 3: 263–280.
36. Portbury AC, Willis MS, Patterson C (2011) Tearin'up my heart: Proteolysis in the cardiac sarcomere. *J Biol Chem* 286: 9929–9934.
37. Huang J, Forsberg NE (1998) Role of calpains in skeletal-muscle degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12100–12105.
38. Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X, et al. (1999) Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium dependent mechanism. *FASEB J* 13: 1435–1443.
39. Callahan LA, Supinski GS (2009) Sepsis-induced myopathy. *Crit Care Med* 37: S354–367.
40. Solomon V, Goldberg AL (1996) Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* 271: 26690–26697.
41. Galvez AS, Diwan A, Odley AM, Hahn HS, Osinska H, et al. (2007) Cardiomyopathy degeneration with calpain-deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circ Res* 100: 1071–1078.
42. Kostin S, Pool L, Elsässer A, Hein S, Drexler HC, et al. (2003) Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 92: 715–724.
43. Knöll R, Buyandelger B, Lab M (2011) The sarcomeric Z-disc and Z-discopathies. *J Biomed Biotechnol* doi:10.1155/2011/569628.
44. Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N (2006) The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med* 84: 446–468.
45. Ghadially FN (1975) Ultrastructural Pathology of the Cell. A text atlas of physiological and pathological alterations in cell fine structure. London: Butterworth & Co Ltd, 543 p.
46. Murphy E, Steenbergen C (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 88: 581–609.
47. Danialou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, et al. (2001) Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. *FASEB J* 15: 1655–1657.
48. Lapidus KA, Kakkar R, McNally EM (2004) The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94: 1023–1031.
49. Tidball JG, Wehling-Henricks M (2007) The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* 102: 1677–1686.
50. Wallace GQ, McNally EM (2009) Mechanisms of muscle degeneration, regeneration and repair in the muscular dystrophies. *Annu Rev Physiol* 71: 37–57.
51. Kawada T, Masui F, Tezuka A, Ebisawa T, Kumagai H, et al. (2005) A novel scheme of dystrophin disruption for the progression of advanced heart failure. *Biochim. Biophys Acta* 1751: 73–81.
52. Toyooka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, et al. (2004) Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7381–7385.
53. Sharov VG, Kostin S, Todor A, Schaper J, Sabbah HN (2005) Expression of cytoskeletal, linkage and extracellular proteins in failing dog myocardium. *Heart Fail Rev* 10: 297–303.
54. Hein S, Dimitri S, Fujitani N, Rennollet H, Brand T, et al. (1994) Altered expression of titin and contractile proteins in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1291–1306.