

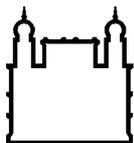
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RESPOSTA FIBROGÊNICA DE FIBROBLASTOS E PROSPECÇÃO DE ALVOS
TERAPÊUTICOS CONTRA A FIBROSE CARDÍACA NA DOENÇA DE CHAGAS

TATIANA ARAÚJO SILVA

Rio de Janeiro
Setembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TATIANA ARAÚJO SILVA

RESPOSTA FIBROGÊNICA DE FIBROBLASTOS E PROSPECÇÃO DE ALVOS
TERAPÊUTICOS CONTRA A FIBROSE CARDÍACA NA DOENÇA DE CHAGAS

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Orientador (es): Prof. Dr. Cláudia Magalhães Calvet

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2019

Silva, Tatiana Araújo.

Resposta fibrogênica de fibroblastos e prospecção de alvos terapêuticos contra a fibrose cardíaca na Doença de Chagas / Tatiana Araújo Silva. - Rio de Janeiro, 2019.

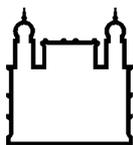
229 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Cláudia Magalhães Calvet - Alvarez.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Fibrose cardíaca. 2. Cardiomiopatia. 3. Citocinas. 4. Vias de sinalização. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TATIANA ARAÚJO SILVA

**RESPOSTA FIBROGÊNICA DE FIBROBLASTOS E PROSPECÇÃO DE ALVOS
TERAPÊUTICOS CONTRA A FIBROSE CARDÍACA NA DOENÇA DE CHAGAS**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Cláudia Magalhães Calvet

Aprovada em: 13/09/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Mariana Caldas Waghbi - Presidente – (IOC, Fiocruz)

Prof. Dr. Maria de Nazaré Correia Soeiro – (IOC, Fiocruz)

Prof. Dr. Emiliano Horácio Medei – (BIOF, UFRJ)

Prof. Dr. Elen Mello de Souza – (IOC, Fiocruz)

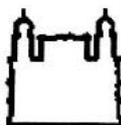
Prof. Dr. Francisca Hildemagna Guedes da Silva – (IBM, UFRJ)

Rio de Janeiro, 13 de setembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Tatiana Araújo Silva**, sob orientação da Dr^a. Claudia Magalhães Calvet, foi aprovada em 13/09/2019, em sua defesa de tese de doutorado intitulada: **“Resposta fibrogênica de fibroblastos e prospecção de alvos terapêuticos contra a fibrose cardíaca na doença de Chagas”**, área de concentração: Biologia. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Mariana Caldas Waghabi - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr^a. Maria de Nazare Correia Soeiro - IOC/FIOCRUZ e Dr. Emiliano Horacio Medei - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr^a. Francisca Hildemagna Guedes da Silva - UFRJ/RJ e Dr^a. Elen Mello de Souza - IOC/FIOCRUZ.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria nº. 2720, de 20.12.89, do Ministério da Educação e Cultura, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 7 (sete) na última avaliação quadrienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, **a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese on line e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 13 de setembro de 2019.


André Luiz Rodrigues Rêque
Matricula SIAPE 1634214

Coordenador Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Dedico essa tese à Deus, a minha família
e ao meu noivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro durante o período de doutorado no Brasil e no doutorado sanduíche, no qual contribuiu para minha formação acadêmica durante o período de 4 anos.

À banca pela aceitação do convite. Todos os comentários levantados pela banca serão relevantes para meu conhecimento e crescimento profissional.

À minha família que sempre foi a minha base para que eu pudesse alcançar os meus sonhos me dando toda força e apoio quando eu mais precisei. Aos meus pais pela compreensão, pelos conselhos, por sempre estar ali com uma palavra de conforto. Aos meus irmãos Felipe e Juliana pelas distrações e compreensões nas horas mais precisas.

Ao meu noivo Luiz Rafael por ser uma pessoa muito especial na minha vida, por ser bastante compreensível, paciente, carinhoso e amoroso. Sua presença na minha vida foi ímpar e me ajudou muito a querer conquistar mais ainda meu lugar ao sol. Obrigada por você existir na minha vida, por me amar e por me fazer imensamente feliz.

À minha orientadora Cláudia Calvet, pelos ensinamentos, pelos conselhos, por sempre acreditar em mim favorecendo sempre o meu crescimento profissional. Agradeço pela oportunidade e confiabilidade de co-orientar um aluno de iniciação científica, pelo suporte que obtive no período do meu doutorado sanduíche dentro e fora do laboratório e pela oportunidade de realizar esse projeto apresentado.

Agradeço imensamente pela orientação durante esses quatro anos, no qual foram essenciais para o meu amadurecimento profissional.

À doutora Mirian Pereira por ser uma chefe muito especial que é capaz de tornar o LUC uma segunda família nas nossas vidas.

Em especial aos meus amigos Amanda Tucci, Liliane Mesquita, que são para mim como irmãs, Guilherme Lechuga e Leonardo Lara. O companheirismo e a amizade são palavras que definem essas pessoas. Agradeço à Amanda e ao Guilherme por ser não apenas companheiros de bancada, mas amigos que levarei para vida toda. Agradeço também por sempre ter me ajudado no laboratório quando mais precisei principalmente com relação aos experimentos. Vocês sempre me socorreram nas horas mais corridas. Agradeço por tudo.

Aos meus colegas de laboratório, Alanderson Nogueira, Dayse Teixeira, Francisco Oliveira, Lorraine Martins, Renata Soares, Tatiana Galvão pela amizade e ajuda que obtive durante esses quatro anos.

Agradeço ao professor Jair Lage de Siqueira-neto e James McKerrow da Universidade da Califórnia em San Diego (UCSD), por terem aceitado me orientar no laboratório Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences durante o meu doutorado sanduíche. Agradeço pela oportunidade e pelos ensinamentos adquiridos no laboratório. Agradeço também ao Ken Hirata, Glória, Brian, Diane, Gareth, Jean, Sung, Lily e Nathan pela amizade, pelo acolhimento, suporte, pela ajuda no laboratório e pelo aprimoramento no inglês. Obrigada por terem feito parte desse momento tão especial na minha vida.

À Julia Medeiros, uma pessoa muito especial que conheci no período do doutorado sanduíche na UCSD. Além de ter sido uma companheira de bancada, hoje é uma grande amiga. A Califórnia me presenteou com a sua amizade. Obrigada por tudo.

Agradeço a secretária da pós-graduação Rita Gomes pela paciência com os alunos, principalmente na reta final da defesa, sendo bastante carinhosa, prestativa e amiga de todos. Obrigada por sempre me socorrer e me acalmar nesse momento tão difícil e estressante.

Agradeço as agências de fomento FIOCRUZ, CAPES, CNPQ e PAPES V pelo custeio do projeto e pela bolsa de doutorado.

“A persistência é o menor caminho do
êxito.” (Charles Chaplin)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESPOSTA FIBROGÊNICA DE FIBROBLASTOS E PROSPECÇÃO DE ALVOS TERAPÊUTICOS CONTRA A FIBROSE CARDÍACA NA DOENÇA DE CHAGAS

RESUMO

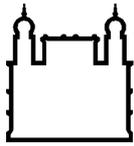
TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Tatiana Araújo Silva

Componentes da matriz extracelular (MEC) acumulam-se no tecido cardíaco durante a doença de Chagas (DC), levando à fibrose. Evidências clínicas revelaram uma correlação do nível de fibrose com o comprometimento do desempenho cardíaco. A redução da carga parasitária durante a fase crônica não melhora o desfecho clínico em pacientes cardíacos, o que sugere que o desenvolvimento de terapias para recuperação da fibrose é necessário em combinação com agentes tripanocidas para promover melhora clínica quando a cardiomiopatia está avançada. Os objetivos do nosso estudo são: i) avaliar a participação de TGF- β , TNF- α e IFN- γ na regulação da expressão de componentes de MEC em culturas de fibroblastos cardíacos (FC) normais e infectadas com *T. cruzi*; ii) analisar vias de sinalização que participam no processo de remodelamento tecidual; iii) identificar inibidores do acúmulo de colágeno induzida pelo *T. cruzi* no coração através da triagem de compostos anti-fibrose em culturas de fibroblastos cardíacos humanos (FCh). Nossos dados revelaram um aumento na expressão de fibronectina e colágeno na MEC em FC normais e infectados com *T. cruzi*, após o estímulo com TGF- β , TNF- α e IFN- γ . O estímulo na expressão de fibronectina e colágeno ocorreu junto com disparo nas vias de sinalização de c-Jun e p38 após infecção pelo *T. cruzi* e tratamento com citocinas, enquanto houve uma redução de Smad 2 fosforilada após tratamento com TGF- β em culturas infectadas. Ainda, em culturas de FC infectadas e estimuladas com citocinas pró-inflamatórias, foi observado um aumento na fosforilação de p38 MAPK e c-Jun. Para estabelecer ensaios de triagem de compostos anti-fibrose, utilizamos o corante Sirius Red/Fast green como leitura para quantificar tanto a expressão do colágeno e a quantidade de proteínas totais, avaliando a citotoxicidade. Analisamos o efeito de inibidores de TGF- β (pirfenidona) e de vias de sinalização da família MAPK, p38 (losmapimod) e c-Jun (SP600125), assim como análogos de glicosaminoglicanos (GAG's) na modulação da infecção e da deposição de colágeno na MEC em FCh. Em culturas de FCh, a infecção por *T. cruzi* e soro de camundongos infectados acarretam em um aumento significativo na expressão de colágeno. Identificamos um efeito anti-

fibrótico para Pirfenidona (inibidor de TGF- β e TNF- α , IC50 114,3 μ M), Losmapimod (inibidor p38, IC50 17,6 μ M) e SP600125 (inibidor c-Jun, IC50 3,9 μ M). Este efeito é independente da proliferação da FC, uma vez que estes compostos não afetam a multiplicação da célula hospedeira induzida pelo *T. cruzi* medida pela incorporação de BrdU. Os derivados da heparina foram capazes de inibir o acúmulo de colágeno por um duplo efeito na proliferação da FC e na redução da carga parasitária. Ensaio in vivo de infecção crônica com *T. cruzi* mostraram redução de colágeno no coração por pirfenidona. Estes resultados propõem uma nova abordagem para a terapia de fibrose em DC, com a perspectiva de possíveis novos tratamentos para reduzir a síntese excessiva de proteínas da MEC durante a infecção por *T. cruzi*.

Palavras-chave: Citocinas, Fibrose; Vias de sinalização; Cardiomiopatia.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

FIBROGENIC RESPONSE OF FIBROBLAST AND THERAPEUTIC TARGET PROSPECTION AGAINST HEART FIBROSIS IN CHAGAS DISEASE

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Tatiana Araújo Silva

Extracellular matrix (ECM) components accumulate in cardiac tissue during Chagas disease (CD), leading to fibrosis. Clinical evidence revealed a correlation of fibrosis levels with impaired cardiac performance. Reducing parasitic burden during the chronic phase does not improve clinical outcome in cardiac patients, suggesting that the development of fibrosis recovery therapies is necessary in combination with trypanocidal agents to promote clinical improvement when cardiomyopathy is advanced. The aims of our study are: i) evaluate the participation of TGF- β , TNF- α and IFN- γ in regulating the expression of ECM components in normal and *T. cruzi* infected cardiac fibroblast (CF) cultures; ii) analyze signaling pathways that participate in the process of tissue remodeling; iii) identify inhibitors of *T. cruzi*-induced collagen accumulation in the heart by screening anti-fibrosis compounds in human cardiac fibroblast (hCF) cultures. Our data revealed an increase in fibronectin and collagen expression in ECM in normal and *T. cruzi*-infected CF following stimulation with TGF- β , TNF- α , and IFN- γ . Stimulation of fibronectin and collagen expression occurred along with triggering of c-Jun and p38 signaling pathways following *T. cruzi* infection and cytokine treatment, while there was a reduction in phosphorylated Smad 2 following TGF- β treatment in infected cultures. Also, in CF cultures infected and stimulated with proinflammatory cytokines, an increase in p38 MAPK and c-Jun phosphorylation was observed. To establish screening assays for anti-fibrosis compounds, we used Sirius Red / Fast green dye as a reading to quantify both collagen expression and total protein amount, assessing cytotoxicity. We analyzed the effect of inhibitors of TGF- β (pirfenidone) and MAPK family signaling pathways, p38 (losmapimod) and c-Jun (SP600125), as well as glycosaminoglycan analogs (GAG's) on modulation of infection and collagen deposition. at ECM in hCF. In hCF cultures, *T. cruzi* infection and serum from infected mice result in a significant increase in collagen expression. We identified an anti-fibrotic effect for Pirfenidone (TGF- β and TNF- α inhibitor, IC₅₀ 114.3 μ M), Losmapimod (p38 inhibitor, IC₅₀ 17.6 μ M) and SP600125 (c-Jun inhibitor, IC₅₀ 3.9 μ M). This effect is independent of CF proliferation since these compounds do not affect

T. cruzi-induced host cell multiplication as measured by BrdU incorporation. Heparin derivatives were able to inhibit collagen accumulation by a double effect on hCF proliferation and parasite load reduction. *In vivo* assays of chronic infection with *T. cruzi* have shown a reduction in heart collagen by pirfenidone. These results propose a new approach to fibrosis therapy in CD, with the prospect of possible new treatments to reduce ECM protein synthesis during *T. cruzi* infection.

Keywords: Cytokines, Fibrosis; Signaling Pathway; Cardiomyopathy.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas.....	1
1.1.1 Agente etiológico, ciclo de vida, transmissão e epidemiologia.....	1
1.2 Formas clínicas da doença.....	4
1.2.1 Fase aguda.....	4
1.2.2 Fase crônica.....	5
1.3 Tratamento na doença de Chagas.....	6
1.4 Principais mecanismos patogênicos da doença de Chagas.....	7
1.4.1 Persistência do parasito.....	7
1.5 Citocinas que participam do processo inflamatório: TGF-β, TNF-α e IFN-γ.....	8
1.5.1 TGF- β	8
1.5.2 TNF- α	10
1.5.3 IFN- γ	14
1.5.4 TGF- β , TNF- α e IFN- γ na doença de Chagas.....	16
1.6 Matriz extracelular e fibrose na doença de Chagas.....	19
1.6.1 Matriz extracelular.....	19
1.6.1.1 Fibronectina.....	20
1.6.1.2 Colágeno.....	23
1.6.1.3 Glicosaminoglicanos (GAG's).....	28
1.7 Fibroblastos cardíacos (FC).....	31
1.8 Fibrose cardíaca.....	34
1.9 Fibrose cardíaca na doença de Chagas.....	36
1.10 Terapia anti-fibrose: Alvos potenciais para intervenção contra fibrose cardíaca na doença de Chagas.....	37
1.11 Justificativa.....	39

2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivo Geral.....	43
2.2	Objetivos Específicos	43
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	Cultura primária, manutenção das cepas de parasitos e linhagens celulares.....	45
3.1.1	Cultura primária de cardiomiócitos	45
3.1.2	Cultura primária de fibroblastos cardíacos.....	45
3.1.3	Cultivo de linhagens celulares	46
3.1.4	Parasitos e infecção das culturas	46
3.2	Tratamento <i>in vitro</i> com citocinas.	47
3.2.1	Ensaio para análise de proteínas de matriz extracelular.....	47
3.2.2	Ensaio para análise de proteínas de sinalização de SMAD e MAPK.....	48
3.2.3	Imunofluorescência indireta	49
3.2.4	Extração de proteínas	50
3.2.5	Dosagem de proteínas.....	50
3.2.6	<i>Western Blotting</i>	51
3.2.7	Quantificação de colágeno em fibroblastos cardíacos de cultura primária	51
3.2.8	Proliferação de fibroblastos cardíacos de cultura primária.....	52
3.3	Triagem de compostos anti-fibrose <i>in vitro</i> em fibroblastos cardíacos humanos imortalizados.....	53
3.3.1	Cultura de fibroblastos cardíacos humanos imortalizados.....	53
3.3.2	Obtenção de meio condicionado por <i>T. cruzi</i> contendo microvesículas e lisado do parasito.....	53
3.3.3	Obtenção de soro de camundongo normal e infectado.....	54
3.3.4	Efeito de análogos de glicosaminoglicanos sobre síntese e expressão de colágeno em FCh durante interação com <i>T. cruzi</i>	54

3.3.5	Efeito parácrino do meio condicionado do parasito na matriz extracelular - colágeno.....	56
3.3.6	Efeito parácrino do meio condicionado do parasito na matriz extracelular - fibronectina.....	57
3.3.7	Efeito de inibidores de vias de sinalização e GAG's sobre síntese e expressão colágeno em fibroblastos cardíacos humanos imortalizados durante interação com <i>T. cruzi</i>	57
3.3.8	Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos tratados com inibidores de vias de sinalização e GAG's.....	58
3.3.9	Efeito dos inibidores de vias de sinalização e GAG's sobre a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	58
3.4	Triagem de compostos anti-fibrose em modelo de infecção crônica pelo <i>T. cruzi in vivo</i>.	59
3.4.1	Animais para ensaios <i>in vivo</i>	59
3.4.2	Ensaio <i>in vivo</i> da atividade de compostos contra fibrose durante infecção experimental por <i>T. cruzi</i>	59
3.4.3	Ecocardiograma.....	62
3.4.4	Extração de DNA e PCR quantitativo	62
3.4.5	Histologia.....	62
3.4.6	Extração de proteínas.....	63
3.4.7	<i>Western Blotting</i>	63
4	RESULTADOS	67
4.1	Expressão de fibronectina em cardiomiócitos e purificação de fibroblastos cardíacos	67
4.2	Modulação da distribuição espacial de fibronectina em diferentes tipos celulares após estímulo com TGF-β	69
4.3	Vias de sinalização em FC após o estímulo com TGF-β	71
4.4	Expressão de fibronectina em fibroblastos cardíacos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e estimulados pelo TGF-β	75
4.5	Regulação positiva de FN em fibroblastos cardíacos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	79

4.6	Regulação da rede fibrilar de fibronectina após a infecção pelo <i>T. cruzi</i>	80
4.7	Estímulo com TGF- β em culturas de fibroblastos cardíacos não afeta os níveis de infecção pelo <i>T. cruzi</i>	84
4.8	A infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> resulta em quebra do citoesqueleto em fibroblastos cardíacos	85
4.9	Vias de sinalização envolvidas na modulação de MEC disparada pela infecção do fibroblasto cardíaco por <i>T. cruzi</i>	87
4.10	Detecção de SMAD 2 fosforilada em fibroblastos cardíacos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	90
4.11	Proliferação de fibroblastos cardíacos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e estimulados com TGF- β	92
4.12	Expressão de fibronectina em fibroblastos cardíacos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e estimulados com TNF- α e IFN- γ	94
4.13	Expressão de colágeno em cultura de fibroblastos cardíacos	97
4.14	Vias de sinalização MAPK em cultura primária de fibroblastos cardíacos estimulados com TNF- α e IFN- γ	99
4.15	Proliferação de fibroblastos cardíacos estimulados com TNF- α e IFN- γ	102
4.16	Efeito da infecção pelo <i>T. cruzi</i> e de inibidores de vias de sinalização na expressão de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos (FCh).....	105
4.17	Depósito de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos (FCh) estimulados com meio condicionado e lisado do parasito.....	107
4.18	Efeito dos compostos e glicosaminoglicanos na expressão de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos infectados com <i>T. cruzi</i>	109
4.19	Efeito dos compostos e GAG's na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	114
4.20	Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos.....	118
4.21	Ecocardiograma.....	122
4.22	Carga parasitária no tecido cardíaco em C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i>	124

4.23 Depósito de colágeno em tecido cardíaco de camundongos C57Bl/6 infectados pelo <i>T. cruzi</i>	125
5 DISCUSSÃO	130
6 CONCLUSÃO	147
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
8 ANEXOS	176

ÍNDICE DE FIGURAS

1 – INTRODUÇÃO

Figura 1.1 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> nos hospedeiros invertebrado e vertebrado.....	2
Figura 1.2 – Cenário epidemiológico atual da doença de Chagas com a expansão da doença para países não-endêmicos.....	4
Figura 1.3 - Receptores de TGF- β ativam vias de sinalização canônica (SMAD) e não-canônica (MAPK).	10
Figura 1.4 – TNF associado à membrana (memTNF) e TNF solúvel (sTNF) se ligam a dois membros da superfamília de receptores TNF-R1 e TNF-R2.....	11
Figura 1.5 – Ativação de p38MAPK e JNK induzidos por TNF- α	13
Figura 1.6 – Via clássica de sinalização do IFN- γ	15
Figura 1.7 – Matriz extracelular.....	19
Figura 1.8 – Molécula de fibronectina e suas regiões.....	21
Figura 1.9 – Estrutura típica de uma molécula de colágeno.....	24
Figura 1.10 – Formação da fibra de colágeno.....	25
Figura 1.11 – Colágeno FACITs associados com fibrilas.....	28
Figura 1.12 – Molécula de Glicosaminoglicano.....	28
Figura 1.13 - Estruturas de dissacarídeos repetidos de diferentes glicosaminoglicanos.....	30
Figura 1.14 – Origem do fibroblasto cardíaco.....	32
Figura 1.15 – Funções do fibroblasto cardíaco.....	33
Figura 1.16 – Fibrose intersticial em tecido cardíaco.....	35
Figura 1.17 – Tipos de fibrose cardíaca.....	36

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Figura. 3.1 – Desenho experimental em fibroblastos cardíacos.....	47
Figura. 3.2 – Desenho experimental em mioblastos esqueléticos L6E9.....	48
Figura. 3.3 – Estrutura química de heparina e oligossacarídeos derivados de heparina e GAG's	56
Figura. 3.4 – Ensaio experimental <i>in vivo</i> com diferentes compostos.....	61

4 – RESULTADOS

Figura 4.1 – Depósito de fibronectina em cardiomiócitos e purificação de fibroblastos cardíacos.....	68
Figura 4.2 – O TGF- β modula diferencialmente FN em cardiomiócitos, mioblastos esqueléticos L6E9 e fibroblastos cardíacos não infectados.....	70
Figura 4.3 – Detecção SMAD 2 e p38MAPK fosforilada em culturas não infectadas.....	73

Figura 4.4 – Depósito de fibronectina em mioblastos esqueléticos L6E9 e fibroblastos cardíacos estimulados com TGF- β	77
Figura 4.5 – Depósito de FN em fibroblastos cardíacos após tratamento com inibidor SB431542.....	79
Figura 4.6 – Distribuição de fibronectina em mioblastos esqueléticos L6E9 infectados com <i>T. cruzi</i> e estimulados com TGF- β	82
Figura 4.7 – Distribuição de fibronectina em fibroblastos cardíacos infectados pelo <i>T. cruzi</i> e estimulados com TGF- β	83
Figura 4.8 – Quantificação dos níveis de infecção em fibroblastos cardíacos pelo <i>T. cruzi</i>	84
Figura 4.9 – Modulação do citoesqueleto de actina em fibroblastos cardíacos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	86
Figura 4.10 – Detecção de PS2, p-p38 MAPK e p-c-Jun em fibroblastos cardíacos normais e infectados com <i>T. cruzi</i>	88
Figura 4.11 – Detecção de SMAD 2 fosforilada em fibroblastos cardíacos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
Figura 4.12 – Proliferação de fibroblastos cardíacos estimulados com TGF- β	92
Figura 4.13 – Depósito de fibronectina em cultura de fibroblastos cardíacos estimulados com TNF- α e IFN- γ	95
Figura 4.14 – Depósito de colágeno em cultura primária de fibroblastos cardíacos	98
Figura 4.15 – Detecção de p38 MAPK fosforilada em cultura primária de fibroblastos cardíacos.....	100
Figura 4.16 – Detecção de c-Jun fosforilada em cultura primária de fibroblastos cardíacos.....	101
Figura 4.17 – Proliferação de fibroblastos cardíacos estimulados com TNF- α e IFN- γ	103
Figura 4.18 – <i>T. cruzi</i> modula expressão de colágeno e inibidores de sinalização inibem estímulo de colágeno.....	106
Figura 4.19 – Meio condicionado pelo parasito e lisado do <i>T. cruzi</i> estimulam MEC em FCh.....	108
Figura 4.20 – Inibição de colágeno em FCh infectados pelo <i>T. cruzi</i>	111
Figura 4.21 – Inibição de colágeno em FCh estimulados com MCP e TCL.....	112
Figura 4.22 – Efeito de diferentes compostos em FCh infectados pelo <i>T. cruzi</i>	115
Figura 4.23 – Atividade antiparasitária em FCh infectados pelo <i>T. cruzi</i> , tratados com diferentes compostos.....	116
Figura 4.24 – Ação de GAG's na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	117
Figura 4.25 – Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos.....	119
Figura 4.26 – Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos tratados com GAG's.....	120

Figura 4.27 – Ecocardiograma em camundongos C56BL/6 infectados pelo <i>T. cruzi</i>	123
Figura 4.28 – Carga parasitária no tecido cardíaco.....	124
Figura 4.29 – Análise de colágeno no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com <i>T. cruzi</i>	126
Figura 4.30 – Depósito de colágeno I em corações de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i>	128

5 – DISCUSSÃO

Figura. 5.1 – Rede de compostos: pirfenidona, losmapimod e SP600125.....	139
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Glicosaminoglicanos e seus análogos.....	54
Tabela 4.1 – Ação de glicosaminoglicanos na expressão de colágeno em FCh infectados pelo <i>T. cruzi</i>	113

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BENEFIT – Sigla em inglês para Avaliação do Benzonidazol para Interromper a Tripanossomíase.

BSA – Sigla em inglês para Albumina de soro bovino.

BrdU – Sigla em inglês para 5-bromo-2'deoxiridina – análogo de Timina.

CC₅₀: Concentração citotóxica para 50% das células.

CCC – Cardiomiopatia chagásica crônica.

C-Jun – Quinase N-terminal.

DABCO – 1,4 - diazabicyclo- (2,2,2)- octano.

DAPI – 4',6'-diamino-2-fenil-indol.

Dpi – dia após a infecção.

DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco's.

EC₅₀ – Concentração que o composto induz em 50% o efeito máximo.

ECG – Eletrocardiograma.

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético.

EGTA – Ácido etilenoglicol-bis(β-aminoetil)-N,N,N',N'-tetra-acético.

FC – Fibroblasto cardíaco.

FCh – Fibroblasto cardíaco humano.

FN – Fibronectina.

GAG's – Glicosaminoglicanos.

IFN-γ – Interferon-gama.

kDNA – DNA no Cinetoplasto.

MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos.

memTNF – TNF transmembrana.

MC – Músculo Cardíaco.

MEC – Matriz Extracelular.

mL – Mililitro.

PBS – Tampão fosfato com salina.

PCR – Reação de cadeia em polimerase.

PFA – Paraformaldeído.

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil.

q.s.p. – quantidade suficiente para.

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*.

sTNF – TNF solúvel.

TBST – Tampão tris com salina e detergente tween 20.

TNF- α – Fator de necrose tumoral α .

TRITC – Isotiocianato de tetrametilrodamina

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 – Doença de Chagas.

1.1.1– Agente etiológico, ciclo de vida, transmissão e epidemiologia.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas. É um protozoário hemoflagelado digenético pertencente a ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidea*, (Bonney, 2014; Pérez-Molina and Molina, 2018). O parasito apresenta três formas evolutivas durante seu ciclo biológico: formas tripomastigota (metacíclicas e sanguíneas), epimastigota e amastigota, sendo estas diferenciadas pela posição do flagelo, cinetoplasto e núcleo (Coura, José Rodrigues and Borges-Pereira, 2010; Pérez-Molina and Molina, 2018).

O *T. cruzi* possui ciclo de vida complexo porque possui a capacidade de infectar o vetor, hospedeiros vertebrados como os animais silvestres e o homem. O triatomíneo (barbeiro) é encontrado em áreas silvestres, peridomiciliares e domiciliares e torna-se infectado quando se alimenta do sangue de animais ou o homem infectado com *T. cruzi* (Coura, José Rodrigues and Borges-Pereira, 2010; Coura, 2015).

Após o repasto sanguíneo, o vetor defeca no local da picada contendo fezes/urina contaminadas com o parasito. Formas tripomastigotas metacíclicas estão presentes nas fezes contaminadas e estes são internalizados no hospedeiro através de fissuras ou de mucosas com lesões oculares. Uma vez internalizado, o parasito alcança células próximas como o macrófago, e se diferencia na forma amastigota, que são formas proliferativas do parasito. Formas amastigotas então se multiplicam por fissão binária e, após sucessivas divisões, se diferenciam novamente para a forma tripomastigota onde são liberados para a corrente sanguínea podendo alcançar células adjacentes ou tecidos mais distantes. Por sua vez, o triatomíneo ao se alimentar do hospedeiro infectado, ingere formas tripomastigotas sanguíneas onde no intestino médio, se diferenciam para formas epimastigotas, que são formas proliferativas no inseto vetor. Após a multiplicação por fissão binária, no intestino posterior, formas epimastigotas se diferenciam para tripomastigotas metacíclicas. Após o repasto sanguíneo, o vetor elimina então nas fezes essas formas do parasito dando continuidade ao ciclo biológico do *T. cruzi* (Figura.1.1) (Bern, 2015; Pérez-Molina and Molina, 2018) .

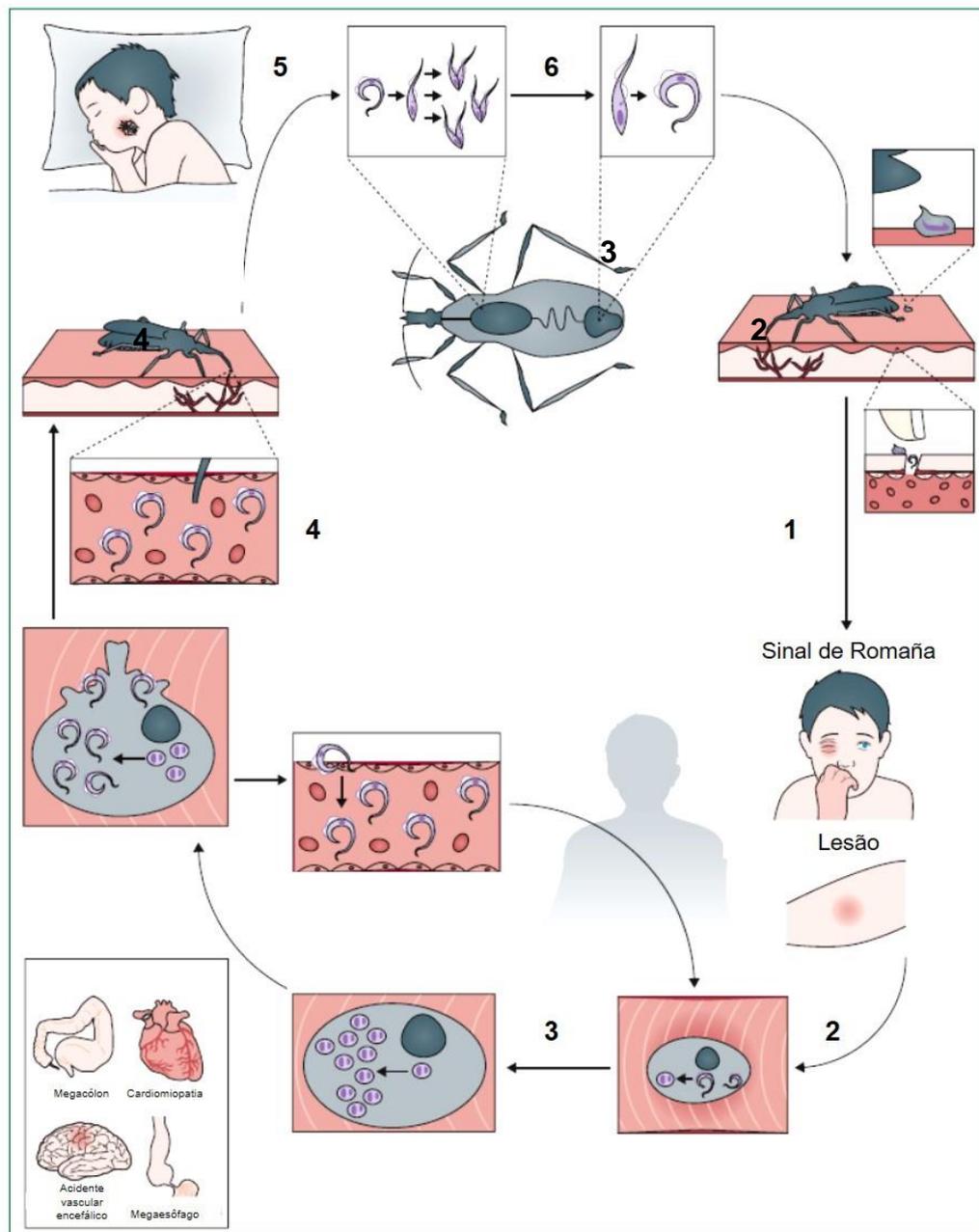


Figura. 1.1 – Ciclo de vida do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrado e vertebrado. 1) O vetor triatomíneo defeca no local da picada depositando fezes/urina contendo formas tripomastigotas metacíclicas. 2) Formas tripomastigotas metacíclicas penetram no hospedeiro através de fissuras na pele ou mucosas, e invadem células próximas ao local de inoculação, como macrófagos, diferenciando-se em formas amastigotas intracelulares que são formas proliferativas do parasito. 3) Formas amastigotas multiplicam-se e após sucessivas divisões, o parasito se diferencia novamente para forma tripomastigota sendo liberado para a corrente sanguínea, podendo assim infectar células em tecidos mais distantes. 4) O inseto vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas durante alimentação. 5) No intestino médio do triatomíneo, formas tripomastigotas diferenciam-se para epimastigotas, formas proliferativas no inseto vetor. 6) Após sucessivas divisões, formas epimastigotas diferenciam em tripomastigotas metacíclicas e, ao realizar uma nova alimentação, o vetor pode reinfestar novos hospedeiros, dando continuidade ao ciclo biológico do parasito (Pérez-Molina and Molina, 2018).

A transmissão natural do parasito ocorre através de vetores triatomíneos, principalmente do gênero *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. (Browne et al., 2017; Ortí-Lucas et al., 2014). Com a Iniciativa Cone Sul, visando a erradicação do vetor *T. infestans*, Uruguai, Chile e Brasil foram declarados livres de transmissão vetorial via

T. infestans pela Organização Pan-Americana da Saúde em 1997, 1999 e 2006, respectivamente (Coura, 2015). No Brasil e em outros países da América Latina, os bancos de sangue são controlados para contaminação pelo *T. cruzi*. No entanto, países como a Bolívia ainda apresentam um grande problema com relação ao controle nos seus bancos de sangue, já que metade dos seus doadores podem estar infectados com o *T. cruzi* (Coura, 2013).

A forma de transmissão do *T. cruzi* através das fezes/urina do triatomíneo ainda continua sendo a forma mais prevalente para o hospedeiro humano. A transmissão do parasito também pode ocorrer por transfusão sanguínea; via oral, através da ingestão de comidas e bebidas (como o açaí e o caldo de cana-de-açúcar) contaminados com as fezes do parasito; transplante de órgãos, com a presença do parasito nos tecidos; via congênita com a passagem do parasito pela placenta; acidentes laboratoriais; ingestão de leite materno contaminado e mais recentemente descrito por relações sexuais pelo o contato do homem com a mulher infectada no período menstrual (Cardoso et al., 2018; Filigheddu et al., 2017; Rios et al., 2018).

A doença de Chagas é tradicionalmente descrita como endêmica no continente americano, acometendo países da América Central até a América do Sul. Dentre os países latino americanos, 21 destes são endêmicos para a doença de Chagas (Steverding, 2014). Estima-se que 7-8 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* na América Latina e cerca de 25 milhões de pessoas estejam sob áreas de risco para a doença de Chagas (Pérez-Molina and Molina, 2018).

Inicialmente, o cenário epidemiológico da doença se concentrava nos países da América Central e do Sul. A doença de Chagas por ser uma doença negligenciada, afeta a população que vive em ambientes rurais, sob condições de pobreza. Com a instalação do homem nas áreas rurais, o triatomíneo se adaptou ao ambiente doméstico. Locais como rachaduras das paredes das casas de barro e até mesmo telhados servem como abrigo para esses insetos vetores. A presença de animais peridomiciliares também atua como reservatório para o parasito e infecção do triatomíneo através do repasto sanguíneo (Dias et al., 2016). No entanto, a intensa urbanização da população que vivia em áreas rurais tem tornado a doença de Chagas um grande problema urbano, médico e social, introduzindo assim novos riscos de transmissão do parasito nas áreas não-endêmicas, principalmente através da transfusão de sangue (Echeverria and Morillo, 2019)

Atualmente, a doença de Chagas possui um novo quadro epidemiológico apresentando um desafio econômico, político e social. Imigrantes portadores da

doença de Chagas acabam carreando o parasito de regiões endêmicas para países não-endêmicos. Países como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e países europeus como a Espanha, Bélgica, França, Itália, Inglaterra e Suíça, apresentam numerosos casos de pacientes infectados com *T. cruzi* (Figura. 1.2) (Lidani et al., 2019). Devido à ausência do vetor nesses países não-endêmicos, a ingestão de alimentos contaminados, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão vertical da mãe para o filho e acidentes laboratoriais têm sido formas mais diretas de transmissão (Coura, José Rodrigues and Borges-Pereira, 2010). Esse quadro de infecção apresentado mundialmente mostra que é preciso melhorar o sistema de vigilância em países não-endêmicos, com controles nos bancos de sangue e de transplante de órgãos, incluir um diagnóstico diferencial para a doença de Chagas, e interceptar a transmissão vertical (Bello Corassa et al., 2017; Carlos et al., 2011). Com uma prevalência de 300.000 casos e relatos de transmissão autóctone nos EUA, a triagem para a infecção pelo *T. cruzi* em bancos de sangue já é realizada nos EUA desde 2007 (Bello Corassa et al., 2017; Carlos et al., 2011).

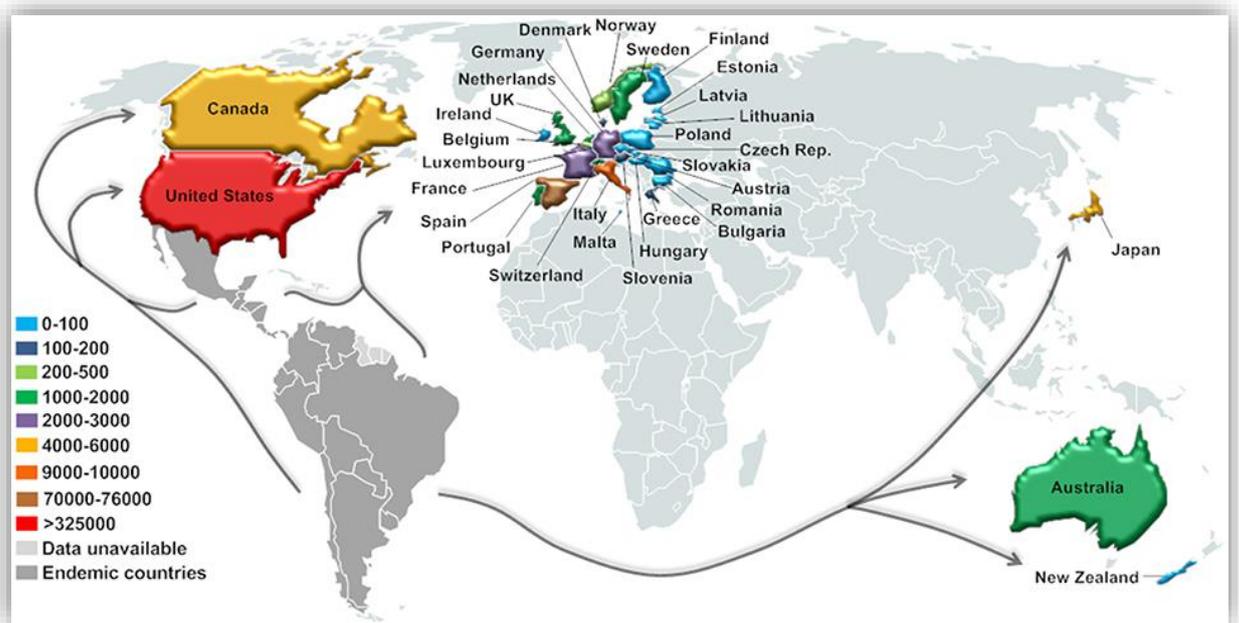


Figura. 1.2 – Cenário epidemiológico atual da doença de Chagas com a expansão da doença para países não-endêmicos (Lidani et al., 2019).

1.2 – Formas clínicas da doença.

1.2.1 – Fase aguda

Após a exposição ao *T. cruzi*, células do infiltrado inflamatório são acionadas para conter a infecção instalada no organismo. De acordo com as manifestações clínicas, a doença de Chagas apresenta duas fases, aguda e crônica. A fase aguda

pode ser assintomática (na maioria dos casos reportados) ou sintomática (Andrade et al., 2014; Kalil-Filho, 2015). Se não houver o tratamento para a eliminação do parasito ou se o tratamento não surtir efeito nesse período, o quadro clínico progride para a fase crônica (Rassi et al., 2017). O paciente pode apresentar um quadro indeterminado (sendo este latente ou pré-clínico) com evidência de infecção pelo *T. cruzi* (com testes sorológicos positivos baseado na presença de anticorpos circulantes para o parasito), porém sem manifestações clínicas no trato digestivo ou cardíaco, sem alterações eletrocardiográficas (ECG). No entanto, o paciente na forma indeterminada pode permanecer nesse quadro por toda vida ou após 10 a 30 anos, desenvolvem a forma crônica sintomática da doença de Chagas (Issa, 2018; Pérez-Molina and Molina, 2018).

A fase aguda representa o primeiro contato do parasito com o hospedeiro, com a presença de células imunológicas contra o patógeno. A fase aguda dura em torno de 4-8 semanas, e nesse período, o paciente pode vir a desenvolver sintomas que acabam sendo confundidos com outras patologias como febre, inflamação no local de inoculação, edema bi palpebral unilateral, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (Bestetti et al., 2017; Simões et al., 2018). Formas mais graves também podem ocorrer (em torno de 5-10% dos casos) na fase aguda com o desenvolvimento de miocardite aguda, ejeção pericárdica e meningoencefalite, levando a mortalidade de indivíduos infectados com *T. cruzi* na fase aguda da doença de Chagas (Kalil-Filho, 2015). A fase aguda geralmente se resolve espontaneamente.

1.2.2 – Fase crônica

Em torno de 10-15% dos pacientes desenvolvem formas digestivas da doença de Chagas, apresentando megacólon e megaesôfago. Cerca de 30-40% dos pacientes crônicos desenvolvem anormalidades no coração como bradiarritimias e taquiarritimias, aneurisma apical, falha cardíaca, tromboembolismo, que podem levar a morte súbita (Garg et al., 2018; Tarleton, 2016).

Pacientes crônicos que desenvolvem a forma cardíaca, desenvolvem uma cardiomiopatia adquirida com infiltrado inflamatório presente no tecido, parasitemia circulante reduzida, baixa carga parasitária no tecido e o desenvolvimento de uma fibrose intersticial intensa e extensiva no miocárdio, sendo chamada de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (Bestetti et al., 2017; Pinazo et al., 2015). A cardiomiopatia é a manifestação sintomática mais importante na doença causando grandes impactos sociais e econômicos tanto no Brasil como em outros países endêmicos devido à alta

morbidade e mortalidade (Rassi et al., 2017a; Rassi and Marin-Neto, 2010). O aumento de infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco ocorre em concomitância com a liberação de citocinas tais como: interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) e quimiocinas favorece tanto a migração de células imunológicas para o local da injúria como o aumento da deposição de componentes de matriz extracelular, promovendo o remodelamento e a cicatrização tecidual (Kong et al., 2014).

1.3 – Tratamento na doença de Chagas.

Atualmente, dois compostos estão disponíveis no mercado para o tratamento de pacientes portadores da doença de Chagas, o nifurtimox e o benzonidazol. São compostos nitroheterocíclicos, respectivamente desenvolvidos pela Bayer, em 1965 e pela Roche em 1971 (Lepesheva, 2013; Sales et al., 2017). Os compostos apresentam eficácia variável quanto a diferentes DTU's de *T. cruzi* existentes já que existem algumas cepas do parasito naturalmente resistentes a ambas os compostos, o que acaba acarretando em uma diminuição na taxa de cura em pacientes portadores da doença de Chagas que recebem o tratamento (Sales et al., 2017).

O benzonidazol possui uma eficácia maior e é melhor tolerado em crianças infectadas com *T. cruzi* quando comparados a adultos, apresentando uma taxa de 71% de cura terapêutica (Duschak, 2016). No entanto, o benzonidazole é o medicamento mais indicado para o tratamento em que, por mais que apresente sérios efeitos colaterais, ainda assim comparado com o nifurtimox, apresenta uma baixa incidência de efeitos adversos em um espaço curto de tempo de duração de tratamento (Forsyth et al., 2016; Müller Kratz et al., 2018).

A administração do benzonidazol e nifurtimox causam sérios efeitos colaterais em pacientes infectados, especialmente em adultos, como a anorexia, dor de cabeça, vômitos, perda de peso, insônia, mialgia, manifestações cutâneas (dermatites), edemas generalizados, febre, depressão da medula óssea, trombocitopenia, polineuropatias periféricas e perturbações no trato digestivo, que podem levar a uma descontinuação do medicamento (Diniz et al., 2013).

O projeto BENEFIT (sigla em inglês para Avaliação do Benzonidazol para Interromper a Tripanossomíase) avaliou a eficácia do tratamento com Benzonidazol durante a fase crônica da doença de Chagas, tendo sido realizado por diferentes organizações internacionais e de forma multicêntrica (Diniz et al., 2013; Marin-neto et al., 2009; Rassi et al., 2017) p. No estudo foi visto que pacientes pertencentes ao grupo placebo e aqueles que eram tratados com benzonidazol (quase três mil

pacientes), 17% a 18% morreram em um período de cinco anos, a maioria das complicações cardíacas. Se extrapolarmos da estimativa da OMS, isso significa que aproximadamente 200.000 pessoas podem vir ao óbito através da cardiomiopatia chagásica nos próximos cinco anos. A maioria dos pacientes que desenvolvem CCC não possuem acesso ao diagnóstico e ao tratamento e pouco é investido na pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos, ou até mesmo vacina, para a cura de pacientes portadores da doença de Chagas. Como resultado do estudo, o projeto BENEFIT e revelou que comparado com o grupo placebo, pacientes tratados com benzonidazol apresentaram uma redução na carga parasitária porém o tratamento com o composto não resultou em uma melhora nos resultados clínicos cardíacos (Meeks et al., 2015; Pecoul et al., 2016).

1.4 - Principais mecanismos patogênicos da doença de Chagas.

1.4.1 – Persistência do parasito.

Atualmente, é consenso de que a CCC está associada com a persistência do *T. cruzi* no miocárdio na fase crônica da doença (Marin-Neto et al., 2007; Zhang and Tarleton, 1999). O parasito é frequentemente encontrado em células do músculo liso em pacientes cronicamente infectados com a presença do parasito na corrente sanguínea avaliado por PCR. (Gutierrez et al., 2009; Teixeira et al., 2011). Na fase crônica da doença, ninhos de amastigota no tecido cardíaco não são facilmente visualizados mas podem coexistir no tecido do hospedeiro, mesmo após o tratamento com drogas tripanocidas, e são detectado por PCR (Andrews, 2013).

O *T. cruzi* apresenta diferentes estratégias de escape que permitem sua entrada em fagócitos, persistência e estabelecimento de infecção crônica, o que resulta no desenvolvimento de CCC. O potente estímulo imunológico gerado pela persistência do *T. cruzi* (através da produção de TNF- α , IFN- γ , ROS, NO, iNOS por células fagocitárias) pode resultar em dano tecidual e o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (De Bona et al., 2018). A persistência do parasito que ocorre em associação a esses mecanismos, favorecendo o desenvolvimento do dano cardíaco que pode ser observado em pacientes portadores da doença de Chagas (Maya et al., 2010).

1.5 – Citocinas que participam do processo inflamatório: TGF- β , TNF- α e IFN- γ .

1.5.1 – TGF- β

O fator transformador do crescimento β é uma citocina que está envolvida em diversos processos biológicos e fisiológicos, desde a embriogênese até a homeostase do tecido adulto. Dentre as principais funções, o TGF- β atua no controle da proliferação e diferenciação celular, apoptose, síntese de componentes de matriz extracelular e controle da resposta imunológica. A desregulação da transdução do sinal disparado pelo TGF- β está associada ao desenvolvimento de doenças humanas, como o câncer e a fibrose (Morikawa et al., 2016). O TGF- β é uma proteína de peso molecular de 25kDa, que possui atividade pleiotrópica e pertence a uma superfamília de citocinas que incluem TGF β s, proteínas morfogênicas do osso (BMP's), activinas, inibinas, nodal, hormônio anti-Mülleriano (AMH) e fatores de crescimento e diferenciação (GDFs). Essas citocinas são altamente conservadas ao longo da evolução e são encontradas em todos os organismos multicelulares (Akhurst and Hata, 2012).

O TGF- β apresenta três isoformas altamente homólogas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, que são codificados por três genes distintos encontrados em espécies de mamíferos. O TGF- β 1 é a isoforma mais encontrada, quase ubíqua, considerando que outras isoformas são limitadas a determinados tipos celulares e tecidos (Massagué, 2012).

O TGF- β é sintetizado na forma latente, devido a associação do peptídeo LAP (peptídeo associado a latência) com o TGF- β maduro, sendo incapaz de interagir com seus receptores específicos e exercer assim seu papel biológico. A interação do LAP com o TGF- β ativo forma o pequeno complexo latente (SLC – Small Latency Complex). A ligação de uma proteína de ligação ao TGF- β latente (LTBP) com o LAP forma o grande complexo latente (LLC – Large Latency Complex). A ativação do TGF- β envolve a clivagem de proteínas que formam o grande complexo latente de proteínas de matriz extracelular, como fibronectina e colágeno. O LAP é clivado através de ações proteolíticas com ação de diversas enzimas, incluindo plasmina, metaloproteinases 2 e 9 (MMP2 e MMP9) e trombospondina-1. Alterações no meio como mudanças de pH e o estresse mecânico também promovem a ativação do TGF- β . O receptor integrina α V β 6 ativa TGF- β ligando-se na sequência RGD presente no LAP liberando a citocina do pequeno complexo latente (Robertson et al., 2016; Shi et al., 2011).

A sinalização intracelular disparada pelos membros da família do TGF- β ocorre através de receptores específicos na superfície celular: receptores do tipo I, II e III, que existem em virtualmente todos os tipos celulares. Os receptores do tipo III, também chamado de betaglicanos ou endoglicanos, funcionam como co-receptores auxiliares, apresentando a citocina aos seus outros dois receptores, e participando da regulação da via de sinalização da superfamília do TGF- β . Os receptores do tipo I, também conhecidos como quinases semelhantes ao receptor de ativina (Activin-like Kinase ou ALK) são expressos em diversos tipos celulares, possuindo sete isoformas distintas, incluindo ALK 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. A ligação do TGF- β ativo com o receptor do tipo II induz a formação do complexo heterotrimérico entre os receptores do tipo II (T β RII) e do tipo I (T β RI) que possuem atividade serino/treonino quinase. A ligação do TGF- β ao receptor do tipo II promove a transfosforilação do receptor do tipo I, propagando o sinal na célula através de efetores *downstream* com a fosforilação de proteínas da via clássica (canônica) de sinalização do TGF- β . A via clássica do TGF- β é constituída de proteínas SMADS (1-7), sendo SMAD 2 e 3 fosforiladas pelo receptor ALK 4 ALK5 e ALK7 e SMAD 1, SMAD5 e SMAD 8 fosforiladas pelo receptor ALK1, ALK2, ALK3 e ALK6 bem como receptores da proteína morfogenética do osso (BMP). SMADS ligadas ao receptor, R-SMADS (SMAD2 e SMAD3) recebem o sinal do ligante e iniciam a sinalização da via clássica do TGF- β . No entanto, R-SMADS não são capazes de translocar o sinal para o núcleo. Proteínas SMAD mediadoras ou co-SMAD (SMAD4) auxiliam na transdução do sinal formando um complexo com R-SMADS, sendo então translocadas para o núcleo, onde eles modulam a transcrição de genes alvo dependendo do recrutamento de coativadores ou corepressores no complexo transcripcional. SMADS 6 e SMAD 7 são proteínas inibitórias da via clássica de sinalização do TGF- β que interferem na fosforilação de R-SMADS regulando a via clássica de sinalização. SMAD 1 e 5 induzem a expressão de SMAD 6 enquanto que SMAD 3 induz a expressão de SMAD 7, disparando um ciclo com feedback inibitório que suprime os efeitos mediados pelo TGF- β (Derynck and Budi, 2019; Rosemary J. Akhurst and Akiko Hata, 2012).

Além da via clássica, o TGF- β também modula vias alternativas (não-canônicas) transmitindo sinal através de outros fatores, como fator associado ao receptor 4 e 6 (TRAF4 e TRAF6), quinase ativada por TGF- β 1 (TAK1, também conhecido como MAPP3K7), proteína quinase ativada por mitógenos p38 (p38MAPK), RHO, fosfoinosítídeo quinase-3 (PI3K), AKT (também conhecido como proteína quinase B), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun N-terminal

(JNK), fator nuclear-kB (NF-kB) e pequenas GTPases. A sinalização do TGF- β pode também ser influenciada por diferentes vias de sinalização que incluem PI3K-AKT, WNT, Hedgehog (HH), Notch, interferon (IFN), TNF e a via RAS (Cheruku et al., 2015; Weiss and Attisano, 2013).

A via de sinalização alternativa do TGF- β é importante porque pode interagir diretamente com a via clássica de sinalização (SMADs) através da fosforilação de proteínas associadas ao receptor (R-SMADs). Entre as vias alternativas de sinalização do TGF- β , JNK e p38MAPK JNK são vias importantes e bastante estudadas. As vias JNK e p38 MAPK são vias superiores nas cascatas de sinalização e são ativados por quinases, como a MAP-quinase (MKKs) MKK4 e MKK 3/6 respectivamente. O TGF- β também dispara a ativação de quinases associadas ao TGF- β 1(TAK1) através da ativação catalítica de fator associado ao receptor de fator de necrose tumoral 6 (TRAF6), processos cruciais para a ativação de JNK e p38 MAPK (Mu Y, Gudey SK, 2012). A via de JNK ativada pode fosforilar SMAD3, induzindo sua translocação nuclear e participar na transcrição dos genes responsivos ao TGF- β . Além de fosforilar SMAD3, a via JNK também fosforila a proteína c-Jun, aumentando o complexo com a proteína SMAD2 para a transcrição gênica. (Chen and Ten Dijke, 2016; Engel et al., 1999; Weiss and Attisano, 2013) (Figura. 1.3).

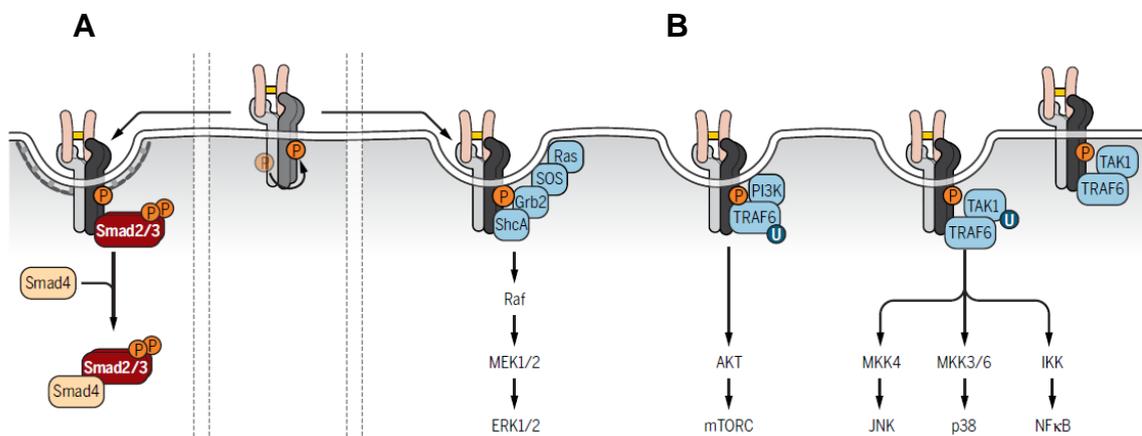


Figura. 1.3 – Receptores de TGF- β ativam vias de sinalização canônica (SMAD) e não-canônica (MAPK). (A) Via clássica de sinalização SMAD. TGF- β ativo ao interagir com seus receptores específicos TGFRI e TGFRII fosforilam SMAD2/3. Com a associação de SMAD4 formam um complexo e estes são translocados para o núcleo para a transcrição dos genes responsivos ao TGF- β . (B) O TGF- β ativa também vias não canônicas. Uma vez o TGF- β associado com seus receptores específicos, ativam proteínas MEK1/2 acionando a via ERK1/2, AKT ativando mTORC e MKK4 e MKK3/6 que ativam vias de JNK e p38 MAPK, respectivamente (Derynck and Budi, 2019).

1.5.2 – TNF- α

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, sendo importante no controle de proliferação celular, diferenciação,

apoptose, modulação da resposta imune e indução da inflamação em diferentes tipos celulares e desempenha um papel crítico na patogênese de doenças crônicas inflamatórias. Esse fator tem recebido esse nome devido a sua habilidade de eliminar células tumorais *in vitro* e causar necrose hemorrágica de tumores sólidos *in vivo* (Aiyer and Aggarwal, 2018; Dutra et al., 2014; Russo and Polosa, 2005).

TNF- α é produzido por macrófagos, linfócitos T, fibroblastos e outros tipos celulares como uma proteína transmembrana do tipo II (memTNF- α) com peso molecular de 26 kDa. TNF- α transmembrana exerce sua função biológica através da interação célula-célula, de maneira distinta da sua forma solúvel. A proteína memTNF é clivada no domínio extracelular por matriz metaloproteinase de matriz TACE (sigla em inglês pra enzima conversora TNF- α) também conhecida como ADAM-17, promovendo a liberação do TNF- α solúvel do seu compartimento membranar (sTNF). O TNF- α na forma solúvel apresenta seu peso molecular de 17 kDa, exercendo seu papel biológico através da interação com seus receptores específicos (Figura. 1.4) (Horiuchi et al., 2010; Van Hauwermeiren et al., 2011; Wajant et al., 2003).

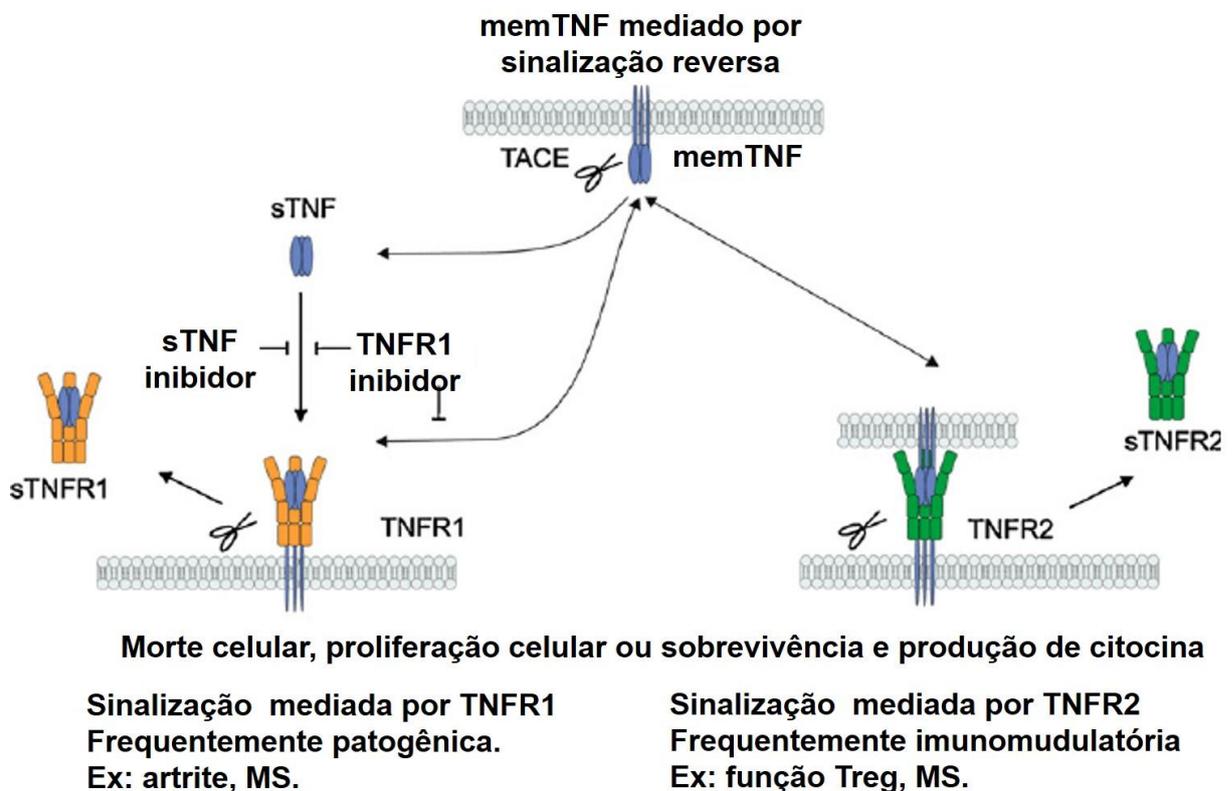


Figura 1.4 – TNF associado à membrana (memTNF) e TNF solúvel (sTNF) se ligam a dois membros da superfamília de receptores TNF-R1 e TNF-R2. Enquanto memTNF ativa ambos os receptores de TNF, sTNF estimula o TNF-R1 e possui uma capacidade de sinalização limitada ao TNF-R2 (Van Hauwermeiren et al., 2011) .

Os membros da família do TNF- α exercem suas funções através da interação com seus receptores específicos. Uma vez o TNF- α ativo, a citocina interage com os receptores TNF-R1 e TNF-R2, que possuem uma porção C-terminal localizada no interior da célula, importantes para a transdução do sinal. O memTNF e sTNF possuem a capacidade de interagir com o TNF-R1 e o TNF-R2 que estão presentes em quase todas as células nucleadas (Horiuchi et al., 2010; Wallach, 2016) .

O TNF-R1 é encontrado em todos os tecidos, considerando que a expressão do TNF-R2 é dominante em células do sistema imune. Ambos os receptores são capazes de ligar intracelularmente conduzindo a ativação de um complexo de sinalização intracelular mediando os efeitos multifatoriais do TNF- α . (Horiuchi et al., 2010; Leong and Karsan, 2000; Wallach, 2016).

Numerosas vias de sinalização têm sido descritas para TNF- α em diferentes compartimentos celulares como membrana plasmática, citosol, endossomas, mitocôndrias e o núcleo. Uma vez o TNF- α interagindo com seus receptores específicos (TNF-R1 e TNF-R2), vias como JNK e p38MAPK, pertencentes a família MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), composta por quinase regulatória de sinal extracelular (ERK), p38 e quinase c-Jun NH₂-terminal (JNK; também conhecidas como proteína quinase associado ao estresse, ou SAPK), são acionadas intracelularmente, a fim de regular a expressão de produtos gênicos pro-inflamatórios e pro-fibrogênicos. O receptor TNF-R1 participa majoritariamente no processo de sinalização das vias JNK e p38MAPK, na resposta pro-inflamatória e de morte celular. O TNF-R2 tem sido descrito em mediar sinais que promovem o reparo tecidual e a angiogênese (Aiyer and Aggarwal, 2018; Leong and Karsan, 2000; Wajant et al., 2003).

A via JNK, representa um sub-grupo de MAPquinases que são ativados pela presença de citocinas e ao estresse do meio. A ativação da via de JNK induzida pelo TNF- α ocorre através do receptor do tipo I (TNF-R1) em uma via dependente de TRAF2. (Russo and Polosa, 2005). Com a ativação da via de JNK, o sinal é translocado para o núcleo, aumentando a atividade transcricional dos fatores de transcrição como c-Jun (Wajant et al., 2003).

Não somente TRAF2 participa da sinalização de JNK, mas proteínas como ASK1, MKK1 e GCK possuem importância na ativação dessa proteína. A proteína MKK4 é importante também na ativação de JNK mediado pelo TNF, mas este não atua sozinho no processo de resposta celular (Aiyer and Aggarwal, 2018; Leong and Karsan, 2000; Russo and Polosa, 2005).

TNF- α ativa também a via de sinalização p38MAPK. Tanto o TNF-R1 e o TNF-R2 ativam a via de p38MAPK. Muitos fatores que acarretam a fosforilação de JNK por TNF- α também são utilizados para ativar p38MAPK. Proteínas como TRAF2, ASK1 e MEKK1, que participam da ativação de JNK mediado por TNF, fortemente induzem a ativação de p38MAPK. (Leong and Karsan, 2000; Varfolomeev and Vucic, 2018; Wajant et al., 2003) (Figura. 1.5).

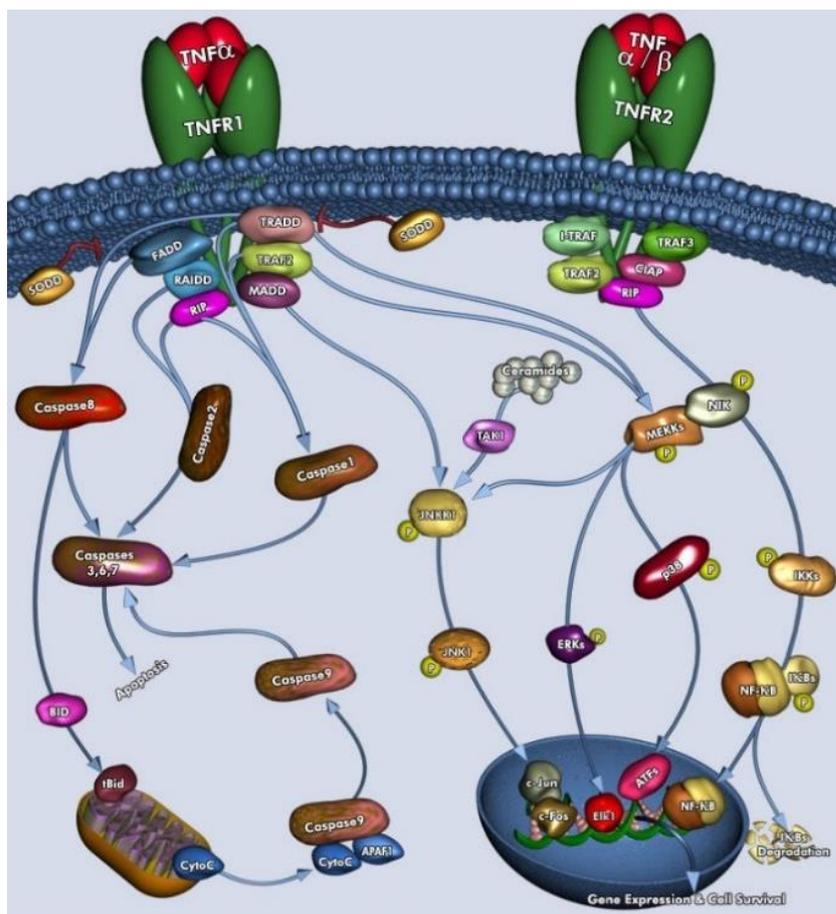


Figura. 1.5 – Ativação de p38MAPK e JNK induzidos por TNF- α . A ativação de JNK, modulado pelo TNF-R1, ocorre via TRAF2-GCKs-MEKK1/ASK1, com a fosforilação de MKK7 e ativação de JNK e p38MAPK é dependente de RIP e MKK3 para que ocorra sua fosforilação e ativação de fatores de transcrição desencadeados por essas vias como AP1 e Bcl2 para JNK e ATF, ELK1, CREB e estabilização de RNAm por p38MAPK. Fonte: <https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=437> – acessado em 01/08/2019

O TNF- α está envolvido na gênese de várias doenças como câncer, sepse, artrite reumatoide, diabetes e doença inflamatória no intestino. TNF- α também está implicado na patogênese de numerosas doenças cardiovasculares como arteriosclerose, infarto do miocárdio, falha cardíaca, miocardite e rejeição ao alo enxerto cardíaco. O TNF-R1 e o TNF-R2 regulam diferentemente as respostas cardíacas frente ao TNF- α (Aiyer and Aggarwal, 2018; Leong and Karsan, 2000; Wallach, 2016)

A expressão do TNF- α contribui para alterações como falha cardíaca, hipertrofia em cardiomiócitos e fibrose cardíaca, uma vez que dados da literatura mostram que pacientes que apresentam falha cardíaca possuem elevados níveis de TNF- α no soro (Horiuchi et al., 2010; JR Bradley, 2008; Wajant et al., 2003).

1.5.3 – IFN- γ

Interferon- γ (IFN- γ) é uma glicoproteína homodimérica com funções imunológicas pleiotrópicas. Células imunológicas como linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ (Th1), ativados, células *Natural Killer* (NK), células B e células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), sintetizam e secretam o IFN- γ e sua produção é controlada por citocinas IL-12 e IL-18, que são secretadas por APCs (monócitos/macrófagos e células dendríticas). De acordo com suas funções, o IFN- γ promove ativação de macrófagos, medeia imunidade antiviral e antibacteriana, participa no aumento da apresentação do antígeno, na ativação do sistema imune inato, coordena a interação linfócito-endotélio, regula o balanço Th1 e Th2 e por fim, controla a apoptose e a proliferação celular (Schroder et al., 2004; Tau and Rothman, 1999).

Membros da família do IFN- γ são segregados em três categorias: tipo I, II e III. O IFN do tipo I foi inicialmente induzido como resultado de infecção viral em células e estes tem sido dividido em duas classes de acordo com a sua origem celular. IFN- α é um dos membros da família do IFN com 17 proteínas relacionadas e codificadas por genes distintos que são sintetizados por leucócitos. IFN- β é uma única proteína codificada por genes distintos que são produzidos por fibroblastos. Em contraste, IFN tipo II é induzido após estímulo inflamatório, sendo sintetizado exclusivamente por linfócitos T e células *Natural Killer* e é denominado IFN- γ . O IFN- γ não possui semelhança estrutural com IFN- α e IFN- β a nível proteico e a localização gênica no cromossomo é distinto do IFN tipo I (Bach et al., 2002; Schroder et al., 2004).

O complexo de receptores que promove a função biológica do IFN- γ é formado por uma família de glicoproteínas, como o IFNGR1 de cadeia α (também chamado de CD119), com peso molecular de 90kDa, e o IFN- γ R2 (também conhecido como AF-1) cadeia β , com peso molecular de 60-67kDa. O IFNGR1 foi o primeiro a ser identificado e clonado. Embora o IFN- γ possua uma alta afinidade com o IFNGR1, este receptor sozinho é incapaz de disparar as respostas biológicas dessa citocina, requerendo a interação do IFNGR2, promovendo a transdução do sinal através do estímulo

promovido pelo IFN- γ (Bach et al., 2002; Schroder et al., 2004; Tau and Rothman, 1999).

Para a transdução do sinal, o IFN- γ se liga ao IFNGR1, ao qual possui alta afinidade quando comparado com IFNGR2, induz a uma série de respostas protetoras. Tanto o IFNGR1 quanto o IFNGR2 possuem quinases Janus ativa 1 (JAK1) e quinases Janus ativa 2 (JAK2) no qual são fosforiladas com a interação ligante-receptor. JAK 1 e 2 ativadas, acionam fatores de transcrição citosólico inativo STAT1 (sigla em inglês para ativador de transcrição e transdutor de sinal) na porção Tyr⁷⁰¹, dimerizando e translocando o sinal para o núcleo. A combinação dessas duas etapas JAK-STAT, conduz a transdução do sinal, e se liga a elementos GAS (sigla em inglês para sequências gamma ativada) na região promotora promovendo a transcrição de genes associados ao IFN- γ (Chilakamarti V. Ramana, M. Pilar Gil and The, 2002; Domeier et al., 2016; Kovarik et al., 2002; Schroder et al., 2004) (Figura 1.6).

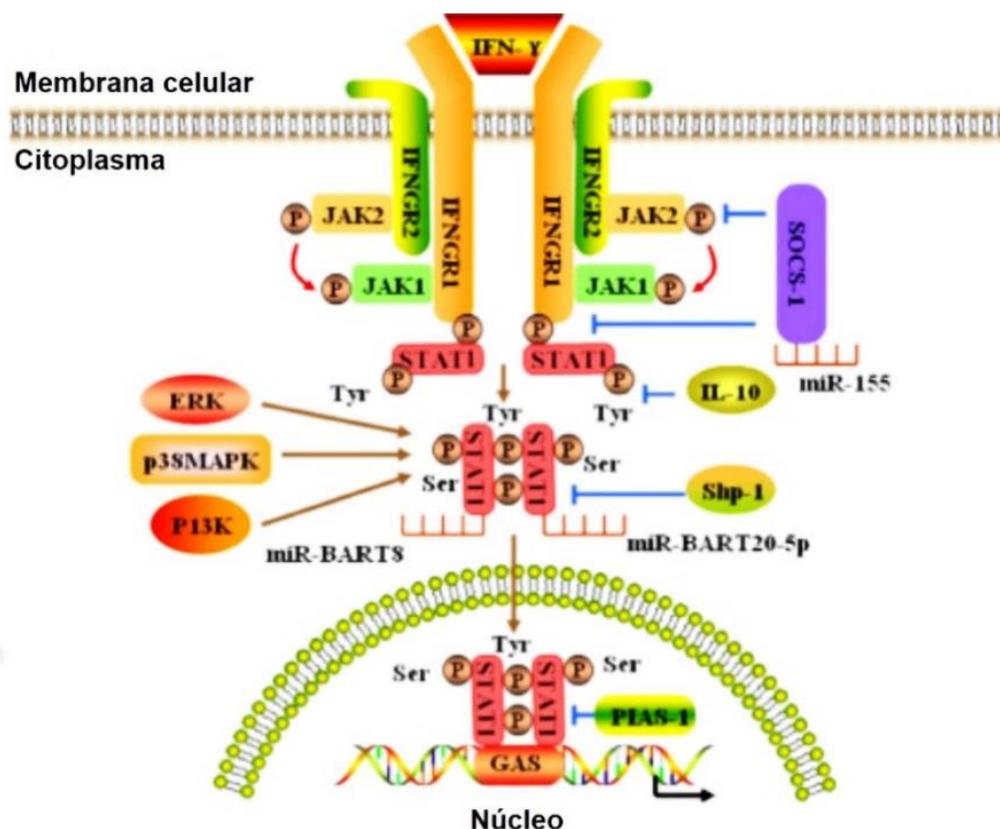


Figura. 1.6 – Via clássica de sinalização do IFN- γ . A transdução de sinal de IFN através da interação ligante-receptor, causa uma alteração conformacional no IFN-R (IFNGR1 em amarelo; IFNGR2, em verde), de tal forma que a JAK2 inativa sofre autofosforilação e ativação, a qual permite a transfosforilação de Jak1 por Jak2. O Jak1 ativada fosforila tirosinas da cadeia de IFNGR1 para formar dois locais de ancoragem adjacentes para STAT1. O IFN- γ também aciona a via de sinalização STAT1. Homodímeros de STAT1 deslocam-se para o núcleo e ligam-se a regiões promotoras IFN-(GAS). Heterodímeros STAT1: IRF-9 e IRF-1 são capazes de se ligar a região promotora após o estímulo do

IFN- γ . O IRF-1 também é capaz de promover a transcrição de STAT1 através de um local incomum (IRF-E / GAS / IRF-E). Moléculas sinalizadoras ativadas por IFN- γ são representadas em texto vermelho (Yu et al., 2015).

O IFN- γ ativa não somente a via JAK-STAT1, mas também ativa membros da família MAPK. Em macrófagos derivados da medula óssea é observado uma intensa ativação da via de p38MAPK já nos estágios iniciais de sinalização. No entanto a via JNK1 possui uma ativação fraca e tardia em macrófagos quando comparados com p38MAPK. Porém, JNK1 são vias importantes porque em condições de estresse, auxiliam na fosforilação da via clássica STAT1, potencializando a via de sinalização induzidas por IFN- γ (Kovarik et al., 2002; Valledor et al., 2014).

Para que haja fosforilação de p38MAPK induzidos por IFN- γ , a proteína adaptadora MyD88 é importante para que ocorra uma forte ativação dessa via em macrófagos. A via de p38MAPK regula a expressão de numerosas quimiocinas e citocinas induzidas por IFN- γ ao passo que a via de JNK1 não participa na regulação da expressão de citocinas e quimiocinas, onde participam ativamente na expressão de genes responsáveis pela apresentação do antígeno (Kovarik et al., 2002; Valledor et al., 2014).

O IFN- γ é uma citocina versátil, com papel em diversas atividades biológicas, importante em diversas patologias. Qualquer falha no sistema IFN-IFNGR, dificulta a resposta imune contra infecções. (Scott P Levick and Goldspink, 2014).

Além de possuir efeito protetor contra patógenos, o IFN- γ por sua vez promove alterações cardíacas com o desenvolvimento de miocardite e cardiomiopatia de outras etiologias. Assim como TNF- α , o IFN- γ também é encontrado em elevados níveis no soro de pacientes que apresentam falhas cardíacas. (Reifenberg et al., 2007; Scott P Levick and Goldspink, 2014).

1.5.4 – TGF- β , TNF- α e IFN- γ na doença de Chagas.

Cerca de 30% dos pacientes infectados pelo *T. cruzi* progridem para a fase crônica da doença e desenvolvem fibrose no miocárdio (Simões et al., 2018a). Dados revelam que pacientes cronicamente infectados apresentam cardiomiopatia, sendo diretamente relacionados com uma alta concentração de TGF- β , TNF- α e IFN- γ no soro quando comparados com pacientes indeterminados. (Araújo-Jorge et al., 2002a; Guedes et al., 2009; Liang et al., 2016). Células como fibroblastos cardíacos, são os primeiros tipos celulares a sintetizar e secretar o TGF- β para o meio extracelular (Araújo-Jorge et al., 2008).

O TGF- β está envolvido no estabelecimento e desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica. Esta citocina participa do processo de invasão à célula hospedeira, uma vez que o *T. cruzi* necessita de receptores funcionais do TGF- β e de proteínas de via clássica de sinalização ativas para invadir a célula hospedeira (Hall and Pereira, 2000; Ming et al., 1995; Waghabi et al., 2007a). Dados revelam que o nocaute dos receptores de TGF- β (T β RI e T β RII) em células de mamíferos, impossibilitam o parasito de invadir a célula alvo (Akhurst and Hata, 2012). Formas tripomastigota e amastigota de diferentes cepas foram capazes de ativar diretamente o TGF- β latente (Waghabi et al., 2005), o que pode contribuir para o processo de invasão e a gênese da doença de Chagas. Além disso, a resposta imune do hospedeiro é controlada por TGF- β durante a infecção pelo *T. cruzi* (Araújo-Jorge et al., 2002a; Martin et al., 2007; Rocha Rodrigues et al., 2012). Evidências experimentais também mostram que o parasito induz a síntese do TGF- β em cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos (Waghabi et al., 2009), o que pode favorecer a sobrevivência do parasito. Ainda, formas amastigotas captam TGF- β da célula hospedeira, utilizando-o para a diferenciação em tripomastigota, o que possibilita a continuidade no ciclo celular do parasito (Waghabi et al., 2005). Após sucessivas divisões, formas tripomastigotas e o TGF- β ativo são liberados no microambiente facilitando a invasão em células vizinhas através da associação do *T. cruzi* com o TGF- β na célula alvo (Ferreira et al., 2016).

Estudos utilizando modelos de cardiomiopatia chagásica experimental e ensaios clínicos demonstraram que o TGF- β participa também do processo de fibrose cardíaca na doença de Chagas. Níveis elevados de TGF- β associados com intensa fibrose do miocárdio foram detectados em camundongos nocaute em α 2-macrobulina infectados pelo *T. cruzi* (Waghabi et al., 2002) e em pacientes portadores da doença de Chagas com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) (Araújo-Jorge et al., 2002). Relatos descrevem que inibidores da sinalização de TGF- β reduzem a infecção e evitam o dano cardíaco e a fibrose durante a infecção experimental aguda pelo *T. cruzi* (Araújo-Jorge et al., 2008; de Oliveira et al., 2012; Araújo-Jorge et al., 2009). Por sua vez, estudos apontam que devido ao aumento sérico de TGF- β 1 em pacientes infectados pelo *T. cruzi* estarem associados com uma piora no quadro clínico, polimorfismos no gene TGFB1 estão implicados na suscetibilidade do desenvolvimento da doença de Chagas (Ferreira et al., 2018; Torres et al., 2010). Em conjunto, estas evidências demonstram um papel fundamental do TGF- β na infecção pelo *T. cruzi* e no desenvolvimento da doença de Chagas.

Além do TGF- β ser uma citocina importante no desenvolvimento da CCC, TNF- α e IFN- γ estão também envolvidas no processo. Na doença de Chagas, TNF- α e IFN- γ contribuem no controle do crescimento do parasito através da ativação de macrófagos e de outras células do infiltrado inflamatório. Macrófagos infectados secretam TNF- α e IFN- γ e estes atuam em sinergismo promovendo a liberação de óxido nítrico (NO) com a função de eliminar o parasito intracelular. No entanto, TNF- α e IFN- γ administrados exógenamente não fornecem mesmo efeito em macrófagos infectados com *T. cruzi* na tentativa de impedir a proliferação do parasito intracelular (Garg et al., 2018; Ward et al., 1999).

A interação TNF- α /TNF-R1 desempenha um papel importante na hiperativação de macrófagos infectados com *T. cruzi*. O TNF-R1 e não o TNF-R2, desempenha um papel importante no controle do crescimento do *T. cruzi*. A interação TNF- α /TNF-R1 controla a produção de citocinas e de NO, bem como mobilização celular para o local da infecção (Lannes-vieira et al., 2011).

A persistência do *T. cruzi* no tecido cardíaco juntamente com o desbalanço imunológico contribuem para o desenvolvimento da CCC. Em modelo experimental de camundongo infectado pelo *T. cruzi* que desenvolve a CCC, a administração de pentoxifilina, um inibidor da fosfodiesterase, reduz a ativação e migração de células T CD8 + no baço e reduz a intensidade da inflamação no tecido cardíaco. A terapia com pentoxifilina não reduz a carga parasitária mas promove uma redução na hipertrofia e restaura a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Pereira et al., 2015).

A associação do benzonidazol com compostos de reposicionamento imunológico como a pentoxifilina, promove efeito benéfico em camundongos infectados pelo *T. cruzi* interferindo vias de sinalização TNF/TNFR e iNOS/NO. A combinação desses compostos controla a carga parasitária e reverte anormalidades elétricas induzidas pela infecção pelo *T. cruzi* (Vilar-Pereira et al., 2016).

O bloqueio de TNF- α com o anticorpo infliximab não interfere no crescimento do *T. cruzi*, mas reduz o desequilíbrio imunológico associado com gravidade da CCC. O bloqueio do TNF- α com infliximab regula de maneira seletiva citocinas inflamatórias, aumenta a expressão de IL-10, reduzindo a miocardite crônica e promove melhoria no eletrocardiograma (Pereira et al., 2014).

Em indivíduos infectados pelo *T. cruzi* que desenvolvem CCC, é observado um aumento não apenas de TNF- α mas de IFN- γ nas fibras cardíacas, sendo estes associados concomitantemente com o desenvolvimento de uma cardiomiopatia grave.

(Lannes-vieira et al., 2011; Lorena et al., 2010; Pereira et al., 2014; Poveda et al., 2014).

Portanto, níveis séricos de IFN- γ e de TNF- α em indivíduos infectados com *T. cruzi* promovem o desenvolvimento do dano cardíaca e o remodelamento tecidual com o aumento de proteínas de matriz extracelular, acarretando no quadro de fibrose cardíaca em pacientes com CCC (Scott P Levick and Goldspink, 2014).

1.6 – Matriz extracelular e fibrose na doença de Chagas

1.6.1. Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede formada por uma mistura de componentes celulares e de componentes não celulares. A MEC fornece uma sustentação física para a célula, estrutura e suporte, promovendo também elasticidade, coesão e força aos tecidos e órgãos através de componentes fibrilares e microfibrilares. A MEC apresenta uma importância na regulação de muitos processos celulares como crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese (Frantz et al., 2010).

Componentes presentes na MEC são formados por uma variedade de macromoléculas onde sua composição e estrutura varia de tecido para tecido. Os principais constituintes da MEC são proteínas fibrosas como colágeno, fibronectina (FN), elastina, lamininas, glicoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, que são moléculas altamente ácidas e hidratadas e nidogênio 1 e 2 (Figura.1.7) (Theocharis et al., 2016).

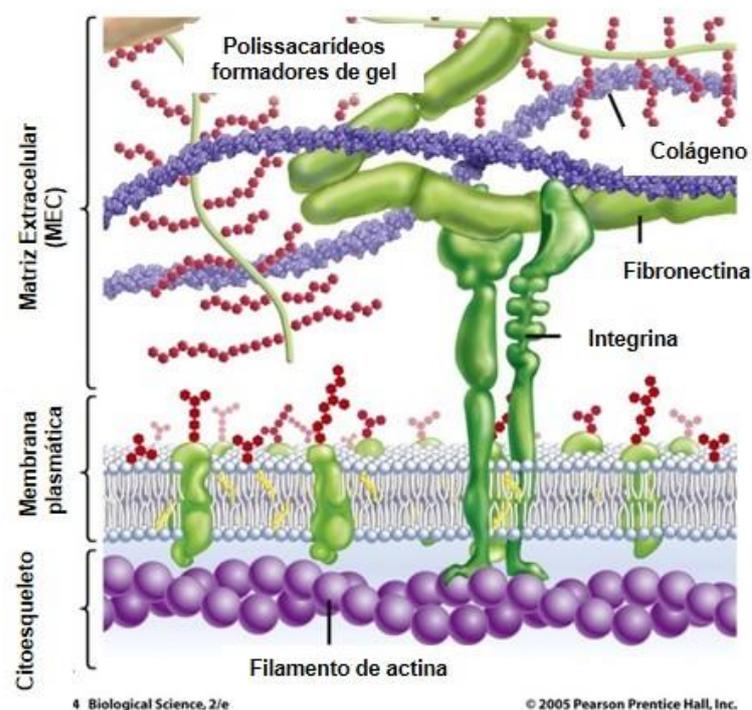


Figura. 1.7 – Matriz extracelular. A matriz extracelular é uma rede formada por proteínas fibrosas e não fibrosas com a função de promover uma sustentação física para as células presentes no tecido e regular processos celulares através de moléculas estocadas na rede de MEC.

Fonte: <http://apbiocellorganelles.weebly.com/ecm.html> - acessado em 29/04/2019.

Células embebidas na matriz interagem com macromoléculas presentes na rede de MEC através de receptores de superfície como integrinas, proteoglicanos, e o receptor do domínio discoidina. Fibroblastos são as principais células majoritárias que sintetizam e secretam componentes de matriz extracelular, importante na formação de MEC (Li et al., 2018; Theocharis et al., 2016).

Células presentes no tecido conjuntivo, como fibroblastos, secretam macromoléculas como fibronectina, hialuronana, fibrilina, proteoglicanos, glicoproteínas, periostina e colágeno. Certos tipos de tecidos conjuntivos encontrados em ossos e cartilagens são constituídos por células relacionadas aos fibroblastos, possuindo nomes mais específicos como condroblastos, para cartilagem e os osteoblastos, para o osso (Kim et al., 2011; Li et al., 2018; Theocharis et al., 2016).

Variações na composição e na estrutura da MEC podem ocorrer e afetar toda a propriedade biomecânica da rede formada, afetando também os sinais transmitidos para as células e portanto modulam sua resposta a MEC. Muitos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas estão depositados na MEC, e estes podem influenciar no desenvolvimento e na fisiologia dos tecidos e células nela inseridos (Kim et al., 2011; Theocharis et al., 2016).

1.6.1.1– Fibronectina.

Uma das proteínas mais abundantes na matriz extracelular é a fibronectina (FN). É uma proteína expressa na MEC em uma variedade de tipos celulares, apresentando funções críticas no desenvolvimento dos vertebrados. A matriz de FN é sintetizada através da dinâmica de remodelamento tecidual, sendo importante na formação e no reparo, essencial no desenvolvimento embrionário (Badylak, 2018; Theocharis et al., 2016). A FN é uma proteína adesiva da MEC, possuindo sítios de ligação com receptores celulares e com outras proteínas estruturais da MEC, como colágenos e proteoglicanos, funcionando como uma ponte que reforça a rede de matriz e conecta a MEC às células e às moléculas solúveis do espaço extracelular (Mouw et al., 2014). Além disso, a FN possui a função de regular o comportamento celular, disparar respostas específicas em processos como regulação do crescimento celular dependente de ancoragem, migração, crescimento, expressão gênica,

diferenciação celular, desenvolvimento de tumores, metástases, embriogênese, angiogênese e reparo tecidual (Bradshaw and Smith, 2014).

A FN pode ser encontrada na sua forma solúvel no plasma, na forma celular ou na forma insolúvel na superfície das células. A FN plasmática é secretada por hepatócitos para a corrente sanguínea onde circula na sua conformação compacta antes de interagir com seus receptores de superfície celular, convertendo para sua conformação estendida, expondo seus sítios de ligação para a formação de fibrilas de FN na MEC. A FN ocorre também na sua forma celular que é secretada localmente por fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso vascular e outros tipos celulares, que então coordenam a sua interligação e a formação de fibrilas de FN na matriz (Bradshaw and Smith, 2014; Mao and Schwarzbauer, 2005; Maurer et al., 2016).

A molécula de FN é uma glicoproteína dimérica ligada covalentemente por uma ponte dissulfeto, composto de subunidades de 230-270 kDa. Cada subunidade contém três módulos repetitivos, com 12 módulos do tipo I, 2 módulos do tipo II, 15 a 17 (dependendo do splicing) módulos tipo III e uma sequência variável V, que não é homóloga a outras regiões da FN. Cada módulo na proteína confere um domínio funcional permitindo que ocorram interações com outras proteínas de MEC, como colágeno, fibrina, heparina, com receptores de superfície celular e com outra molécula de FN, permitindo a formação de fibrilas de FN na matriz extracelular (Figura. 1.8) (Frantz et al., 2010; Magnusson and Mosher, 1998; Maurer et al., 2016).

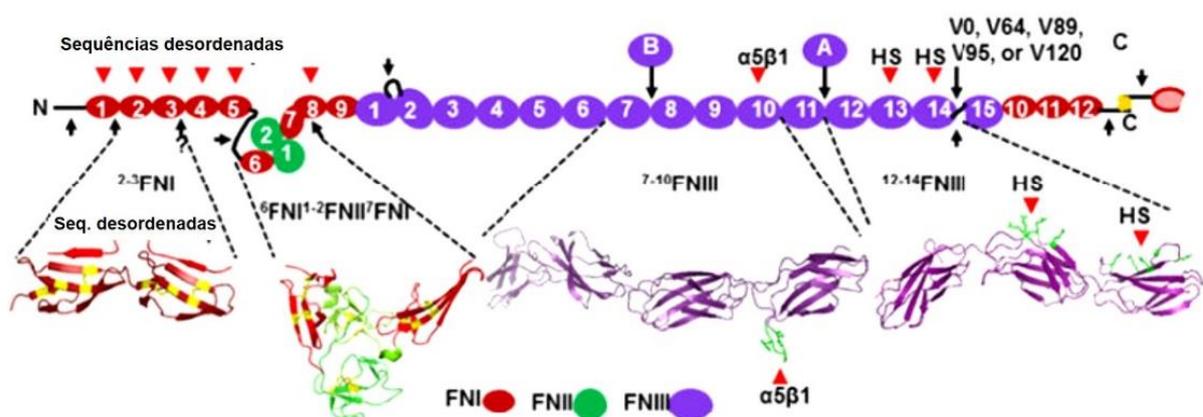


Figura. 1.8 – Molécula de fibronectina e suas regiões. A molécula de FN contém regiões do módulo tipo I, tipo II e tipo III. Domínios que sofrem splicing alternativo (tipo III ED-A e ED-B) e região V estão indicados em roxo. Domínios de ligação para fibrina, colágeno, células e heparina estão indicados, e o dímero da molécula se forma através do par de cisteínas na região C-terminal (SS) (Maurer et al., 2016)

Na molécula de FN, o módulo do tipo III contém regiões que sofrem splicing alternativo que são chamadas de domínio extracelular A e B (ED-A e ED-B). A FN celular possui quantidades variáveis de ED-A e ED-B que são características dessa forma insolúvel da molécula, além de apresentar frequentemente a região V. A região V está incluída na maioria das subunidades da FN celular mas encontra-se presente somente em uma subunidade em cada dímero da FN plasmática, a qual não contém os domínios ED-A e ED-B (Bradshaw and Smith, 2014; Moretti et al., 2007; Theocharis et al., 2016).

A montagem da matriz de FN é um processo dependente de célula. No meio extracelular, o processo de montagem de matriz de FN inicia-se com a ligação da região N-terminal de 70kDa da molécula na superfície da célula. Essa etapa é reversível e saturável. A montagem de FN tem locais especializados e requer a participação de moléculas de integrinas e sindecans 2 e 4 (proteoglicanos de heparan sulfato transmembrana presentes na superfície da célula). A FN tem como receptor transmembrana específico as integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{11b}\beta_3$. A região do tipo III de FC, III8-III10, é responsável por ligar as integrinas na superfície celular. A sequência III10 contém os aminoácidos arginina, glicina e ácido aspártico (Arg-Gly-Asp), que formam a sequência RGD da proteína que vão ligar à integrinas dando início ao processo de montagem de FN na matriz extracelular mediado pela célula. O receptor $\alpha_5\beta_1$ é o receptor primário para montagem de FN na matriz extracelular. Outros receptores como $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{11b}\beta_3$ não são capazes de montar fibrilas de FN na matriz extracelular sem ação de tratamentos que permitam aumentar sua atividade. A montagem dessas fibrilas de FN depende da resistência da FN às integrinas e à sinergia de FN no local. Essa interação e sinergia de FN-integrinas, aciona intracelularmente vias de sinalização que participam no processo de montagem de matriz extracelular (Leiss et al., 2008; Singh Purva, 2010).

Interações com glicosaminoglicanos e proteoglicanos com a FN têm sido implicados na montagem da MEC. Tanto proteoglicanos transmembrana sindecans como proteoglicanos presentes na MEC como perlecan podem participar desse processo de montagem (Prydz, 2015; Singh Purva, 2010).

No meio intracelular, integrinas se associam a filamentos de actina, processo essencial para montagem e manutenção de fibrilas de FN na superfície da célula. Para que haja interação de FN, integrinas e o citoesqueleto é necessária a interação de proteínas adaptadoras e sinalizadoras que se ligam à região β_1 na integrina como talina, vinculina, paxilina e FAK (quinase de adesão focal) (Singh Purva, 2010). A

proteína FAK tem um papel importante na sinalização acionada por integrinas e é essencial para montagem de fibrilas de FN na matriz extracelular. Membros da família Src quinase atuam junto com FAK na montagem de FN. Src ativada fosforila paxilina, promovendo a polimerização e contratilidade do citoesqueleto de actina mediado pelas proteínas actina-miosina, e auxiliando assim a montagem de FN no meio extracelular (Ilić et al., 2004).

A molécula de FN sofre alterações alostéricas após a geração de condições de tensão impostas pela polimerização do citoesqueleto e a ligação com as integrinas, se desenovelando e expondo sítios de ligação da FN com ela mesma que não estavam acessíveis anteriormente e permitindo interações intermoleculares requeridas para incorporação da FN em fibrilas (Mao and Schwarzbauer, 2005; Maurer et al., 2016).

1.6.1.2– Colágeno

Colágenos constituem uma família de proteínas fibrosas encontradas em todos os animais multicelulares. São os principais componentes da MEC no tecido conectivo. São secretados pelas células presentes no tecido conjuntivo e por uma variedade de outros tipos celulares. Os colágenos são os principais componentes da pele e dos ossos, sendo as proteínas mais abundantes dos mamíferos, constituindo 25% da massa proteica total desses animais. Nos genomas dos vertebrados e dos invertebrados superiores, 28 glicoproteínas de colágeno são codificadas por pelo menos 45 genes. Colágenos são responsáveis pela força presente na MEC e formam fibras de alta resistência à tração, sendo majoritários nos tendões e ligamentos (Alberts et al., 2010; Begoña López, Arantxa González, 2010; Holmes et al., 2018; Mienaltowski and Birk, 2014; Salazar et al., 2006; Yue, 2014).

Colágenos podem ser homotriméricos, compostos por cadeias α idênticas, e podem ser também heterotriméricos formados por cadeias α codificados por diferentes genes do mesmo tipo de colágeno. A estrutura da molécula de colágeno é caracterizada por conter 3 cadeias α , onde cada cadeia α contém aproximadamente 1000 aminoácidos e apresenta peso molecular de 135 kDa, com uma conformação helicoidal. Moléculas de colágeno são extremamente ricas em prolina e glicina, sendo importantes na formação da fita tripla helicoidal. Cada cadeia α possui um triplet de Gly-X-Y, em que as posições X e Y são frequentemente ocupadas por uma prolina e um 4-hidroxiprolina respectivamente (Figura.1.9). A prolina estabiliza a conformação

da hélice nas cadeias α , e a glicina encontra-se espaçada a cada dois resíduos por toda região central da cadeia α (Alberts et al., 2010; Mienaltowski and Birk, 2014).

Membros da família do colágeno possuem pelo menos um domínio colagenoso (COL) e um domínio não-colagenoso (NC). Colágenos que possuem domínios helicoidal não colagenoso (NC), não triplos nas regiões N e C-terminal, são enumerados de acordo com a porção C-terminal (NC1, NC2, NC3, etc.). O número e a estrutura de domínios COL e NC são dependentes de um tipo de colágeno específico (Theocharis et al., 2016).

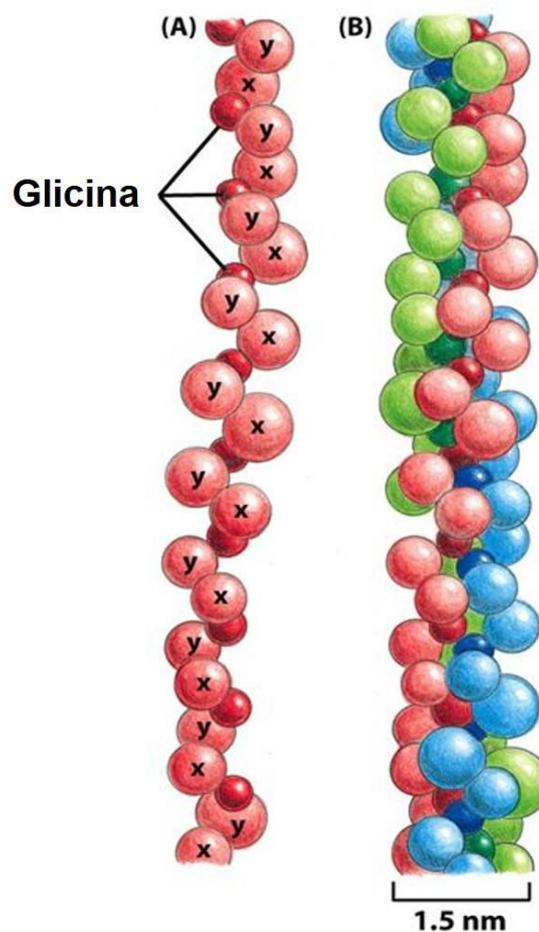


Figura. 1.9 – Estrutura típica de uma molécula de colágeno. (A) Representação parcial de uma única cadeia α de colágeno onde cada aminoácido é representado por uma esfera. A cadeia contém em torno 1000 aminoácidos e é organizada com uma hélice para a esquerda, constituindo 3 aminoácidos por volta, onde o terceiro é sempre uma glicina. (B) Modelo parcial de uma molécula de colágeno, onde três cadeias α , cada uma representada por uma cor diferente, são enroladas umas às outras, formando uma tripla hélice. A glicina é o único aminoácido capaz de ocupar o interior da tripla hélice (Alberts et al., 2010)

Fibras de colágeno são formadas a partir de numerosas fibrilas de colágeno e a montagem e deposição das fibrilas envolve uma sequência de eventos que ocorre tanto no compartimento intracelulares quanto no extracelular. Após o processo de transcrição, cadeias polipeptídicas de colágenos são sintetizadas nos ribossomos

ligados às membranas e são liberados no lúmen do retículo endoplasmático (RE) como precursores denominados pró-cadeia α . Esses precursores apresentam pequenos peptídeos-sinais necessários para o direcionamento do polipeptídeo para o RE, denominando a formação de pró-peptídeos nas extremidades N- e C-terminal. No lúmen do RE, as prolínas e lisinas são hidroxiladas para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente, sendo algumas hidroxilisinas glicosiladas. Cada pró-cadeia α combina-se com outras duas para formar uma molécula helicoidal de três fitas ligadas por ligações de hidrogênio chamadas de pró-colágeno. Pro-colágenos são então secretados em vesículas para o meio extracelular e são processados através de uma metaloproteinase específica para colágeno dando formação a triplas hélices de colágeno, sendo então entrelaçados na MEC (Figura. 1.10) (Liu et al., 2015; Theocharis et al., 2016).

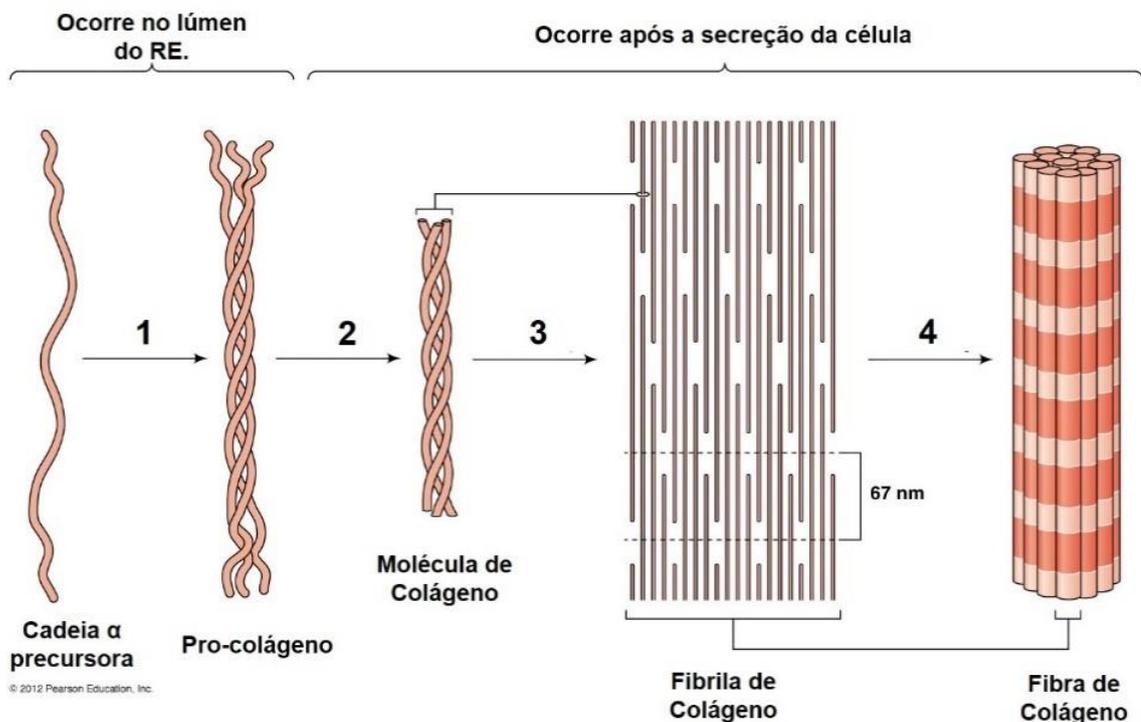


Figura 1.10 – Formação da fibra de colágeno. (1) Montagem das 3 cadeias alfa precursoras formadas por mais de 1000 aminoácidos; (2) formação tripla hélice de pro-colágeno com pontas soltas; (3) formação da molécula de colágeno tripla hélice e montagem em fibrilas de colágeno; (4) Montagem em fibras de colágeno.

Fonte: <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-17/CB17.html> - acessado em 01/05/2019.

Colágenos podem ser agrupados em classes baseados na sua organização estrutural. Alguns colágenos são pertencentes a uma subfamília que incluem formadores de fibrilas como colágenos do tipo I, II e III, V, XI, XXIV e XXVII. Estes são abundantes, presentes em todos os tecidos, conferindo resistência a tração. No

entanto, colágeno do tipo I, II e III são mais abundantes no corpo e são os componentes principais de todas as fibrilas de colágeno. O comprimento das fibrilas varia de tamanho e de diâmetro variando de 12nm até mais de 500nm, dependendo do estágio de desenvolvimento. O colágeno I é predominantemente encontrado no tecido conectivo, no entanto, outros tipos de colágeno e macromoléculas não-colágenas apresentam também diversidade na MEC e estes regulam a montagem das fibrilas e das fibras (Ricard-Blum, 2011; Theocharis et al., 2016; Yue, 2014).

Colágenos que formam redes são pertencentes aos tipos IV, VIII e X. O colágeno do tipo IV é um colágeno formador de rede, constituindo a maior parte da lâmina basal. Por outro lado, o colágeno VIII está localizado nas membranas sub-endoteliais vasculares e o colágeno X está presente na zona hipertrófica da cartilagem da placa de crescimento (Holmes et al., 2018).

Colágenos podem ser classificados de acordo com a sua associação as fibrilas. São caracterizados como FACITs (sigla em inglês para colágenos associados a fibrilas com tripla hélice interrompida) e MACITs (sigla em inglês para colágenos associados a membrana com tripla hélice interrompida). Os FACITs incluem os colágenos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII. Eles são colágenos curtos com domínios NC que interrompem o colágeno helicoidal fornecendo ao colágeno maior flexibilidade. FACITs interagem com colágenos fibrilares presentes na superfície e ligam-se a outras fibras de colágeno juntas e também com outros componentes moleculares da MEC (Figura. 1.11) (Frantz et al., 2010; Ricard-Blum, 2011; Theocharis et al., 2016).

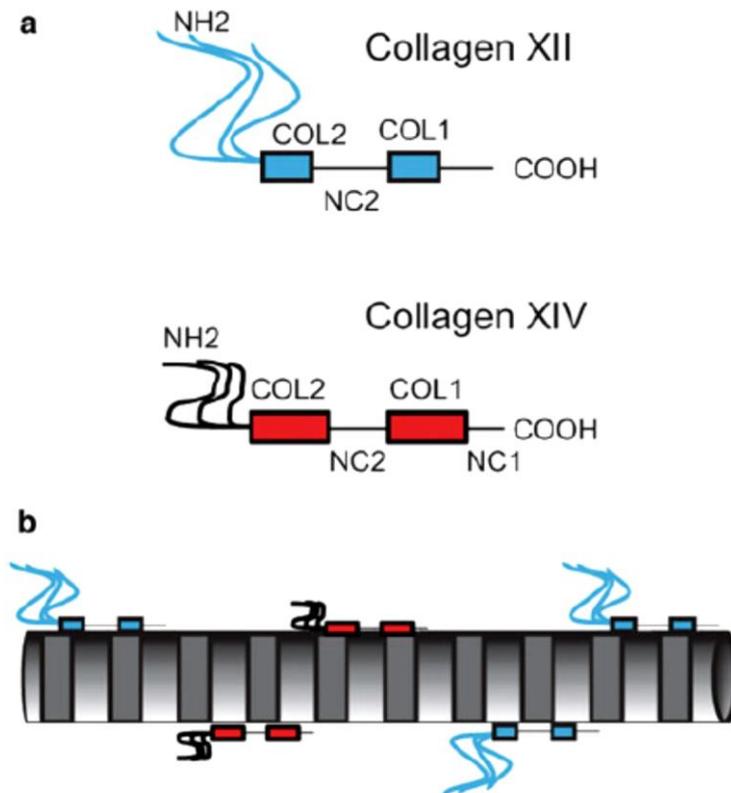


Figura 1.11 – Colágeno FACITs associados com fibrilas. (A) Colágenos FACITs possuem 2-3 domínios COL e 3-4 domínios NC com um amplo domínio NC N-terminal no qual é direcionado para o espaço inter-fibrilar. **(B)** Colágenos FACITs associados na superfície das fibrilas, com sua isoforma truncada através de splicing presente no colágeno XII (Mienaltowski and Birk, 2014).

MACITs são proteínas transmembranas no qual possuem um longo domínio C-terminal, compostas por partes de colágenos interrompidas por domínios NC e um curto domínio N-terminal citoplasmático. Essa classe é composta por colágenos do tipo XIII, XVII, XXIII, XXV, e são expressos por muitos tipos celulares, como células malignas presentes nos tecidos. Colágenos pertencentes a essa classe podem atuar como receptores de superfície afetando a adesão celular e, sob ação de clivagem proteolítica, são desprendidos da superfície da célula para a MEC, gerando, portanto, colágenos solúveis (Mienaltowski and Birk, 2014; Yue, 2014).

Dentre os tipos de colágeno, o colágeno do tipo VII é o principal componente das fibras de ancoragem da lâmina basal, conectando-a ao estroma subjacente. Já os colágenos do tipo XV e XVIII pertencem a categoria MULTIPLEXINA/colágenos que produzem endostatina. Esses colágenos são expressos em todas as membranas basais do epitélio e dos vasos nos tecidos humanos (Ricard-Blum, 2011; Theocharis et al., 2016). Portanto, fibras de colágeno contribuem para interações críticas entre a MEC e o sistema homeostático a fim de preservar a homeostase fisiológica entre as células e o tecido.

1.6.1.3– Glicosaminoglicanos (GAG's)

Glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídicas não-ramificadas compostas de unidades dissacarídicas repetidas e estão presentes na superfície da célula e como componentes de MEC. São denominados GAG's porque um dos dois açúcares no dissacarídeo é repetido e é sempre um amino açúcar como o N-acetilglicosamina (GlcNAc) ou N-acetilgalactosamina (GalNAc). O segundo açúcar normalmente é um ácido urônico, podendo ser glicurônico (GlcA) ou idurônico (IdoA). Grupos sulfato ou carboxila ocorrem na maioria dos açúcares e, portanto, todos os GAG's são negativamente carregados. Os GAG's são as moléculas mais aniônicas produzidas pelas células animais. GAG's são classificados em quatro grupos, sendo distinguidos de acordo com seus açúcares, com o tipo de ligação entre os açúcares e o número e localização dos grupos sulfatos: hialuronana, condroitin sulfato e dermatan sulfato, heparan sulfato e sulfato de queratana (Alberts et al., 2010; Köwitsch et al., 2018; Prydz, 2015) (Figura. 1.12).

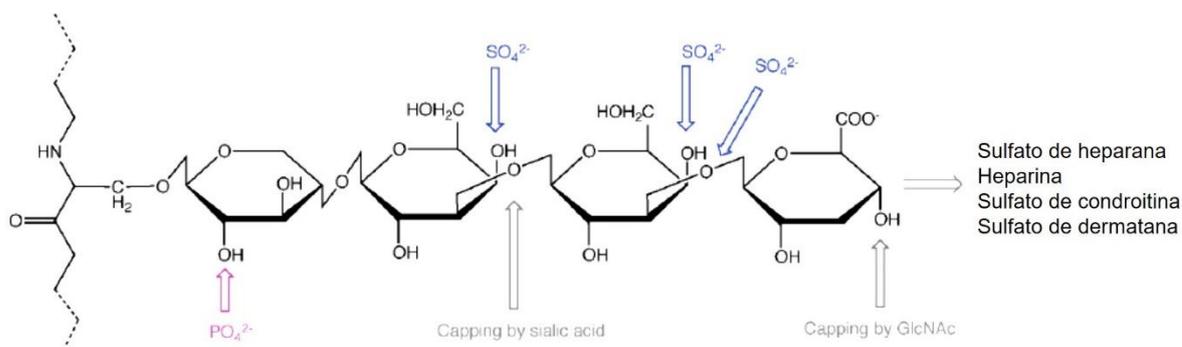


Figura 1.12 – Molécula de Glicosaminoglicano. Glicosaminoglicanos associados a uma proteína central. Sulfatação, fosforilação e regiões de "capping" são indicados (Pomin and Mulloy, 2018).

A hialuronana, também chamada de ácido hialurônico, é o GAG mais simples pois são formados por uma sequência regular de até 25.000 unidades dissacarídicas não-sulfatadas, consistindo em alternados monossacarídeos GlcA e GlcNAc sendo encontradas em todos os tecidos e fluidos adultos animais. Não apresenta açúcares sulfatados e em geral, não está covalentemente associado a uma proteína central (Pomin and Mulloy, 2018; Prydz, 2015).

Condroitin Sulfato (CS) é um glicosaminoglicano sulfatado, composto por uma cadeia polissacarídica longa não ramificada com uma estrutura repetida de dissacarídeos de N-acetilgalactosamina e ácido glicurônico. A maioria dos resíduos de N-acetilgalactosamina é sulfatada, particularmente na posição 4 e 6, tornando o condroitin sulfato uma molécula fortemente carregada. O CS é responsável por muitas

propriedades bioquímicas da cartilagem, como a resistência e a elasticidade (Alberts et al., 2010).

O dermatan sulfato, também denominado condroitin sulfato B, é um glicosaminoglicano presente no tecido conjuntivo, composto por galactosamina e um ácido idurônico. Tanto condroitin sulfato quanto dermatan sulfato estão implicados em vários processos biológicos incluindo sinalização celular, coagulação e na interação de patógenos com receptores. Esses GAG's estão presentes na superfície da célula e na MEC (Köwitsch et al., 2018; Taylor and Gallo, 2006).

O heparan sulfato e a heparina são compostos de glicosamina N-acetilada ou N-sulfatada que são α (1-4) - ou β (1-4) ligados à ácido urônico (ácido L-idurônico ou D-glicurônico). O principal dissacarídeo da heparina é composto por ácido idurônico, sulfatado no carbono 2 (IdoA2S) e N-glicosamina sulfatada adicionalmente no carbono 6 (GlcNS6S). Em relação ao heparan sulfato, o principal dissacarídeo consiste em um ácido glicurônico e N-glicosamina acetilada. O grau de sulfatação da heparina é maior do que no heparan sulfato, resultando na maior densidade de carga negativa de todas as macromoléculas conhecidas. O padrão de sulfatação da heparina é distribuída igualmente por toda cadeia de GAG enquanto o de sulfatação de heparana apresenta regiões distintas de alta sulfatação, bem como regiões que possuem baixa ou nenhuma sulfatação. O queratan sulfato é composto por dissacarídeos β (1-4) GlcNAc e β (1-3) galactose, sendo sulfatados no carbono 6. É o único GAG que não possui grupo carboxila (Ghatak et al., 2015; Köwitsch et al., 2018; Pomin and Mulloy, 2018) (Figura 1.13).

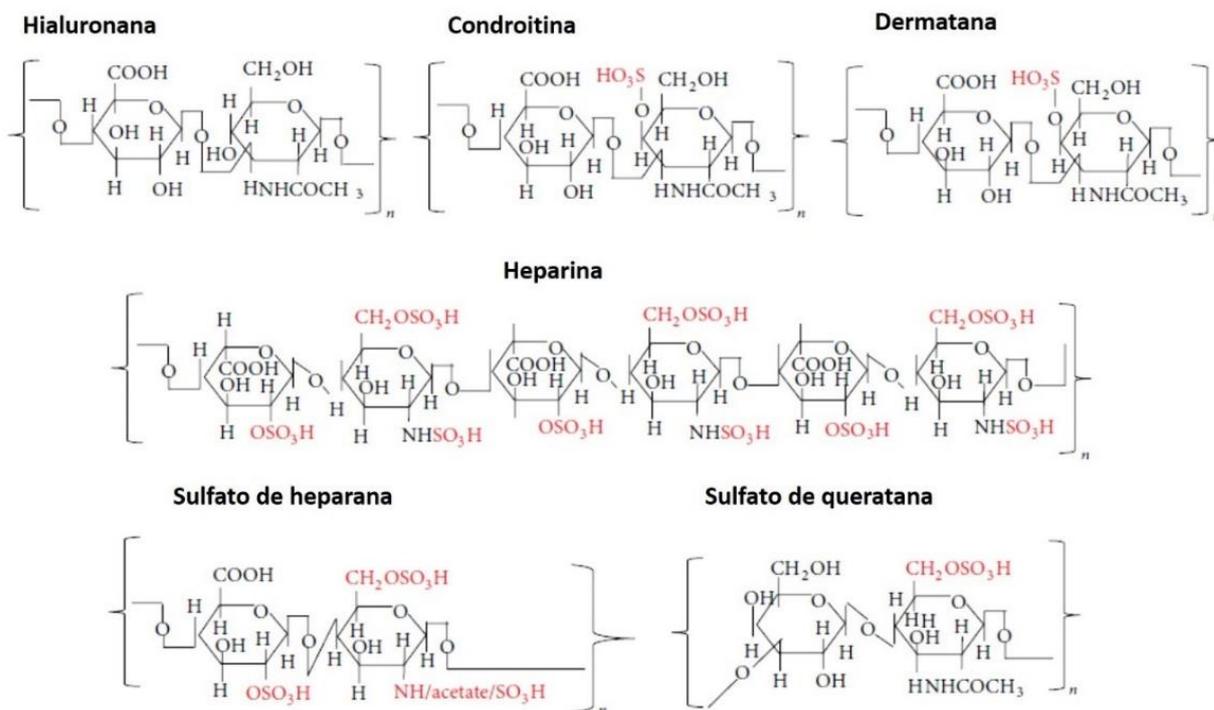


Figura. 1.13 – Estruturas de dissacarídeos repetidos de diferentes glicosaminoglicanos (Ghatak et al., 2015).

Todos os GAG's são covalentemente ligados a uma proteína central, com exceção do GAG hialuronana. Essas proteínas altamente glicosiladas são denominadas proteoglicanos (PG). Os PG são distintos de outras glicoproteínas pela natureza, de acordo com a sua quantidade e arranjo das cadeias laterais de açúcares. GAG's e proteoglicanos podem se associar para formar complexos poliméricos ainda maiores na MEC. Cadeias de GAG's associados a uma proteína central podem formar géis de tamanho de poro e densidade de cargas variados (Ghatak et al., 2015; Prydz, 2015).

Proteoglicanos possuem um papel importante na composição da MEC, atuando como correceptores e sendo mediadores da sinalização química entre as células também como correceptores. Os PG se ligam a várias moléculas sinalizadoras que são secretadas, como fatores de crescimento, exercendo o papel no aumento ou na inibição da sua atividade. PG também se associam e regulam outras atividades de proteínas secretadas, como as proteases e seus inibidores. A ligação de proteases a PG permite controlar a degradação de outros componentes de MEC, como o colágeno (Iozzo and Schaefer, 2015; Schaefer and Schaefer, 2010)

GAGs interagem com proteínas em muitos sistemas biológicos e como consequência, são utilizados com fins terapêuticos. GAG's são largamente utilizados como anticoagulantes e antitrombóticos (Sobczak et al., 2018). A heparina é o GAG

mais utilizado para fins terapêuticos. É utilizado em tratamentos de doenças tromboembólicas, sendo um potente anticoagulante (Page, 2013). O condroitin sulfato e o ácido hialurônico também são potenciais terapêuticos. O CS atua em casos de osteoartrite e osteoporose, devido ao seu importante papel na cartilagem e em outros tecidos conjuntivos (Köwitsch et al., 2018). Já o ácido hialurônico, devido a sua propriedade físico-química e capacidade de formar géis, participa na medicina regenerativa com a formulação de hidrogel. O queratan sulfato pode ser empregado como colírio no tratamento de disfunção visual. Esse GAG é um dos principais componentes funcionais da córnea (Köwitsch et al., 2018; Prydz, 2015). Além disso, o ácido hialurônico tem potencial para ser utilizado com fins terapêuticos, com resultados promissores em modelos *in vitro* e *in vivo* para o quadro de cicatrização e fibrose (Ghatak et al., 2015).

1.7 – Fibroblastos cardíacos (FC).

Fibroblastos são células de origem mesenquimal, sendo uma das principais células efetoras de componentes de MEC e mediadores bioquímicos, assim como fatores de crescimento e proteases. Apesar da síntese e deposição de MEC ser uma característica-chave dos fibroblastos, isso não define de fato na identificação deste tipo celular. Fatores morfológicos, capacidade proliferativa e fenotípica também definem o fibroblasto (Doppler et al., 2017; Furtado and Hasham, 2017; Krenning et al., 2010).

Marcadores específicos são utilizados para identificar os fibroblastos. A proteína vimentina é frequentemente utilizada como marcador para fibroblasto, no entanto, essa proteína é expressa em diversos tipos celulares, tais como células endoteliais. O marcador CD90 (Thy1), comumente utilizado para marcar fibroblastos, é expresso também por células imunológicas e pericitos. A proteína específica do fibroblasto 1 (FSP1) tem sido muito utilizada como marcador específico para fibroblastos. No entanto, o FSP1 e a proteína A4 que se liga ao cálcio, o S100 denominando S100a4, estão mais associados a células imunológicas que fibroblastos. O marcador mais robusto de fibroblasto é o receptor de domínio discoidina 2 (DDR2), presente apenas em fibroblastos, excluindo células endoteliais, de músculo liso e os miócitos (Moore-morris et al., 2016; Tallquist and Molkenin, 2017).

No tecido cardíaco, o fibroblasto é o único tipo celular que não está associado a uma membrana basal. Os fibroblastos cardíacos são as principais células efetoras da fibrose, sendo responsáveis pela síntese e secreção de MEC (Shinde and

Frangogiannis, 2014). São células residentes do miocárdio originadas a partir de células epicárdicas. Essas células dão origem a células epiteliais que irão sofrer a transição epitélio-mesênquima (EMT), processo biológico no qual células polarizadas interagem com a membrana basal, disparando mudanças bioquímicas, e originando células mesenquimais, o que proporciona capacidade migratória, invasão, elevada resistência a apoptose e produção de componentes de matriz extracelular (Kalluri and Weinberg, 2009). Células endoteliais também dão origem a células mesenquimais através da transição endotélio-mesênquima (EndMT) (Ma et al., 2017). No desenvolvimento do miocárdio, um subconjunto dessas células mesenquimais adquire propriedades migratórias e invade o tecido cardíaco, ocupando a posição intersticial entre cardiomiócitos, e tornando-se fibroblastos residentes (Figura. 1.14) (Deb and Ubil, 2014; Krenning et al., 2010).

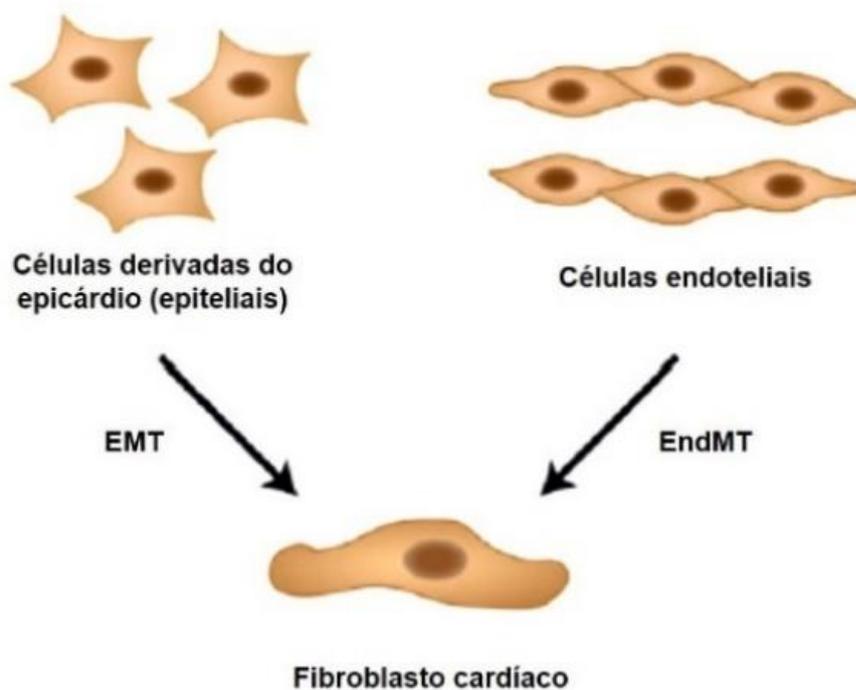


Figura 1.14 – Origem do fibroblasto cardíaco. Na fase embrionária, fibroblasto cardíaco tem sua origem a partir de células epiteliais através da transição epitélio-mesenquimal (EMT). Outro tipo celular importante no desenvolvimento do fibroblasto é o endotélio, através da transição endotélio-mesenquimal (EndMT) (Krenning et al., 2010).

Uma das funções primárias do fibroblasto cardíaco é a manutenção, homeostase e a integridade da matriz extracelular, incluindo o remodelamento e renovação de componentes de matriz extracelular com a deposição de colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos. A rede de MEC é importante porque estoca citocinas e fatores de crescimento que auxiliam na fisiologia e no fenótipo de células cardíacas. A MEC proporciona sinais mecânicos para cardiomiócitos, fibroblastos

cardíacos e células do vaso sanguíneo no miocárdio (Doppler et al., 2017; Fujii and Nagai, 2014; Tallquist and Molkenin, 2017). Fibroblastos cardíacos são células não-excitáveis, no entanto, contribuem para a eletrofisiologia cardíaca. Fibroblastos cardíacos possuem uma alta resistência a membrana celular, o que torna esse tipo celular um bom condutor de sinais elétricos (Krenning et al., 2010). Além de produzir MEC, fibroblastos cardíacos também sintetizam proteínas que regulam a matriz como MMPs - que degradam proteínas de MEC e TIMPs - proteínas que inibem a ação das MMPs. O balanço entre MMPs e TIMPs permite a homeostase do tecido cardíaco (Figura.1.15) (Ivey and Tallquist, 2016; Shinde and Frangogiannis, 2014).

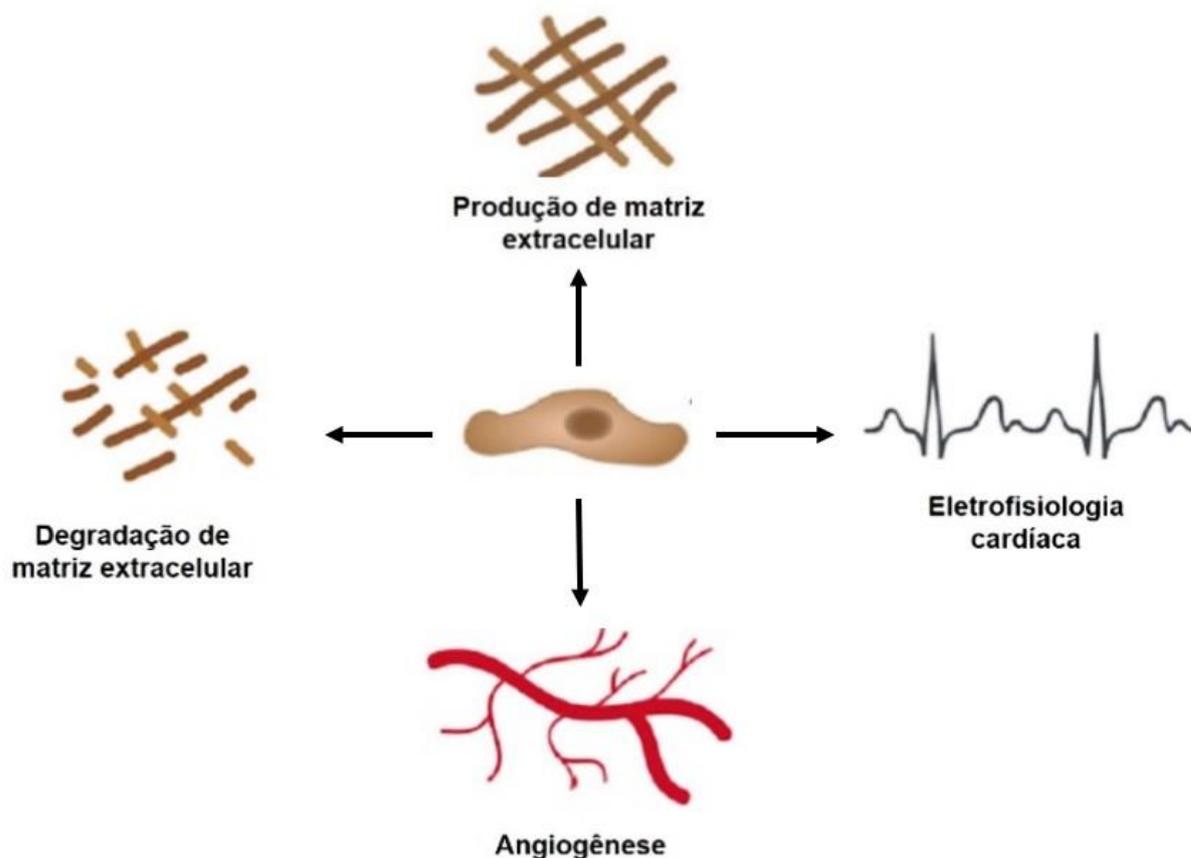


Figura. 1.15 – Funções do fibroblasto cardíaco. Fibroblastos cardíacos apresentam diversas funções no coração no qual favorecem ao desenvolvimento e função do órgão. Fibroblastos cardíacos estão envolvidos na produção e degradação de MEC. FC secretam vários mediadores bioativos no qual influenciam a angiogênese e a proliferação de miócitos. Fibroblastos cardíacos também influenciam na eletrofisiologia cardíaca transmitindo sinais elétricos no tecido (Krenning et al., 2010).

Além disso, os fibroblastos cardíacos também estão em constante comunicação celular com cardiomiócitos, incluindo atividade elétrica e conexão com cardiomiócitos via junções gap (constituídas de conexinas Cx40, Cx43, Cx45). Assim, os fibroblastos são células essenciais para condução elétrica do coração. Os fibroblastos cardíacos também produzem fatores de crescimento e citocinas que promovem sinalização intercelular com outros fibroblastos cardíacos, células

endoteliais ou células de músculo liso, modulando eventos como angiogênese, proliferação celular, hipertrofia de cardiomiócitos ou apoptose (Fan et al., 2012).

Quando o tecido cardíaco sofre uma injúria, células cardíacas secretam fatores que estimulam a formação de fibroblastos cardíacos residentes, transformação de células endoteliais ou epiteliais para FC ou o recrutamento de células hematopoiéticas originadas a partir de células da medula óssea para o local da injúria resultando em transformação de fibroblastos cardíacos para miofibroblastos (Fan et al., 2012; Hinz, 2015). Miofibroblastos são células contráteis que possuem uma motilidade maior, tendo como principal função uma forte capacidade de síntese de proteínas de MEC. Miofibroblastos não são encontrados no miocárdio saudável, estando presentes somente no caso de injúria cardíaca. Miofibroblastos expressam marcadores específicos que estão ausentes em FC, como a α -actina de músculo liso (α -SMA), uma proteína de citoesqueleto envolvida na contratilidade celular. Fatores de crescimento como o TGF- β 1, citocinas TNF- α e IFN- γ , e a própria MEC promovem a transformação de FC para miofibroblastos. Essa mudança de FC para miofibroblastos muda o balanço da MEC, levando ao aumento na síntese e deposição de componentes de MEC característicos da fibrose, que podem substituir os miócitos e/ou interromper interações miócito-miócito no miocárdio prejudicando a função cardíaca (Darby and Laverdet, 2014; Hinz, 2015; Travers et al., 2017).

1.8 – Fibrose cardíaca.

A fibrose cardíaca, caracterizada pela expansão do interstício através do acúmulo de proteínas formadoras de rede na MEC, é uma doença que acomete diferentes órgãos, constituindo causa majoritária de morbidade e mortalidade. A fibrose consiste em acumulação progressiva de tecido conjuntivo e excessiva deposição de colágeno, resultando em uma substituição da arquitetura normal do tecido e conseqüentemente perda da função. Desbalanços decorrentes entre a produção e a degradação de MEC, levam ao surgimento do quadro fibrótico com a substituição gradual do tecido funcional por tecido conjuntivo, em um processo regido por citocinas e fatores de crescimento solúveis que regulam a migração, proliferação e diferenciação celular (Bujak and Frangogiannis, 2007; Frangogiannis, 2018; Ilić et al., 2004; Ma et al., 2018).

Macromoléculas presentes na MEC, tais como cadeias laterais de GAG's de PG são muito importantes no processo de cicatrização quando ocorre o processo de injúria tecidual. Mecanismos de cicatrização tecidual desregulados e crônicos podem

disparar a ativação de mecanismos fibrogênicos, convergindo para um modelo de inflamação, estimulando componentes de MEC, síntese de mediadores solúveis, falha na regeneração tecidual e por fim, o desenvolvimento da fibrose (Ghatak et al., 2015).

O desenvolvimento da fibrose ocorre durante processos fisiológicos de remodelamento após danos teciduais causados por lesões de diferentes origens, incluindo agentes patológicos. Em muitos casos, a fibrose no coração é resultante de um processo de reparo tecidual ativado por danos em cardiomiócitos. Corações de mamíferos adultos apresentam uma baixa capacidade regenerativa, e com isso a perda no número de cardiomiócitos aciona o processo de reparo, conduzindo a formação de tecido fibroso com a deposição de novas fibras no local da lesão. Em casos de infarto no miocárdio, cardiomiócitos iniciam um intenso processo inflamatório com uma substituição de regiões que apresentam morte celular e cicatrização constituídas por fibras de colágeno (Frangogiannis, 2018; Kong et al., 2014).

Existem 3 formas distintas de fibrose cardíaca, a fibrose de substituição, a intersticial e a perivascular. A fibrose cardíaca de substituição é desencadeada pela geração de tecido cicatricial fibroso em áreas necróticas de cardiomiócitos. A fibrose intersticial encontra-se presente no endomísio e perimísio, com a deposição de proteínas estruturais de MEC, desempenhando papel patogênico no coração (Figura. 1.16). A fibrose perivascular está associada com o comprometimento do fluxo sanguíneo coronariano (Frangogiannis, 2018) (Figura.1.17).

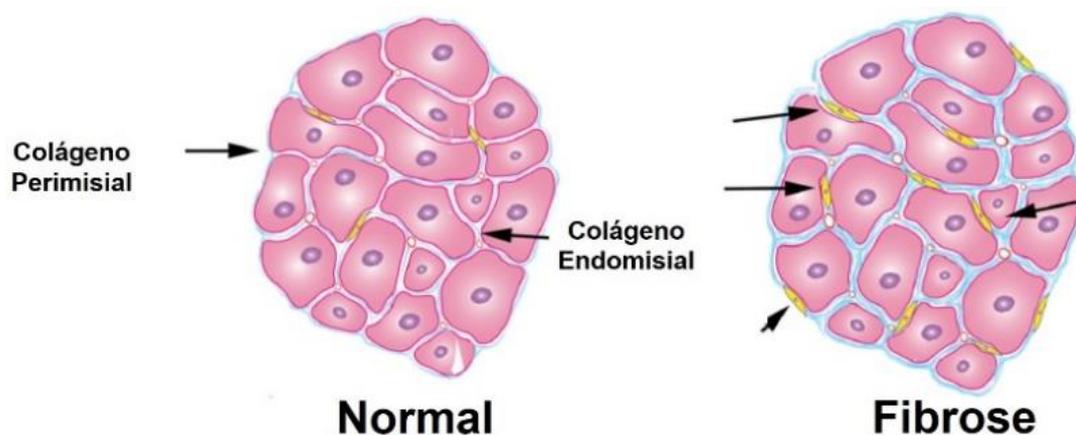


Figura. 1.16 – Fibrose intersticial em tecido cardíaco. No miocárdio normal, proteínas da MEC fornecem suporte estrutural e contribui para a transmissão da atividade contrátil. Em corações fibróticos, a infiltração de fibroblastos (setas) aumenta a deposição de componentes de MEC no endomísio e perimísio (Dobaczewski and Frangogiannis, 2009).

A fibrose cardíaca é caracterizada pelo aumento exacerbado de proteínas de matriz extracelular no miocárdio. Diversas condições podem induzir fibrose cardíaca, incluindo hipertensão e infarto do miocárdio, idade, obesidade e agentes infecciosos

como o *T. cruzi*. Pacientes com doença de Chagas crônicos sintomáticos também frequentemente apresentam esta patologia (Bujak and Frangogiannis, 2007; Travers et al., 2017).

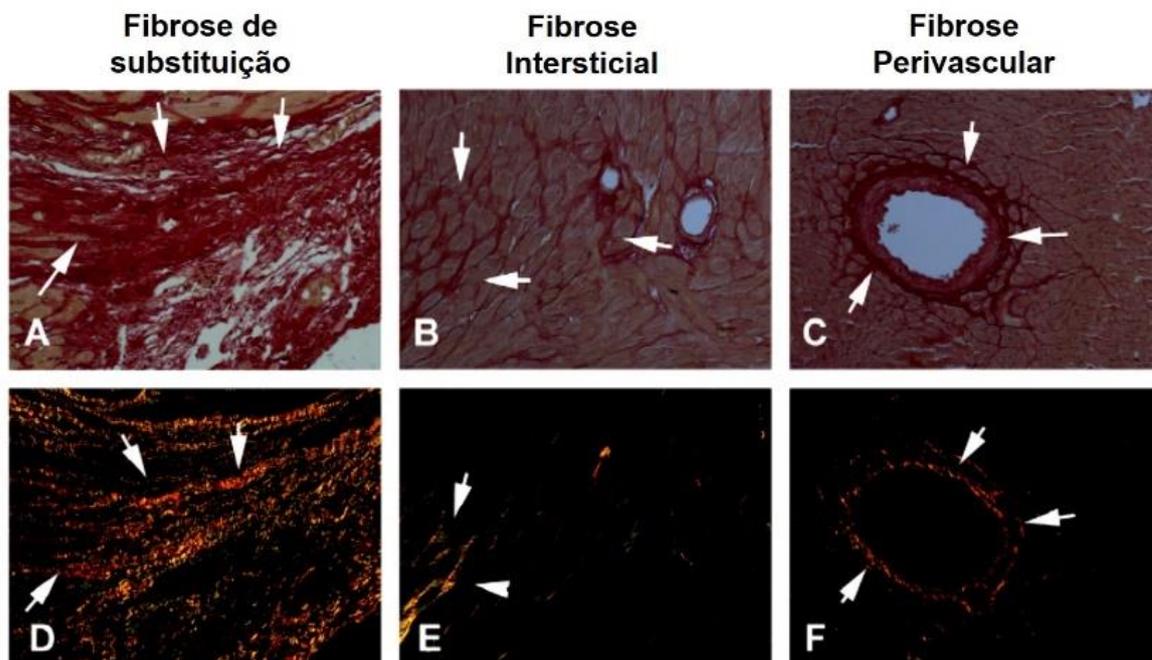


Figura. 1.17 – Tipos de fibrose cardíaca. A-C: Seções observadas por microscopia de luz e D-F: microscopia polarizada. O infarto no miocárdio está associado à morte súbita de cardiomiócitos. A e D: Devido a capacidade regenerativa ser insignificante, a região de injúria se recupera através do processo de cicatrização à base de colágeno (fibrose de substituição – setas). B-C, E-F: Sobrecarga no ventrículo esquerdo resultando na expansão do endomísio e na rede de colágeno perimisial (B e E: fibrose intersticial – setas) e na deposição de colágeno ao redor dos vasos (E e F: fibrose perivascular – setas) (Frangogiannis, 2018).

O miocárdio é um músculo cardíaco composto por cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos, células endoteliais, células de músculo liso e matriz extracelular. A ativação de fibroblastos cardíacos é comum em condições fibróticas miocárdicas, em perturbações fisiopatológicas, desencadeando no aumento da deposição intersticial de componentes de MEC, afetando profundamente as propriedades físicas e biológicas dos cardiomiócitos (Frangogiannis, 2018; Ma et al., 2018). Em condições patológicas no miocárdio, o remodelamento tecidual ocorre após a quebra da rede de matriz extracelular que interrompe conexões entre as células presentes no miocárdio e entre os vasos sanguíneos, comprometendo assim a integridade estrutural e o funcionamento do coração (Fan et al., 2012).

1.9 – Fibrose cardíaca na doença de Chagas.

Quando o paciente infectado com *T. cruzi* apresenta a forma cardíaca na fase crônica da doença de Chagas, este desenvolve fibrose no miocárdio. O aumento na

deposição de proteínas de matriz resulta em uma modificação estrutural no tecido. O ventrículo esquerdo de pacientes infectados com *T. cruzi* encontra-se comprometido já que ocorre um aumento na espessura da parede ventricular, acarretando em alterações elétricas no miocárdio (Tassi et al., 2014).

A instalação da fibrose na doença de Chagas inicia-se ainda na fase aguda da doença, com uma intensa miocardite em decorrência da infecção pelo *T. cruzi*, sendo esse evento um momento inicial para a ativação de sinais fibrogênicos no miocárdio. Com a infecção de células do miocárdio pelo *T. cruzi*, células do infiltrado inflamatório como macrófagos e leucócitos são ativados para o local da lesão e liberam mediadores inflamatórios para a promoção do reparo tecidual (Soares et al., 2010).

Mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas derivadas de células sanguíneas como plaquetas ou células epiteliais, proteases como metaloproteinases de matriz (MMPs), e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), contribuem para o processo fibrogênico. Entre eles, o TGF- β , TNF- α e o IFN- γ , que encontram-se aumentados no soro, são considerados interruptores moleculares com o desenvolvimento de uma miocardite crônica e fibrose em pacientes portadores da doença de Chagas (Deb and Ubil, 2014; Ferreira et al., 2016b, 2019; Guedes et al., 2009).

MMPs e TIMPs mantêm a homeostase tecidual com a manutenção da integridade da matriz extracelular e contribuem também no desenvolvimento de quadros patológicos. Em uma lesão cardíaca, células do infiltrado inflamatório juntamente com cardiomiócitos, liberam MMPs que degradam proteínas de matriz extracelular, favorecendo a migração e a motilidade de fibroblastos cardíacos para o local da lesão, propiciando o processo de remodelamento tecidual com a deposição de proteínas de MEC (Shinde and Frangogiannis, 2014).

1.10 – Terapia anti-fibrose: Alvos potenciais para intervenção contra fibrose cardíaca na doença de Chagas.

Vias de sinalização disparadas por citocinas como TNF- α , IFN- γ e TGF- β podem estar modulando a síntese de componentes de matriz extracelular como colágeno e fibronectina, que são abundantes na fibrose cardíaca na doença de Chagas. Vias alternativas incluem vias de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), tais como quinases relacionadas a sinais extracelulares (ERK1 e ERK2), quinases N-terminal c-Jun (JNK1, JNK2, JNK3) e a p-38MAPK assim como a família Rho de pequenas GTPases, proteína quinase C (PKC), fosfoinositol-

3-quinase (PI3K) e NF- κ B são importantes no processo de remodelando tecidual (Drabsch Y et al., 2012; Moustakas A et al., 2005). Vias de MAPK tais como p38 e c-Jun, que são ativadas por IFN- γ , TNF- α e TGF- β , podem estar atuando conjuntamente para o remodelamento de componentes de matriz extracelular acarretando no quadro da fibrose cardíaca chagásica, sendo a via de p38 especificamente implicada na regulação da fibrose cardíaca (AR et al., 2008).

O TGF- β é uma citocina importante no desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas. Em um modelo pré-clínico estabelecido em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, que reproduz características clínicas relevantes na CCC, é observado que o tratamento com GW788388, um inibidor seletivo do T β R1/ALK5 é importante para o tratamento contra a fibrose cardíaca na doença de Chagas. A administração desse composto em camundongos infectados pelo *T. cruzi* após 120 dpi, quando a fibrose se encontra estabelecida, promove uma melhoria na frequência cardíaca, uma redução dos eventos AVBII, reverte a fibrose cardíaca instalada no tecido, reduz anormalidades elétricas e aumenta a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. O tratamento com GW788388 foi capaz de interferir também na via MMP/TIMP e com isso promover a regeneração do tecido cardíaco com a deposição de novas células cardíacas (de Oliveira et al., 2012).

A ação de inibidores contra as vias de MAPK seriam cruciais para impedir a progressão da fibrose cardíaca na doença de Chagas. Pirfenidona, losmapimod e SP600125, são inibidores importantes porque inibem majoritariamente vias de sinalização como p38 MAPK e c-Jun, podendo estas vias estarem relacionadas com a progressão da fibrose cardíaca na doença de Chagas.

A pirfenidona é um inibidor utilizado atualmente na clínica para o tratamento da Fibrose Pulmonar Idiopática (FPI), possuindo atividade anti-fibrótica eficaz em diversos órgãos como o pulmão, o fígado, rins, coração e bexiga. A droga é sintética, administrada por via oral, e inibe a progressão da fibrose, sendo classificada como imunossupressora. A pirfenidona reduz a bioatividade de TGF- β ao reduzir expressão de RNAm de TGF- β 2 e o processamento de pró-TGF- β em células CCL-64 (Burghardt et al., 2007). A Pirfenidona também suprime TNF- α por um mecanismo independente da ativação de MAPK 2, p38 MAPK e c-Jun (JNK) (Nakazato et al., 2002). As propriedades antioxidantes da pirfenidona podem contribuir para seu efeito anti-inflamatório e em conjunto atuar com efeito anti-fibrótico (Kim and Keating, 2015; Lancaster et al., 2017).

Losmapimod (GW856553) é um inibidor seletivo, reversível, que compete com a adenosina trifosfato (ATP) na ligação a p38 MAPK α/β . O inibidor específico da p38 MAPK passou por ensaios clínicos para tratamento de cardiomiopatias e remodelamento após infarto, com uma melhoria no prognóstico dos pacientes (LK et al., 2014). A inibição da via de p38 MAPK é um alvo terapêutico, uma vez que essa via é importante para a progressão do quadro inflamatório. A proteína p38 MAPK é uma molécula de sinalização-chave no qual responde a estímulos externos em condições de estresse e por injúrias ocasionadas por outras patologias (Fisk et al., 2018; Pascoe et al., 2017).

A via de JNK possui importância no desenvolvimento de patologias cardíacas. Em condições cardíacas como doenças coronárias, falha cardíaca, aneurisma aórtica, presença do tecido adiposo em torno do coração e soro de pacientes, apresentaram elevada atividade da via de JNK (Sabapathy, 2012). O inibidor SP600125 é um antrapirazole, inibidor catalítico da via de JNK, reversível e eficaz nas 3 principais isoformas (JNK1, JNK2 e JNK3) apresenta uma maior especificidade para terapia quando comparados com outros inibidores de JNK. (Bogoyevitch and Arthur, 2008; Wu et al., 2011). O tratamento em camundongos com SP600125 promove uma melhoria na fração de ejeção do ventrículo esquerdo e uma redução da fibrose no miocárdio. (Wu et al., 2011).

Ensaio de triagem de compostos com enfoque em reversão de fibrose induzido pela infecção pelo *T. cruzi* nunca receberam atenção ou investimento e são estratégias inovadoras fundamentais para identificar agentes anti-fibróticos que potencialmente possa reverter o quadro instalado durante a cardiomiopatia chagásica crônica e possam ser utilizados em combinação com drogas anti-parasitárias. O tratamento de fibroblastos cardíacos humanos com pirfenidona, losmapimod e SP600125 representam grande potencial para terapia anti-fibrose.

1.11 – Justificativa

A doença de Chagas ainda atinge cerca de 10 milhões de pacientes com cerca de 25 milhões de pessoas sob risco de contrair a doença (WHO, 2012). Modelos de simulação da carga econômica causada pela doença de Chagas calculam custos globais de 7,19 bilhões de dólares por ano. Cerca de 10% desses custos emanam dos EUA e Canadá, em uma indicação de que a doença de Chagas tem se expandido a áreas não endêmicas. Uma proporção substancial deste fardo econômico emerge da perda de produtividade e da mortalidade precoce causadas pela cardiomiopatia

chagásica. O ônus econômico da doença de Chagas é semelhante ou superior ao de outras doenças globalmente importantes como rotavírus ou câncer do colo do útero, levantando um argumento econômico para mais atenção e esforços para o controle da doença de Chagas (Lee et al., 2013). Muitos estudos têm abordado a fase aguda da doença de Chagas, no entanto, pouca atenção tem sido dada à fase crônica, quando há o desenvolvimento da fibrose cardíaca. Diversas evidências mostram que a fibrose cardíaca está diretamente relacionada à patogenia da doença de Chagas. Cães infectados com *T. cruzi* desenvolvem cardiomiopatia crônica, com intensa fibrose no miocárdio associada a alterações eletrocardiográficas (Caldas et al., 2013), pacientes crônicos apresentam aumento de QRS no eletrocardiograma que está correlacionado com a cicatrização excessiva do miocárdio (Strauss et al., 2011), e há uma relação estatística entre fibrose detectada por ressonância magnética cardíaca e arritmias ventriculares em pacientes com doença de Chagas (Tassi et al., 2014), mostrando que a fibrose prejudica diretamente a funcionalidade do coração na infecção com *T. cruzi*. No entanto, essa condição ainda não possui tratamento eficaz, assim como seus mecanismos subjacentes ainda precisam ser mais bem esclarecidos. Além disso, linhagens de fibroblastos dérmicos têm sido tradicionalmente utilizadas como modelo de estudo da interação *T. cruzi*-célula hospedeira (Andrade and Andrews, 2005), mas o papel de fibroblastos cardíacos, considerados como células efetoras no processo de fibrose cardíaca (Leask, 2007), nunca foi estabelecido na doença de Chagas e não há um modelo disponível de triagem de compostos especificamente contra esta condição. A fibrose está relacionada com a ação de citocinas que são secretadas durante o processo inflamatório. Dados abordam uma grande variação na resposta imunológica frente à infecção pelo *T. cruzi* através da participação especificamente de citocinas como TGF- β , TNF- α e IFN- γ . Assim, na busca de novos alvos terapêuticos, a interação de TGF- β , TNF- α e IFN- γ com seus receptores específicos, acionam vias de sinalização da família SMAD e MAPK, podendo estar atuando no remodelamento tecidual com a deposição de componentes de MEC como a fibronectina e colágeno em diferentes tipos celulares. A ação de compostos como a pirfenidona, losmapimod e SP600125 podem ser candidatos alvos para a produção de fármacos que sejam eficazes contra a fibrose cardíaca em pacientes portadores da doença de Chagas, que desenvolvem a cardiomiopatia chagásica crônica.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 – Geral:

Análise da resposta fibrogênica de diferentes tipos celulares durante a infecção pelo *T. cruzi* e prospecção de fármacos contra a fibrose cardíaca na doença de Chagas.

2.2 – Específicos

- I. Avaliar o efeito da infecção pelo *T. cruzi* na distribuição e expressão de MEC em fibroblastos cardíacos, comparando com resultados obtidos no coração (cardiomiócitos) e células de músculo esquelético, em modelos *in vitro* de infecção pelo *T. cruzi*;
- II. Examinar a resposta de fibroblastos e mioblastos esqueléticos, infectados ou não com *T. cruzi*, na síntese de MEC após estímulo com TGF- β , comparando com cardiomiócitos;
- III. Analisar o papel da via de sinalização clássica e alternativa de TGF- β no remodelamento de MEC em cardiomiócitos, fibroblastos e mioblastos esqueléticos infectados ou não pelo *T. cruzi*;
- IV. Investigar o papel de TNF- α , IFN- γ , e da estimulação parácrina de células infectadas na síntese de matriz extracelular e proliferação de fibroblastos cardíacos durante a infecção pelo *T. cruzi* (assim como avaliar as vias de sinalização envolvidas neste processo);
- V. Estabelecer modelos de triagem de compostos anti-fibrose *in vitro* com culturas de fibroblastos cardíacos através da medida de expressão de matriz extracelular e da proliferação celular após infecção com *T. cruzi* e/ou tratamento com citocinas ou meio condicionado por células infectadas;
- VI. Investigar o efeito de inibidores de MAPK e glicosaminoglicanos sobre a deposição de colágeno e fibronectina em fibroblastos cardíacos estimulados pela infecção pelo *T. cruzi* direta ou indiretamente;
- VII. Analisar o efeito *in vivo* de inibidores de p38 MAPK e JNK sobre a instalação e desenvolvimento de fibrose cardíaca em camundongos na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Cultura primária, manutenção das cepas de parasitas e linhagens celulares.

3.1.1 – Cultura primária de cardiomiócitos: Células musculares cardíacas foram obtidas de embriões de camundongos (Meirelles et al., 1986). Fêmeas grávidas de camundongos Swiss com 18 dias de gestação foram submetidas à eutanásia em câmara mortuária contendo dióxido de carbono (CO₂) e fixadas na placa de contenção (placas de cortiça) com a região ventral voltada para cima. Após assepsia com álcool 70%, a pele foi removida expondo a cavidade peritoneal. O útero contendo os embriões foi retirado e transferido para placa de Petri contendo solução Ringer (NaCl 154 mM, KCl 3,35 mM, CaCl₂ 1,7 mM, pH 7,0). Dentro da cabine de segurança biológica, os embriões foram decapitados e seus corações removidos. Os átrios foram separados dos ventrículos, e apenas os ventrículos foram então fragmentados. O tecido fragmentado foi lavado em solução PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 0,88 mM, Na₂HPO₄ 6,4 mM, pH 7,2) e submetido à dissociação enzimática sequencial (solução PBS contendo tripsina 0,025% e colagenase 0,01%). As células isoladas foram quantificadas em câmara de Neubauer e semeadas na densidade de 2 x 10⁶ ou 4x10⁶ em garrafas de 25 - 75 cm² respectivamente. Todos os frascos foram previamente revestidos com gelatina 0,01%. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (1% de penicilina). O meio nutritivo foi trocado a cada 2 dias. Todos os protocolos que envolvem o manuseio de animais experimentais na FIOCRUZ receberam aprovação do CEUA (registro LW-37/13).

3.1.2 – Cultura primária de fibroblastos cardíacos: Fibroblastos cardíacos (FC) foram purificados a partir de sucessivas passagens de culturas primárias de cardiomiócitos semeadas em frascos de cultura de 75 cm². Inicialmente foi realizado o revestimento dos frascos de cultura de 75cm² com gelatina 0,01% por 15 minutos à 4°C na geladeira; e em seguida a gelatina foi removida e o frasco de cultura foi secado na estufa à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 15 minutos. A expansão e purificação dos fibroblastos cardíacos foi realizada pela dissociação enzimática de culturas confluentes com solução de tripsinização (0,0025% de Tripsina, 0,01% de EDTA em PBS). Cardiomiócitos possuem adesão mais lenta que os FC. Assim, após 10 min de adesão na estufa, os cardiomiócitos não aderidos foram removidos com a

remoção do sobrenadante, enquanto fibroblastos permaneceram aderidos, resultando em uma purificação por adesão diferencial. As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (1% de penicilina) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Os cardiomiócitos remanescentes não resistem a sucessivas passagens enquanto os FC se proliferam. Assim, os FC foram utilizados após a 5ª passagem de dissociação. Após a purificação de FC, foi realizada a dissociação enzimática e as células isoladas foram quantificadas em câmara de Neubauer ao microscópio de luz. Em seguida, as células foram semeadas na densidade de 5x10⁴ células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e 5x10⁵ em placa de 6 poços com 35mm² mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (1% de penicilina) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, para realização de ensaios experimentais.

3.1.3 – Cultivo de linhagens celulares: A linhagem C2C12, de mioblastos de músculo esquelético de ratos (ATCC CRL-1772) foi cultivada em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 10% de SFB, 1 mM de L-glutamina e 1% de penicilina e estreptomicina em garrafas de 75cm². Células Vero, provenientes de rim de macaco verde (ATCC CCL-81), foram cultivadas em meio RPMI com 10% SFB, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Linhagens de mioblastos esqueléticos L6E9 foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 10% de SFB, 1 mM de L-glutamina e 1% de penicilina e estreptomicina em garrafas de 75cm². A expansão das culturas confluentes foi realizada pela dissociação enzimática contendo tripsina 0,0025% e EDTA 0,01% em PBS, pH 7,2. As células C2C12 e Vero foram utilizadas para obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Brazil e Y, respectivamente. A linhagem L6E9 foi utilizada para ensaios de tratamento com TGF-β.

3.1.4 – Parasitos e infecção das culturas: Foram utilizadas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y e cepa Brazil, pertencente ao grupo TcII, derivadas de células Vero e C2C12 respectivamente. O sobrenadante de culturas de células Vero e C2C12 infectadas com a cepa Y e Brazil, 5-6 dias após a infecção, contendo tripomastigotas liberados, foi recolhido em tubos Falcon de 50mL. Os tubos contendo *T. cruzi* foram centrifugados por 5 min a 1000 rpm para remoção de debris celulares. Após a remoção

dos debris celulares, foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos à 4°C. Em seguida, os parasitos foram ressuspensos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (1% de penicilina). Foi feita uma diluição de 1:100 para contagem dos parasitos na câmara de Neubauer. FC de cultura primária e FC humano foram infectados numa multiplicidade de infecção de 10 parasitos/célula hospedeira (10:1) após 24h de cultivo. A infecção foi interrompida após 72h.

3.2 – Tratamento *in vitro* com citocinas

3.2.1 – Ensaio para análise de proteínas de matriz extracelular: Culturas primárias de FC murinos foram plaqueadas em placas de 6 poços de 35mm² numa densidade de 50x10⁴ células/poço e mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 10% de SFB, 1 mM de L-glutamina e 1% de solução de penicilina e estreptomicina. Após o plaqueamento, as culturas foram infectadas com *T. cruzi* da cepa Y numa razão 10:1. Após 24h de infecção, as culturas não infectadas e infectadas de FC foram lavadas em solução de ringer para remover o SFB contido no meio. O tratamento foi realizado com TGF-β recombinante (R&D), TNF-α e IFN-γ diluído em DMEM suplementado com 0,1% SFB, 2,5 mM de CaCl₂ e 2% L-glutamina. O TGF-β foi adicionado nas culturas em concentrações de 1 ng/mL e 10 ng/mL, enquanto TNF-α e IFN-γ foram adicionados nas concentrações de 10, 50 e 100 ng/mL após 24h de infecção. O tratamento com a citocina foi realizado por 48h após 24h de infecção pelo *T. cruzi*. Após 72h de infecção e 48 h de estímulo, as culturas de FC foram processadas para imunofluorescência indireta ou *western blot* para visualização e detecção de fibronectina. (Figura 3.1).

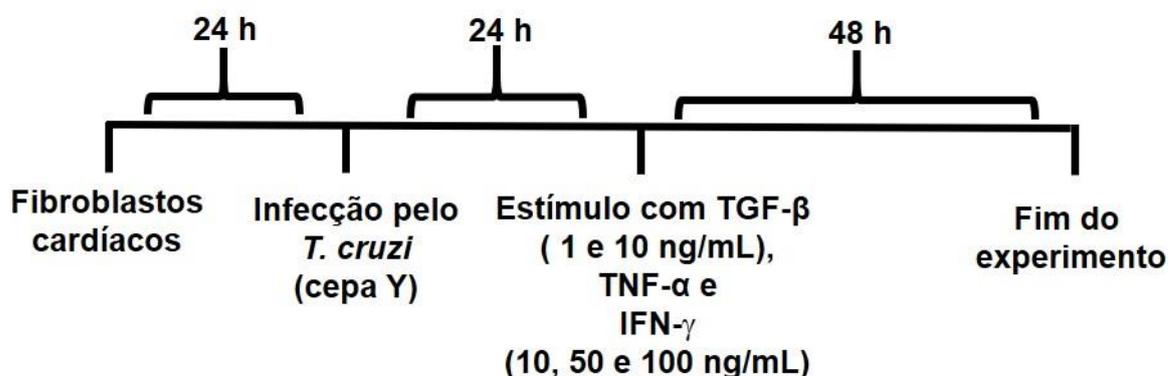


Figura 3.1 – Desenho experimental em fibroblastos cardíacos.

Culturas primárias de mioblastos esqueléticos foram plaqueadas em placas de 6 poços de 35mm² numa densidade de 50x10⁴ células/poço e mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 10% de SFB, 1 mM de L-glutamina e 1% de solução de penicilina e estreptomicina. Após o plaqueamento, as culturas foram infectadas com *T. cruzi* da cepa Y numa razão 10:1. Após 24h de infecção, as culturas não infectadas e infectadas de mioblastos L6E9 foram lavadas em solução ringer para remover o SFB contido no meio e foi adicionado o TGF- β recombinante (R&D), diluído em DMEM suplementado com 0,1% SFB e 2% L-glutamina em concentrações de 1 ng/mL e 10 ng/mL por 48 h. Após 72h de infecção e 48 h de estímulo, as culturas de mioblastos L6E9 foram processadas para imunofluorescência indireta ou *western blot* para visualização e detecção de fibronectina como detalhado a seguir (Figura 3.2).

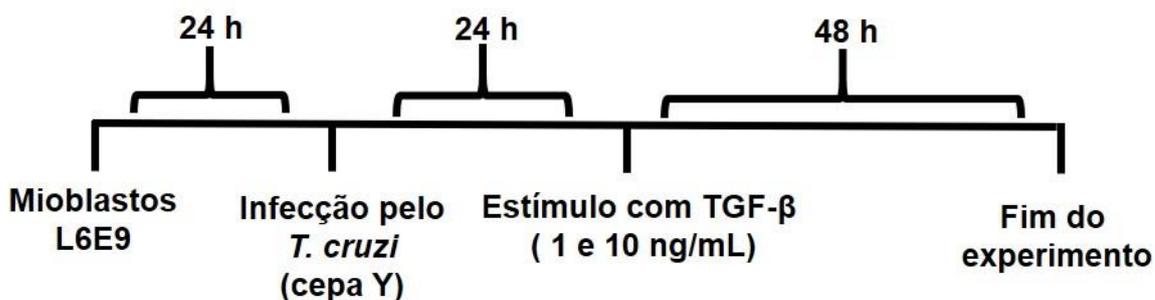


Figura 3.2 – Desenho experimental em mioblastos esqueléticos L6E9.

3.2.2 – Ensaio para análise de proteínas da via de sinalização de SMAD e MAPK:

Para investigar se proteínas da via de sinalização como SMAD, p38 MAPK e c-Jun estariam envolvidas na síntese de MEC, culturas não infectadas de CM, FC e mioblastos L6E9 foram lavadas em solução de Ringer para remover o SFB contido no meio e foram estimuladas com 1 e 10 ng/mL, diluídos em DMEM suplementado com 0,1% SFB, 2,5 mM de CaCl₂ e 2% L-glutamina de TGF- β por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Posterior ao estímulo com a citocina, as culturas foram processadas para *western blot* para detecção de proteínas da via de sinalização de SMAD e p38 MAPK.

Após 72h de infecção, culturas de FC não infectadas e infectadas pelo *T. cruzi* (cepa Y) foram lavadas em solução de Ringer para remover o SFB contido no meio tratadas com SB431542 (inibidor de ALK5, receptor tipo I do TGF- β) em uma concentração de 10 μ g/mL por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, previamente ao estímulo com TGF- β . Em seguida, o TGF- β foi adicionado nas culturas não

infectadas e infectadas pelo *T. cruzi* na concentração de 10 ng/mL. Posterior ao estímulo com a citocina, as culturas foram processadas para detecção de proteínas das vias de sinalização de SMAD (por *western blotting* e imunofluorescência indireta), p38 MAPK e c-Jun (*western blotting*).

Além disso, culturas de FC não infectadas e infectadas pelo *T. cruzi* (cepa Y) foram estimuladas com TNF- α e IFN- α . FC foram lavadas em solução de Ringer para remover o SFB contido no meio e foram estimuladas em uma concentração de 100 ng/ml diluídos em DMEM suplementado com 0,1% SFB, 2,5 mM de CaCl₂ e 2% L-glutamina de TNF- α e IFN- α por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Posterior ao estímulo com TNF- α e IFN, as culturas foram processadas para *western blot* para detecção de proteínas das vias de sinalização p38 e c-Jun MAPK.

3.2.3 – Imunofluorescência indireta: Culturas de cardiomiócitos, mioblastos L6E9 e FC, não infectados ou infectados pelo *T. cruzi* (cepa Y) após 72h de infecção, estimuladas ou não com TGF- β , foram fixadas por 5 min a temperatura ambiente em paraformaldeído (PFA) a 4% diluídos em PBS, e lavadas em PBS. Para bloquear reações inespecíficas, as lamínulas foram lavadas (3 X 20 min) com PBS + 4% BSA. As células foram então incubadas por 18hs à 4°C com anticorpo anti-fibronectina (Sigma Chemical Co.: 1/400) ou anti-Smad 2 fosforilada (1:200; Cell Signaling). Após sucessivas lavagens em PBS, as culturas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado a TRITC (Sigma, 1/200) por 1h à 37°C. Para visualização do núcleo, as células foram coradas com 10 μ g/mL de 4', 6- diamidino-2-phenilyndole (DAPI – corante de DNA) por 5 min protegidos da luz e, em seguida, as lamínulas foram montadas em 2,5% de 1'4-diazabicyclo-(2.2.2)-octane (DABCO; Sigma Chemical Co.) em PBS/ 50% de glicerol, seladas com esmalte e as imagens adquiridas ao microscópio de fluorescência Zeiss Axioimager M1 Apotome ou microscópio confocal de escaneamento a laser Zeiss LSM 510 Meta. A fração da área total do campo ocupada pela coloração FN foi medida usando o software Image J. As imagens brutas foram segmentadas por limites de cores definidos em imagens de amostras de controle, não tratadas e não infectadas. Após a geração das imagens binárias, a porcentagem do total a área do campo coberta pela coloração FN foi medida. Foi observada imunofluorescência para PS2 e adquirido em um Axio Image M2 equipado com sistema Aptome (Olympus).

3.2.4 – Extração de proteínas: Culturas de mioblastos esqueléticos L6E9 e FC normais ou infectados com *T. cruzi* de cepa Y após 72h de infecção, tratados ou não com TGF- β , TNF- α e IFN- γ , foram lavadas por 3X com PBS a 4°C, com as placas também sob gelo. Em seguida, as células foram raspadas em 150 μ l de tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, pH 8.0) contendo coquetéis de inibidores de fosfatases (Sigma Chemical Co.; Cantharidin, (-)-p-Bromolevamisole oxalate e Calyculin A) e de proteases (Sigma Chemical Co.; AEBSF – [4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoridehydrochloride, aprotinina, hidrocloreto de bestatina, E-64–[N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide, Leupeptin hemisulfate salt, Pepstatin A). Alíquotas de 20 μ L foram previamente separadas de cada amostra para dosagem de proteínas pelo método de Folin-Lowry. Ao restante dos extratos, foi adicionado tampão de amostra 5X (0,3 M Tris, 10% SDS, 0,125% Azul de Bromofenol, 25% β -mercaptoetanol, 50% Glicerol) e as amostras foram fervidas em banho seco à 100°C por 5 minutos logo após a extração, para inativação completa de proteases e fosfatases. Todos os extratos foram armazenados a -20°C.

3.2.5. – Dosagem de proteínas: A dosagem de proteínas foi realizada em duplicata para cada amostra, com 4 e 8 μ l do lisado celular, sendo diluídos em água milliQ q.s.p. 200 μ l em tubos eppendorf de 1,5mL. Paralelamente, 10, 20, 30, 40 e 50 μ l de solução de BSA 1mg/mL também foram diluídos da mesma forma para a realização da curva padrão. Foi então adicionado a cada amostra 1mL de solução reativa (0,4% hidróxido de sódio, 2% carbonato de sódio, 0,02% de tartarato de sódio, 0,01% sulfato de cobre). Após agitação em vórtex, os tubos foram incubados por 10 min a temperatura ambiente e 100 μ l do reagente Folin Ciocalteus (Merck) diluído 1:3 adicionado posteriormente. Os tubos foram novamente agitados em vortex e incubados por 30 min a temperatura ambiente. Neste tempo de incubação, as proteínas contidas na amostra reduzem o reagente de Folin tendo o cobre como catalisador, formando um composto colorido que absorve luz linearmente à concentração de proteínas. Como controle negativo, 200 μ l de água foram submetidos a todos o processo, e considerado como “branco” da reação. A absorbância dos compostos formados pelas amostras foi lida utilizando-se cubetas de quartzo em espectrofotômetro Genequant 1300 (G&E Healthcare) em $\lambda=617$ nm. A partir dos pontos da curva padrão, feitos com quantidades conhecidas de proteína, foi calculada a constante N, que equivale a absorbância de 1 μ g de proteína. Para determinação da concentração de proteínas em cada amostra, aplicamos a fórmula:

Concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ da amostra = $(\text{Absorbância obtida na leitura} / N)$
 μl do lisado usados na dosagem

3.2.6– Western Blotting: Após a dosagem de proteínas, proteínas totais obtidas de extratos de culturas de mioblastos esqueléticos L6E9 e fibroblastos cardíacos de cultura primária, normais ou infectados com *T. cruzi*, estimulados ou não com TGF- β , TNF- α e IFN- γ , foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando 10 μg de proteína no gel de 10% para detecção de FN e 20 μg de proteína no gel de 12% contendo SDS (SDS-PAGE) para detecção de proteínas p38 MAPK e c-Jun fosforiladas. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com tampão de bloqueio para fibronectina e colágeno do tipo I (TBS, 5% de leite desnatado (Molico), 0,1% de Tween 20) ou para proteínas da via de sinalização de TNF- α e IFN- γ , (TBS, 1%BSA, 0,1% Tween 20) por 1h na temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-FN diluído 1:5000 (Sigma Chemical Co.), anticorpo anti-p38MAPK fosforilada (Cell Signaling, 1:1000), anti-p-c-JNK (Milipore, 1:500) incubado por 18h à 4°C. As membranas foram então lavadas e, em seguida, incubadas por 1h a temperatura ambiente com anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo conjugados a peroxidase (Pierce Biotechnology), ambos diluídos 1:10.000 em tampão de bloqueio. Anticorpo anti-GAPDH 1:20.000 (RDI Fitzgerald) foi utilizado como controle interno. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS + 0,1%Tween20 3X10 min e a revelação da peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit Super Signal West Pico (Pierce Biotechnology). A densitometria das bandas resultantes foi realizada com o programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Os valores de densitometria foram normalizados, sendo calculado o índice de variação (I.V.) considerando o controle não tratado e não infectado=1.

3.2.7. – Quantificação de colágeno em fibroblastos cardíacos de cultura primária: Culturas de FC de cultura primária foram plaqueadas em placas de 96 poços em placa de fundo chato numa densidade de $1,5 \times 10^4/\text{mL}$, cultivados em meio DMEM suplementado com 8% de SFB, 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl_2 , 1 mM de L-glutamina e antibiótico (1% penicilina) mantidas em garrafas de 75cm², mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Fibroblastos cardíacos não infectados e infectados pelo *T. cruzi* (cepa Y) e estimuladas com TNF- α e IFN- γ entre 24 e 72h foram fixadas em solução de Kahle (4% formaldeído, 30% etanol 2% ácido acético)

por 30 minutos e após o período as culturas foram lavadas e mantidas a 4°C para posterior análise. Após, as culturas de FC terem sido fixadas, o material foi corado com Sirius Red (0,2% em ácido pícrico) / Fast Green (0,2% em ácido pícrico) (Chondrex, # 9046) por 2 horas em câmara úmida. Este método permite a medida semi quantitativa de conteúdo de colágeno e de proteínas totais das células. Após sucessivas lavagens com água destilada, o corante foi extraído das células com tampão de extração fornecido pelo fabricante. O sobrenadante foi transferido para nova placa e a leitura da reação foi realizada em leitor de microplacas Spectramax M2 (Molecular Devices) em λ 540 e 605 nm. Para calcular a quantidade de colágeno, utilizamos as seguintes equações.

$$\text{Colágeno: } \frac{\text{valor de DO } \lambda 540 - (\text{valor de DO } \lambda 605 \times 0,291)}{0,0378}$$

$$\text{Proteínas totais: } \frac{\text{valor de DO } \lambda 605}{0,00204}$$

Os valores estipulados foram determinados por meio de curvas de regressão linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad software).

3.2.8– Proliferação de fibroblastos cardíacos de cultura primária: Fibroblastos cardíacos murinos de cultura primária foram cultivados em meio DMEM suplementado com 8% de SFB, 2% de extrato embrionário, 2,5 mM de CaCl₂, 1 mM de L-glutamina e antibiótico (1% de penicilina) mantidas em garrafas de 75cm², a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Para o ensaio, células foram tripsinizadas e plaqueadas numa densidade de 2x10⁴ células/poço na placa de 96 poços de fundo chato. Após a adesão, FC de cultura primária não infectados ou infectados com *T. cruzi* foram estimulados com TGF- β (1 ng/mL e 10 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL), IFN- γ (10 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL), totalizando 72h de infecção e 48h de estímulo. Após o tratamento, células foram incubadas com partículas de BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine), um nucleosídeo sintético, análogo da timidina, por 2 horas. Após esse tempo, as células foram fixadas com o fixador presente no Kit de proliferação celular (Milipore) por 30 minutos e mantidas secas na temperatura de 4°C, seladas com parafilm, para posterior análise. O material fixado foi lavado com tampão de lavagem presente no Kit de proliferação. Após as lavagens, foi incubado o anticorpo primário anti-BrdU presente no Kit por 1 hora. Após o tempo de incubação, foi lavado 3X com o tampão de lavagem fornecido pelo próprio Kit e em seguida adicionado o

anticorpo secundário anti-mouse 1:2000 em um tampão conjugado do Kit por 30 minutos. Após a incubação, foi lavado 2X com o tampão de lavagem e 1X com água destilada. Por fim, foi adicionado o substrato do Kit por 30 minutos e em seguida o Stop Solution para parar a reação. A proliferação de FC de cultura primária e de linhagem humana foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M2 (Molecular Devices) em λ 450nm.

3.3 – Triagem de compostos *in vitro* em fibroblastos cardíacos humanos imortalizados.

3.3.1 – Cultura de fibroblastos cardíacos humanos imortalizados: Fibroblastos cardíacos humanos imortalizados (FCh) foram obtidos através de doação do Dr. Tamer Mohamed do Gladstone Institute na Universidade da Califórnia em São Francisco (UCSF). As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² em FGM™-3 meio de crescimento de fibroblasto – 3 (FGM-3, Lonza CC-4526) contendo 10% SFB e antibióticos (1%) e fatores de crescimento recomendados pelo fabricante (FGM-3 SingleQuots, Lonza, contendo insulina, fator de crescimento de fibroblasto humano (hFGF), gentamicina e anfotericina), sendo mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A expansão dos fibroblastos cardíacos humanos foi realizada pela dissociação enzimática de culturas confluentes com solução de tripsinização (0,0025% de Tripsina, 0,01% de EDTA em PBS). Posterior a tripsinização, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e semeadas na densidade de 2x10⁴ células/poço em placas de 96 poços ou em placas de 24 poços numa densidade de 5x10⁴ células/poço em meio FGM e foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

3.3.2 – Obtenção de meio condicionado por *T. cruzi* contendo microvesículas e de lisado do parasito: Segundo o protocolo adaptado de Pinho et al. (2002), para se obter o meio condicionado de *T. cruzi*, 2x10⁸/mL de formas tripomastigotas foram incubadas em meio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 0,1% de SFB em um volume de 5mL no tubo falcon de 15mL, mantidos por 18h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4000 rpm para sedimentar os parasitos contidos no sobrenadante. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado utilizando um filtro Millex 0.2 μ m previamente bloqueado com SFB, para garantir que a eliminação de parasitos. O meio condicionado foi centrifugado 3 X 10 minutos em Centriprep (Milipore) 10kDa, a

15000G, resultando em um volume final de 500µl do meio condicionado contendo microvesículas e proteínas secretadas pelo parasito. Para se obter o lisado do parasito, o sedimento foi ressuspenso em PBS em um volume de 500 µl e posteriormente foi realizado o método de congelamento a uma temperatura de -70°C utilizando gelo seco e o descongelamento a 37°C em banho maria por 3X até se obter completa lise dos parasitos. Após dosagem do conteúdo proteico, 150 µg/poço de proteínas secretadas pelo parasito foram utilizadas para tratamento dos FCh.

3.3.3 – Obtenção de soro de camundongo normal e infectado: Camundongos BALB/c fêmeas, não infectados ou infectados com *T. cruzi* cepa CL-luc (10^3) entre 90 e 120 dias pós infecção (dpi) (camundongos restantes de grupo controle não tratado de ensaios de quimioterapia) foram utilizados para coleta de soro. Todos os procedimentos envolvendo o manuseio de animais foram aprovados pela comissão de ética da Universidade da Califórnia San Diego (UCSD) (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) sob protocolo número S14187. Os animais foram eutanasiados e o sangue coletado por punção cardíaca. O soro foi coletado em tubos BD Microtainer Serum Separator. Após coagulação sanguínea por 30 min, os tubos foram centrifugados 2000g por 10 min, e o soro transferido para eppendorf. As amostras foram armazenadas a -20°C até utilização em ensaios in vitro.

3.3.4 – Efeito de análogos de glicosaminoglicanos sobre síntese e expressão de colágeno em FCh durante interação com *T. cruzi*: Para avaliar o potencial de análogos de glicosaminoglicanos como tratamento anti-fibrose, recebemos 24 glicosaminoglicanos e derivados gentilmente cedidos por Robert J. Linhardt, do Rensselaer Polytechnic Institute. Estas moléculas foram testadas em fibroblastos cardíacos humanos infectados pelo *T. cruzi* para avaliar seu efeito na expressão de colágeno. A nomenclatura da heparina e oligossacarídeos derivados de heparina e GAGs estão descritas na tabela 1 e sua estrutura química (Figura. 3.1) a seguir:

Tabela 3.1 – Glicosaminoglicanos e seus análogos.

#	Nome	MW _{Av} Dáltons
1	Heparina intestinal de porco	16K
2	Heparan Sulfato (de mucosa intestinal de porco)	14,8K
3	Condroitin Sulfato A (de cartilagem de costela de porco)	20 K
4	Dermatan sulfato (condroitin sulfato B)	30K

5	Condroitin Sulfato C (de cartilagem de tubarão)	20K
6	Condroitin Sulfato D (de cartilagem de baleia)	20K
7	Condroitin Sulfato E (de cartilagem de lula)	20K
8	Dermatan disulfato	33K
9	Keratan Sulfato	14,3K
10	Heparin N-desulfatada	13K
11	DeS-heparina	14K
12	Heparina 2-desulfatada	13K
13	Heparina 6-desulfatada	13K
15	Oligos de heparina tamanho dp 4	1130
16	Oligos de heparina tamanho dp 6	1995
17	Oligos de heparina tamanho dp 8	2660
18	Oligos de heparina tamanho dp 10	3325
19	Oligos de heparina tamanho dp 12	3990
20	Oligos de heparina tamanho dp 14	4655
21	Oligos de heparina tamanho dp 16	5320
22	Oligos de heparina tamanho dp 18	5985
23	Oligos de heparina tamanho dp 20	6650
24	Sal de sódio de ácido hialurônico (de <i>Streptococcus zooepidemicus</i>)	100K
25	Heparina de baixo peso molecular (de mucosa intestinal de porco)	5-6K

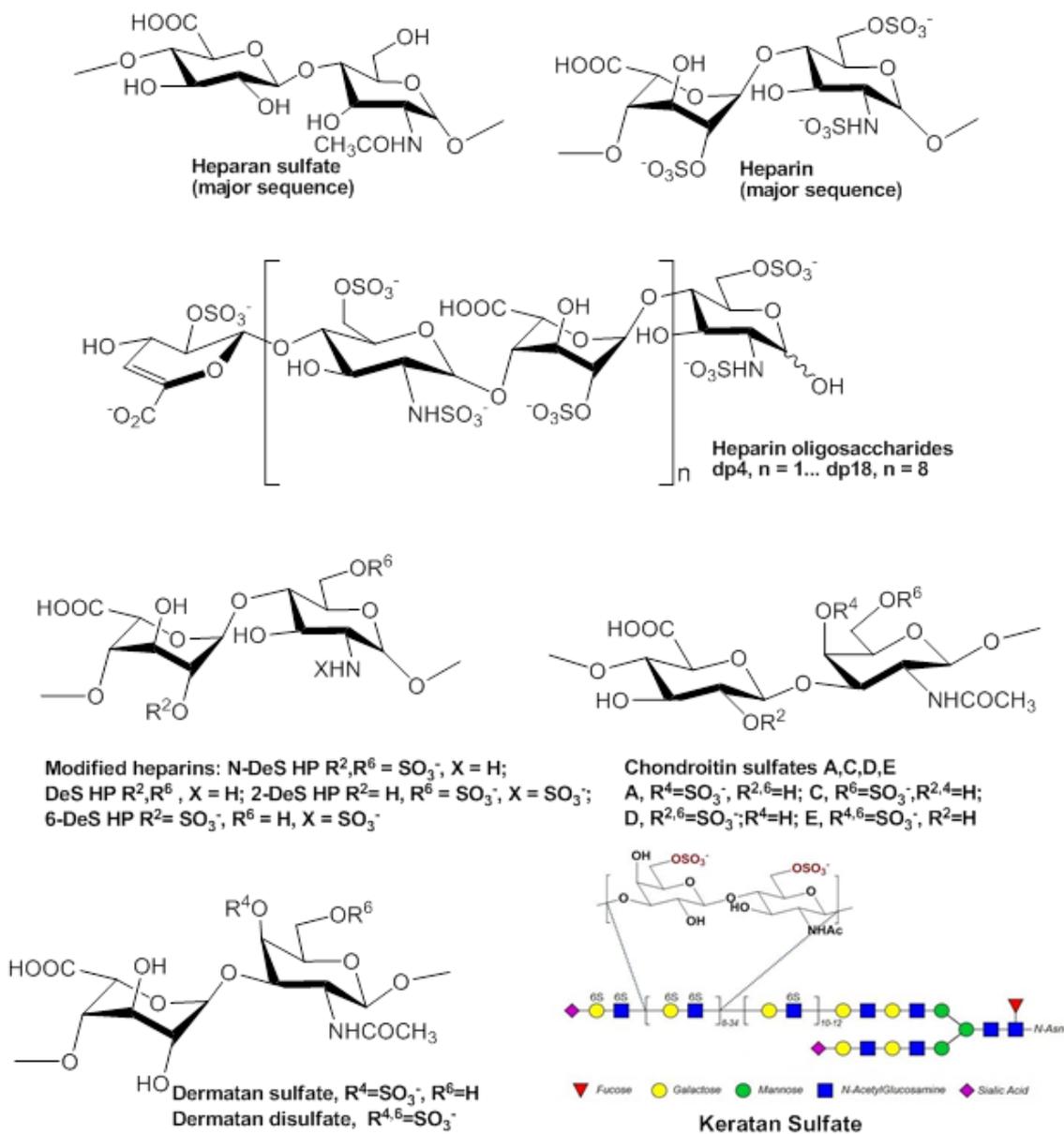


Figura 3.3 – Estrutura química de heparina e oligossacarídeos derivados de heparina e GAG's.

3.3.5 – Efeito parácrino do meio condicionado do parasito na matriz extracelular-

Colágeno: Para avaliar o efeito parácrino do parasita na síntese e secreção de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos, FCh foram plaqueados em placas de 96 poços numa densidade de $1,5 \times 10^4$ em meio FGM™-3 Fibroblast Growth Medium-3 (FGM-3, Lonza CC-4526) contendo 10% SFB, insulina, fator de crescimento de fibroblasto humano (hFGF), gentamicina e anfotericina, e foram estimuladas com diferentes concentrações de meio condicionado do parasito (0,06- 150ug/mL) por 48h. Após esse período, as células foram fixadas com Kahle (4% formaldeído, 30% etanol 2% ácido acético) por 30 min a temperatura ambiente e mantidas posteriormente a 4 °C em PBS para posterior análise. FCh foram coradas com o corante kit Sirius Red/

Fast Green (Chondrex, # 9046), segundo instruções do fabricante, como descrito anteriormente no item 3.2.7. A leitura dos sobrenadantes foi realizada em leitor de microplacas EnVision Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer) em λ 540 e 605 nm. Os valores estipulados foram determinados por meio de curvas de regressão linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad software).

3.3.6 – Efeito parácrino do meio condicionado do parasito na matriz extracelular

- **Fibronectina:** Cultura de FCh foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas revestidas com gelatina 0,1% numa densidade de 4×10^4 em meio FGM™-3 (FGM-3, Lonza CC-4526) contendo 10% SFB, insulina, fator de crescimento de fibroblasto humano (hFGF), gentamicina e anfotericina. Cultura de FCh foram estimuladas com 150µg/mL de meio condicionado pelo parasito por 48h. Após o fim do período, as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% diluídos em PBS 2X por 5 min para posterior análise por imunofluorescência indireta.

3.3.7 – Efeito de inibidores de vias de sinalização e GAG's sobre a síntese e expressão de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos imortalizados durante interação com *T. cruzi*:

Culturas de FCh foram plaqueadas em placas de 96 poços numa densidade de $1,5 \times 10^4$ em meio FGM™-3 Fibroblast Growth Medium-3 (FGM-3, Lonza CC-4526) contendo 10% SFB, insulina, fator de crescimento de fibroblasto humano (hFGF), gentamicina e anfotericina, infectados com *T. cruzi* da cepa Brazil na proporção de 10:1. Em paralelo, FCh não infectados foram estimulados com meio condicionado por *T. cruzi* (150 µg/ml), lisado celular total de *T. cruzi* (150 µg/ml) e soro de camundongos não infectados e infectados (20%). Logo após adição dos parasitas ou estímulos com meio condicionado por *T. cruzi*, lisados de parasitos e soro de camundongos, foi realizado o tratamento com Benzonidazole, Losmapimod e SP600125 (curva entre 0,04-100µM), e Pirfenidona (curva entre 0,45-1000µM). GAG's foram adicionadas na concentração de 100 µg/ml. Após 48h de infecção e de tratamento com os inibidores, ou 72h de incubação com meio condicionado por *T. cruzi*, lisados de parasitas e soro de camundongos junto com inibidores de sinalização, as culturas foram fixadas com Kahle (4% formaldeído, 30% etanol 2% ácido acético) por 30 min a temperatura ambiente e mantidas a 4°C em PBS para posterior análise. FCh foram coradas com o corante kit Sirius Red/ Fast Green (Chondrex, # 9046), segundo instruções do fabricante, como descrito anteriormente no item 3.2.7. A leitura dos sobrenadantes foi realizada em leitor de microplacas EnVision Multilabel Plate

Reader (Perkin Elmer) em λ 540 e 605 nm. Os valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50%) e CC₅₀ (concentração citotóxica de 50%) foram determinados pela concentração de colágenos e de proteínas totais, respectivamente, por meio de curvas sigmoides dose-resposta com regressão não-linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 7.0 (GraphPad software).

3.3.8 – Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos tratados com inibidores de vias de sinalização e GAG's:

Fibroblastos cardíacos humanos foram cultivados em meio FGM™-3 Fibroblast Growth Medium-3 (FGM-3, Lonza CC-4526) contendo 10% SFB, insulina, fator de crescimento de fibroblasto humano (hFGF). FCh foram plaqueados numa densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço em placa de 96 poços de fundo chato. FCh foram estimulados com meio condicionado de *T. cruzi* (150 μ g/ml), lisado do parasito (150 μ g/ml), soro de camundongo não infectados e infectados com *T. cruzi* (20%). As culturas foram tratadas com 100 μ M Bz, 1000 μ M de Pirfenidona, 30 μ M de Losmapimod e 10 μ M de SP600125 e 100 μ g/ml de GAG's por 72h de tratamento e infecção. Após o tratamento, células foram incubadas com partículas de BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) para análise de proliferação com Kit de proliferação celular (Milipore), como descrito anteriormente no item 3.2.8.

3.3.9 – Efeito dos inibidores de vias de sinalização e GAG's sobre a infecção pelo *T. cruzi*:

Para avaliar o efeito dos inibidores de vias de sinalização sobre a infecção pelo *T. cruzi*, FCh foram cultivados em meio FGM™-3 Fibroblast Growth Medium-3 (FGM-3, Lonza CC-4526) contendo 10% SFB, insulina, fator de crescimento de fibroblasto humano (hFGF). FCh foram plaqueados numa densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço em placa de 96 poços de fundo chato e foram infectados com *T. cruzi* da cepa Brazil numa razão 10:1. Imediatamente após a infecção, as células foram tratadas com Benzonidazole, Losmapimod e SP600125 (curva entre 0,04-100 μ M), Pirfenidona (curva entre 0,45-1000 μ M) e GAG's (100 μ g/ml) por 72h de tratamento e infecção a 37° C e atmosfera de 5% de CO₂. Após, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por pelo menos 1h e coradas com 0,5 10 μ g/mL de 4', 6- diamidino-2-phenilyndole (DAPI – corante de DNA) por 4 horas. As placas foram então fotografadas com ImageXpress Micro XL (Molecular Devices). As imagens foram analisadas utilizando o software MetaXpress com algoritmos que detectam e quantificam o núcleo da célula hospedeira e o cinetoplasto do parasito. A atividade antiparasitária foi normalizada com base em controles negativos (poços

infectados contendo somente DMSO) e controles positivos (poços não infectados). A viabilidade da célula hospedeira foi observada em cada poço.

3.4 – Triagem de compostos anti-fibrose em modelo de infecção crônica pelo *T. cruzi* *in vivo*.

3.4.1 – Animais para ensaios *in vivo*: Utilizamos camundongos C57Bl/6 machos, com peso de 20-23g, no Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (UCSD). Os animais foram aclimatados em caixas plásticas descartáveis (5 animais por caixa) em condições controladas de temperatura (26 °C), umidade (50%) e luminosidade com ciclo de 12 horas claro-escuro. Os camundongos foram alimentados com ração específica para roedores com acesso a água *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvendo o manuseio de animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade da Califórnia San Diego (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC, UCSD) sob protocolo número S14187.

3.4.2 – Ensaios *in vivo* da atividade de compostos contra fibrose durante infecção experimental por *T. cruzi*: Camundongos da linhagem C57/Bl6 foram infectados com *T. cruzi* da cepa Brazil com inóculo de 1×10^4 /animal pela via intraperitoneal. 20 dias após infecção (dpi), foi realizada triagem para presença de parasitas no sangue. A infecção pelo *T. cruzi* foi confirmada se em gota de 5 μ l de sangue recolhidos da cauda de cada animal, observados entre lâmina e lamínula (18x18 mm), foi detectada a presença de tripomastigotas de *T. cruzi*. Apenas animais com parasitemia positiva foram utilizados no estudo. Dois esquemas de tratamento foram realizados, com o tratamento sendo iniciado com 60 dpi (antes do estabelecimento de fibrose) ou com 100 dpi (quando a fibrose já está estabelecida) (Lopez-De Leon and Rojkind, 1985). Os animais foram tratados por 28 dias com Pirfenidona (200mg/kg), inibidor da via de sinalização de TGF- β ; Losmapimod (15mg/kg), inibidor de p38 MAPK; (3mg/kg), inibidor de JNK; e Benzonidazol (100mg/kg) como controle. Os compostos foram diluídos em solutol 10%, e administrados uma vez por dia oralmente via gavagem (Pirfenidona, Losmapimod e Benzonidazol) ou via intraperitoneal (SP600125). Após o fim do período de tratamento, hipertrofia e função cardíaca foram avaliados por ecocardiograma. Ao fim do ensaio, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e os corações foram coletados para avaliação de carga parasitária por PCR, processamento histológico

para a análise de MEC por coloração Sirius red/Fast green e medida de colágeno por *western blot* (Figura. 3.4).

Infecção experimental em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

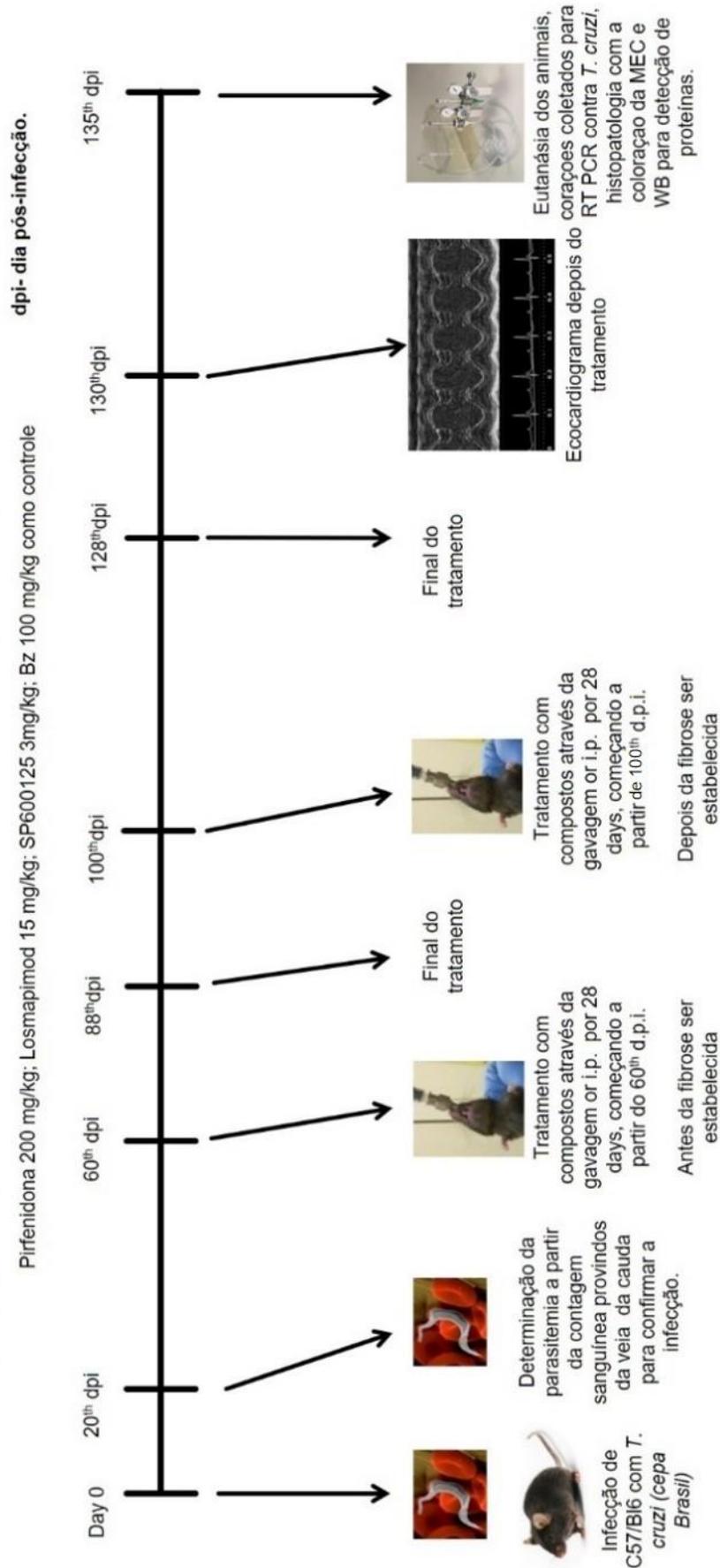


Figura. 3.4 – Ensaio experimental *in vivo* com diferentes compostos. Benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125 foram tratados em camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com *T. cruzi* (cepa Brasil) após 60 e 100 dpi.

3.4.3 – Ecocardiograma: Para análise ecocardiográfica utilizamos o sistema de micro-imagem por ultrassom VEVO 2100 (Visual Sonics), disponível no Seaweed Canyon Cardiovascular Physiology Laboratory, Institute for Molecular Medicine, UCSD. Os camundongos obtiveram a região torácica previamente depilada e os animais submetidos a leve anestesia com isoflurano (1,5%). Pequenos eletrodos para registro de eletrocardiograma foram inseridos em membros superiores e inferiores e a sonda ecocardiográfica gentilmente colocada na superfície torácica. O rastreamento doppler do fluxo sanguíneo também foi registrado. As imagens bidimensionais foram reconstruídas após ciclo cardíaco permitindo a visualização da espessura das câmaras cardíacas, função do miocárdio, cálculo de stress de parede e fração de ejeção ventricular.

3.4.4. Extração de DNA e PCR quantitativo: O DNA foi extraído de fragmentos de cerca de 50 mg de coração, com o kit Quick-DNA Universal (Zymo Research), sendo previamente homogeneizados utilizando maceração do tecido com ZR Bashing Beads tubes (Zymo Research). O DNA foi quantificado em Nanodrop e 180 ng foram usados para PCR quantitativo usando Lightcycler 480 Sybr green I Master Mix (Roche) em um termociclador RT-PCR Stratagene Mx3005P. Os primers para PCR quantitativo foram ATCGGCTGATCGTTTTTCGA e AATTCCTCCAAGCAGCGGATA para amplificar a região satélite do DNA do parasito e TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA e CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC para amplificar o TNF α do hospedeiro usando o seguinte perfil térmico: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, depois 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 58°C por 60 s e extensão a 72°C por 60 s. Uma curva padrão foi gerada a partir de amostras extraídas de tecido cardíaco de camundongo acrescidas de 2×10^7 epimastigotas de *T. cruzi*. A curva padrão foi utilizada para determinar a carga parasitária em cada animal. Os dados foram analisados utilizando o Microsoft Excel e o GraphPad Prism 7.

3.4.5 – Histologia: Os corações coletados foram utilizados para processamento histológico para análise de MEC. Os corações foram embebidos em Tissue Tek O.C.T. para preservar o material e foram congelados a -70°C com gelo seco. Os tecidos congelados foram cortados no criostato numa espessura de 15 μ m e aderidos em lâminas de vidro para posterior análise. Os tecidos foram fixados em acetona -20°C por 10 min e lavados 1X com PBS. Os tecidos foram corados com o corante kit Sirius

Red/ Fast Green, por 2 horas em câmara úmida. Foram realizadas sucessivas lavagens com água destilada para remoção do corante. As lâminas foram então desidratadas sucessivamente com etanol 100%, 95% e 70% por 6 min cada etapa, finalizando com xileno por 2X por 15 min, para permitir a montagem em Permount para análise. As lâminas foram escaneadas através do equipamento NanoZoomer (Hamamatsu Photonics) e as imagens exportadas utilizando o software NDP viewer (Hamamatsu Photonics). Para quantificar a deposição de colágeno na MEC em cortes de tecidos de camundongos C57Bl/6 infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil), imagens de 8 a 10 campos foram submetidas a processamento utilizando o software FIJI/ ImageJ (versão 1.51) (Schindelin et al., 2009). Para medir a fibrose, a coloração vermelha das fibras de colágeno foi segmentada por meio de limiar de cor, e a fração de área de colágeno foi medida na imagem binária gerada após a segmentação.

3.4.6 – Extração de proteínas: Metade dos corações de camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados pelo *T. cruzi* da cepa Brazil com 60 e 100dpi, tratados com Benzonidazol, Pirfenidona, Losmapimod e SP600125, foram fragmentados e macerados mecanicamente com pilão e almofariz utilizando 500µl de tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, pH 8.0) contendo coquetéis de inibidores de fosfatases (Sigma Chemical Co.; Cantharidin, (-)-p-Bromolevamisole oxalate e Calyculin A) e de proteases (Sigma Chemical Co.; AEBSF – [4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoridehydrochloride, aprotinina, hidrocloreto de bestatina, E-64– [N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide, Leupeptin hemisulfate salt, Pepstatin A). Alíquotas de 20 µL foram previamente separadas de cada amostra para dosagem de proteínas pelo método de Folin-Lowry. Ao restante dos extratos, foi adicionado tampão de amostra 5X (0,3 M Tris, 10% SDS, 0,125% Azul de Bromofenol, 25% β-mercaptoetanol, 50% Glicerol) e as amostras foram fervidas em banho seco à 100°C por 5 minutos logo após a extração, para inativação completa de proteases e fosfatases. Todos os extratos foram armazenados a -20°C.

3.4.7 – Western Blotting: Após dosagem de proteínas, proteínas totais obtidas de extratos de tecido cardíaco de camundongos infectados com *T. cruzi* cepa Brazil com 60 e 100dpi foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando 10 µg de proteína em gel de poliacrilamida 10% para detecção de Colágeno I. As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com tampão de bloqueio (TBS, 5% de leite desnatado, 0,1% de Tween 20) por 1h a

temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-Col1A1 (1:2500, ABclonal Technology), incubado por 18h à 4°C. As membranas foram então lavadas e, em seguida, incubadas por 1h a temperatura ambiente com anticorpo anti-GAPDH (1:100; Santa Cruz Biotechnology) como controle interno. A reação foi revelada com anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo conjugados a peroxidase (Pierce Biotechnology), ambos diluídos 1:10.000 em tampão de bloqueio. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS + 0,1%Tween20 3X10 min e a revelação da peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit Super Signal West Pico (Pierce Biotechnology). As imagens das bandas foram obtidas digitalmente com ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). A densitometria das bandas resultantes foi realizada com o programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Os valores de densitometria foram normalizados, sendo calculado o índice de variação (I.V.) considerando o controle não infectado=1.

Resultados

Resultados *in vitro*

Parte I: TGF- β

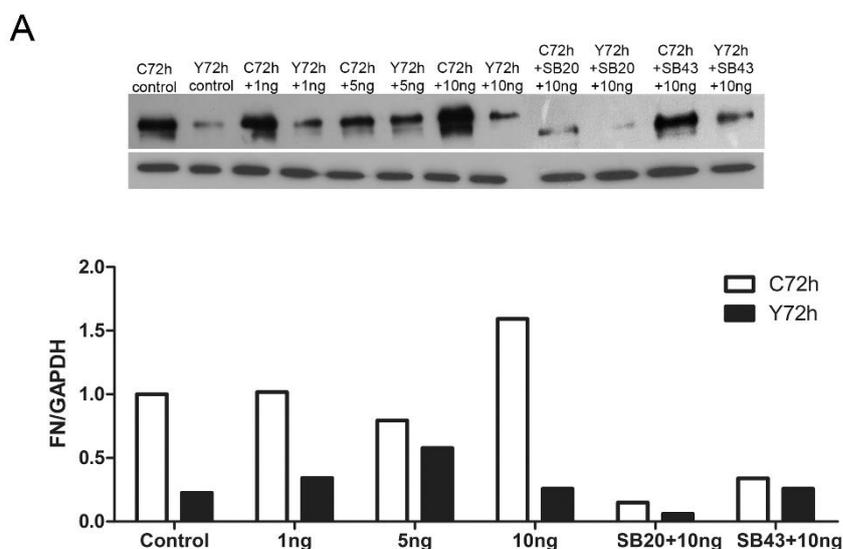
4 – RESULTADOS

4.1 – Expressão de fibronectina em cardiomiócitos e purificação de fibroblastos cardíacos.

Fibroblastos cardíacos possuem um núcleo celular maior quando comparados com cardiomiócitos (CM), e essa característica morfológica é distintiva nesse tipo celular. Inicialmente, a purificação de FC foi obtida a partir de culturas CM apenas por morfologia. FC obtidos na terceira dissociação de culturas CM foram infectados com *T. cruzi* e estimulados com TGF- β por 48 horas e os extratos celulares foram submetidos a *western blot* para análise da expressão de FN sob essas condições. Nossos dados revelaram um aumento na expressão de FN apenas com 10 ng/mL de TGF- β . A adição dos inibidores SB431542 e SB203580 (via SMADS e inibidor p38 MAPK respectivamente) em culturas de CM levou a uma inibição da expressão de FN através do estímulo pelo TGF- β , uma vez que culturas infectadas tratadas com 10 ng/mL de TGF- β (48h) apresentaram redução da expressão de FN após o pré-tratamento com os inibidores das vias de sinalização (Figura 4.1A). Os dados obtidos na terceira dissociação a partir de extratos de culturas de cardiomiócitos apresentaram expressões de FN similares a culturas de cardiomiócitos, sugerindo que o processo de purificação de FC precisa de ajustes e a resposta de FN não pôde ser adequadamente apresentada quando FC está presente na cultura CM, sugerindo que a análise morfológica ao microscópio não garante uma boa purificação de FC.

Assim, para avaliar o grau de purificação de FC em culturas de CM, desmina, uma proteína específica do citoesqueleto de cardiomiócitos, foi avaliada em extratos de FC após diferentes dissociações. Extratos de FC obtidos na terceira e quarta dissociação revelaram que os cardiomiócitos ainda estavam presentes na cultura de FC, uma vez que os extratos também apresentaram alta expressão para desmina, demonstrando que essas dissociações não são viáveis para a realização de testes experimentais. A purificação de FC foi obtida apenas na quinta dissociação da cultura CM, com ausência de cardiomiócitos, sendo a desmina indetectável em cultura de FC somente após a 5ª passagem (Figura 4.1B).

Expressão de FN em cardiomiócitos



Caracterização da purificação de fibroblastos cardíacos

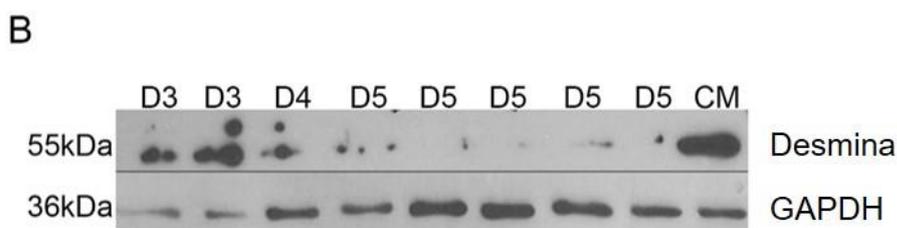


Figura 4.1 – Depósito de fibronectina em cardiomiócitos e purificação de fibroblastos cardíacos.. FN = Fibronectina. (A) **Depósito de fibronectina em cardiomiócitos.** Cultura controle revela a expressão de FN apenas com o estímulo com 10 ng/mL de TGF- β (48 h). Com 1 ng/mL induz o aumento da expressão do FN. A infecção pelo *T. cruzi* (72h) promove uma redução na expressão de FN após a adição de TGF- β . A ação inibitória dos SMADs e da via p38 MAPK previne o aumento da expressão de FN mesmo após o estímulo com 10 ng/mL. Esses resultados obtidos com extratos de células após a terceira passagem da cultura CM são semelhantes aos dados publicados anteriormente em culturas de cardiomiócitos sob as mesmas condições. (B) **Caracterização da purificação de fibroblastos cardíacos.** O grau de purificação da FC foi avaliado por meio da detecção da desmina em extratos celulares obtidos na 3^a, 4^a e 5^a dissociação. A purificação de FC foi obtida a partir da quinta dissociação, como mostrado pela ausência de desmina. N=3.

4.2 – Modulação da distribuição espacial de fibronectina em diferentes tipos celulares após estímulo com TGF- β .

Na tentativa de compreender os mecanismos subjacentes à fibrose cardíaca evidenciados na patogênese da doença de Chagas, avaliamos a modulação dos componentes da matriz extracelular em cardiomiócitos (CM), fibroblastos cardíacos (FC) e mioblastos esqueléticos L6E9 estimulados com TGF- β , um importante mediador do processo de fibrose. A distribuição das fibrilas de fibronectina (FN) na MEC foi analisada em diferentes tipos celulares em resposta ao estímulo de TGF- β (1-10 ng/mL) por 48 h por imunofluorescência indireta. Culturas purificadas de FC foram obtidas após a quinta passagem de cultura de cardiomiócitos (CM) conforme determinado pela ausência de desmina, proteína do filamento intermediário, expressas especificamente em CM (Figura 4.1). Resultados obtidos por microscopia confocal revelaram o arranjo de fibrilas FN na superfície do CM, evidenciando um espessamento na rede de FN dependente da concentração do estímulo de citocinas (Figura. 4.2). CMs estimulados com 10 ng/mL de TGF- β (Figura. 4.2C) exibiram um aumento na espessura das fibrilas FN na MEC, como previamente reportado (Calvet et al., 2009). A marcação para FN (Figura 4.2J) mostrou que o aumento de FN foi em torno de 10% (CM não tratado, Figura 4.2A) e 10,5% (CM + 1 ng/mL TGF- β , Figura. 4.2B) da área total para 24% da área total após o tratamento com 10 ng/mL de TGF- β , representando aumento de 2,3 vezes na espessura da fibrila de FN. Em contraste, foi revelado um aumento nas fibrilas de FN na superfície de mioblastos esqueléticos L6E9 (Figura 4.2E) e FC (Figura. 4.2H) após estímulo com 1 ng/mL de TGF- β , em concentrações 10 vezes menores do que o necessário para estimular FN em CM. O aumento do depósito de FN ocorreu de maneira dose-dependente, mostrando uma rede fibrilar de FN mais espessa após o tratamento em mioblastos esqueléticos L6E9 (Figura 4.2F) e FC (Figura 4.2I) com 10 ng/mL da citocina. A quantificação da espessura da fibrila de FN (Figura 4.2J) mostrou um aumento de 3,2-vezes da área de marcação de FN após a adição de 1 ng/mL de TGF- β e 3,5 vezes após a adição de 10 ng/mL para mioblastos esqueléticos L6E9. De um modo semelhante, FC exibiram um aumento de 2,8 vezes nas fibrilas de FN após tratamento com 1 ng/mL de TGF- β e um aumento de 2,3 vezes após a adição de 10 ng/mL da citocina (Figura. 4.2J).

Distribuição espacial de FN em diferentes tipos celulares

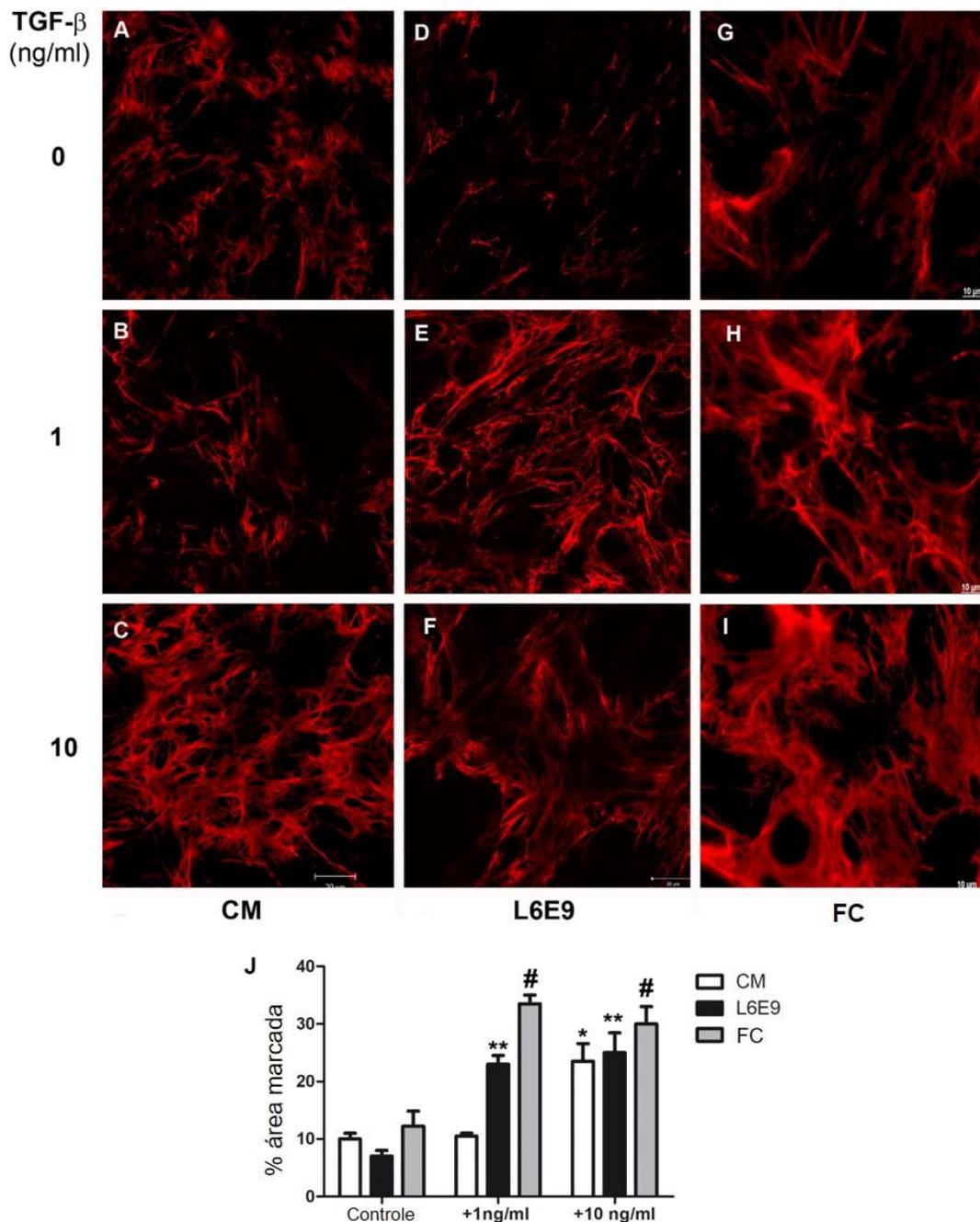


Figura 4.2 – O TGF- β modula diferencialmente FN em cardiomiócitos, mioblastos esqueléticos L6E9 e fibroblastos cardíacos não infectados. FN= Fibronectina. CM= Cardiomiócitos. L6E9 = mioblastos esqueléticos L6E9. FC= Fibroblastos cardíacos. A-C: cardiomiócitos; D-E: mioblastos esqueléticos L6E9; G-I: fibroblastos cardíacos. (A) Fibrilas de FN na superfície de cardiomiócitos normais. (B) A adição de 1 ng/mL não altera a expressão de FN em cardiomiócitos. (C) Somente com 10 ng/mL o TGF- β induz o aumento na expressão de FN. (E) Em contraste, mioblastos esqueléticos L6E9 e (F) fibroblastos cardíacos, apresentaram o estímulo de FN a partir de 1 ng/mL quando comparados com as culturas controles (D e G). O aumento de FN ainda é detectado nesses tipos celulares com adição de 10 ng/mL (F e I) de TGF- β . (J) A marcação de FN foi medida com o software Image J, através do espessamento das fibrilas FN após o tratamento com TGF- β . * $p \leq 0,05$ comparado com CM não tratado; ** $p \leq 0,05$ em comparação com L6E9 não tratada; # $p \leq 0,05$ comparado com FC não tratada. Barra = 20 μm . N=3.

4.3 – Vias de sinalização em FC após o estímulo de TGF- β .

A discrepância em resposta ao estímulo com TGF- β levou-nos a investigar se a modulação distinta do perfil de FN entre FC, mioblastos esqueléticos L6E9 e CM poderia estar relacionada a diferentes vias de sinalização disparadas no processo de regulação da MEC. Assim, as vias clássicas e alternativas de sinalização de TGF- β foram avaliadas em todos os tipos celulares após o estímulo com a citocina, utilizando culturas de CM como referência. Comparando a resposta basal sem o estímulo de TGF- β , a fosforilação de SMAD2 (PS2) em L6E9 foi 5 vezes maior que CM, enquanto FC revelou um aumento de 1,8 vezes nos níveis de PS2 quando comparados com CM (Figura 4.3A). A análise da via SMAD revelou que após o estímulo em mioblastos esqueléticos com 1 e 10 ng/mL de TGF- β , respectivamente, foram observados aumentos de 2,1 e 2,9 vezes nos níveis de PS2, em comparação com culturas L6E9 não tratadas (Figura 4.3A). A cinética de estímulo com TGF- β em FC revelou um aumento de 40% nos níveis de PS2 após a adição de 1ng/mL de TGF- β , e com 10 ng/mL alcançou um nível máximo de 69% de PS2 (Figura 4.3A). Curiosamente, mioblastos esqueléticos L6E9 foram mais suscetíveis ao estímulo de TGF- β , apresentando níveis de PS2 10 a 13 vezes maiores que CM e 4 vezes maiores que FC nas concentrações analisadas. FC também apresentou mais ativação de PS2 quando comparados com CM, alcançando aumentos de 2,5 e 2,7 vezes superiores a cultura controle de CM quando estimulados com 1 ng/mL e 10 ng/mL de TGF- β , respectivamente (Figura 4.3A). CMs exibem aumento no nível de PS2 somente após elevada concentração de TGF- β (10 ng/mL) (Figura 4.3A).

Paralelamente, avaliamos também a via de fosforilação de p38 MAPK (fosfo-p38MAPK, p-p38) em FC, CMs e mioblastos esqueléticos L6E9 após 1 h de tratamento com TGF- β (1 e 10 ng / mL). Mioblastos esqueléticos L6E9 revelaram níveis de p-p38 80% mais elevados do que CM, e 3,7 vezes mais elevados do que FC. Mioblastos L6E9 também apresentaram uma sensibilidade aumentada ao TGF- β em comparação com CMs e FC, atingindo aumentos de 2 e 4,7 vezes nos níveis de CM e FC, respectivamente, após o estímulo com TGF- β (Figura 4.3B). Um aumento nos níveis de fosfo-p38MAPK foi observado em culturas de FC estimuladas com TGF- β , atingindo um aumento máximo de 45% na concentração de 10 ng/mL (Figura 4.3B). Em contraste, foi observada ativação de 37% de p38MAPK em CM estimulados apenas com 10 ng/mL de TGF- β . Em todas as concentrações de TGF- β (1 e 10 ng/mL), os níveis de fosfo-p38MAPK em FC foram significativamente menores do que em CM e L6E9 (Figura 4.3B). A adição de 1 ng/mL de TGF- β em mioblastos

esqueléticos L6E9 resultou em um aumento de 1,2 vezes de fosfo-p38MAPK que permaneceu constante após o estímulo com dose elevada de TGF- β (Figura 4.3B).

PS2 e p-p38 MAPK em diferentes tipos celulares

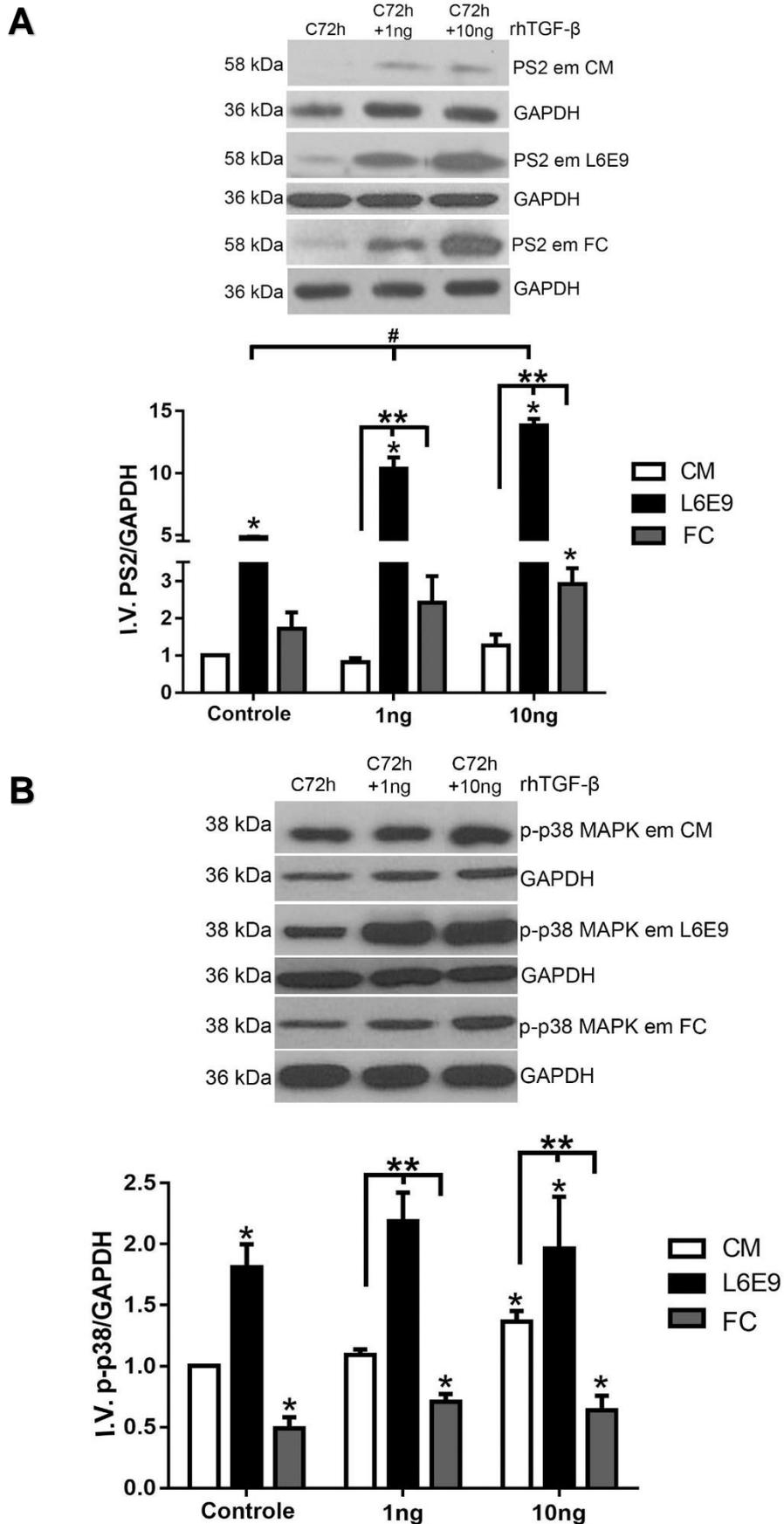


Figura 4.3 – Detecção de SMAD 2 e p38MAPK fosforilada em culturas não infectadas. CM= cardiomiócios. L6E9 = mioblastos esqueléticos L6E9. FC = fibroblastos cardíacos. rhTGF- β = TGF- β

recombinante. (A) Comparação da detecção de PS2 de mioblastos esqueléticos L6E9, CM, e FC estimulados com TGF- β (1- 10 ng/mL) por 1 h. Os níveis basais de PS2 em mioblastos esqueléticos L6E9 e FC foram significativamente maiores que em CM. Após a adição de TGF- β , PS2 permanece significativamente maior em L6E9 e FC em relação a CM. Os mioblastos esqueléticos L6E9 respondem ao estímulo com TGF- β em uma maneira dependente. FC apresenta um ligeiro aumento nos níveis de PS2. * $p \leq 0,05$ comparado ao CM; ** $p \leq 0,05$ comparado com CM em diferentes concentrações; # $p \leq 0,05$ em comparação com o controle L6E9. N = 3 (B) Detecção de p-p38MAPK em mioblastos esqueléticos L6E9, CM, e FC estimulados com TGF- β (1-10 ng / mL) por 1 h. Mioblastos esqueléticos L6E9 apresentam elevados níveis de fosforilação de p38MAPK quando comparados com CM. Quando o CM foi comparado com FC, observou-se um aumento na fosforilação de p-p38MAPK após o estímulo com TGF- β (1-10 ng/mL). * $p \leq 0,05$ em comparação com CM e ** $p \leq 0,05$ em comparação com CM em diferentes concentrações. N = 3.

4.4 – Depósito de fibronectina em fibroblastos cardíacos infectados pelo *T. cruzi* e estimulados pelo TGF- β .

Com o conhecimento da modulação diferencial na expressão de FN e a distinta ativação de vias de sinalização dependentes de TGF- β (PS2 e p-p38) nos diferentes tipos celulares, investigamos a resposta dessas células frente à infecção pelo *T. cruzi*. Assim, avaliamos os níveis de expressão de FN em FCs e mioblastos esqueléticos L6E9 infectados pelo *T. cruzi* (72 h). Inicialmente, a expressão de FN em culturas de FCs e mioblastos esqueléticos L6E9 foi analisada por *western blot* após 48 horas de estímulo com TGF- β (1 e 10 ng/mL). Nossos resultados mostraram um aumento na expressão de FN em ambos os tipos celulares em todas as concentrações de TGF- β analisadas, sendo FCs mais responsivos ao estímulo da citocina (Figura 4.4). Mioblastos esqueléticos L6E9 revelaram uma resposta dose dependente, com aumentos significativos na expressão de FN variando de 3 a 5,5 vezes em diferentes concentrações de TGF- β (1 e 10 ng/mL) (Figura 4.4A). O maior aumento de FN foi observado em FC, variando de 6,9 vezes com 1 ng/mL e 9,4 vezes com 10 ng/mL (Figura 4.4).

Em seguida, analisamos a expressão de FN em L6E9 e FCs infectados pelo *T. cruzi* (72 h). Curiosamente, a infecção pelo *T. cruzi* induziu uma resposta diferencial na expressão de FN em culturas de mioblastos esqueléticos L6E9 e FC (Figura 4.4). Mioblastos esqueléticos L6E9 infectados mostraram uma redução significativa de 82% na expressão de FN, enquanto FCs demonstraram um aumento de 5 vezes na expressão deste componente da MEC (Figura. 4.4). Embora o estímulo com TGF- β estimule um aumento significativo na expressão de FN em mioblastos esqueléticos L6E9 infectados com *T. cruzi*, em comparação com células não estimuladas infectadas, os níveis de expressão de FN foram significativamente regulados negativamente em comparação com culturas controles estimuladas (Figura 4.4A). Reduções significativas na expressão de FN com 67% e 45% foram demonstradas em L6E9 infectados com *T. cruzi* estimulado com 1 e 10 ng/mL de TGF- β , respectivamente, em comparação com culturas não infectadas. Em contraste, culturas de FC infectadas com *T. cruzi* e estimuladas com TGF- β não foram responsivas ao estímulo da citocina, mesmo quando administradas em elevadas concentrações (10 ng/mL), mantendo níveis de FN similares a cultura controle (Figura 4.4B). Em culturas de FC mesmo estimulados com TGF- β , foram observadas reduções de 38% (1 ng/mL) e 48% (10 ng/mL) na expressão de FN quando comparadas aos pares não infectados estimulados (Figura 4.4B). O pré-tratamento das culturas de FCs com inibidores de

sinalização durante 1h (p38-SB203580, 10 μ M; ALK5-SB431542, 10 μ M) antes da adição de TGF- β , preveniu o estímulo a expressão de FN, resultando em níveis semelhantes aos controles não infectados e não estimulados (Figura 4.4B).

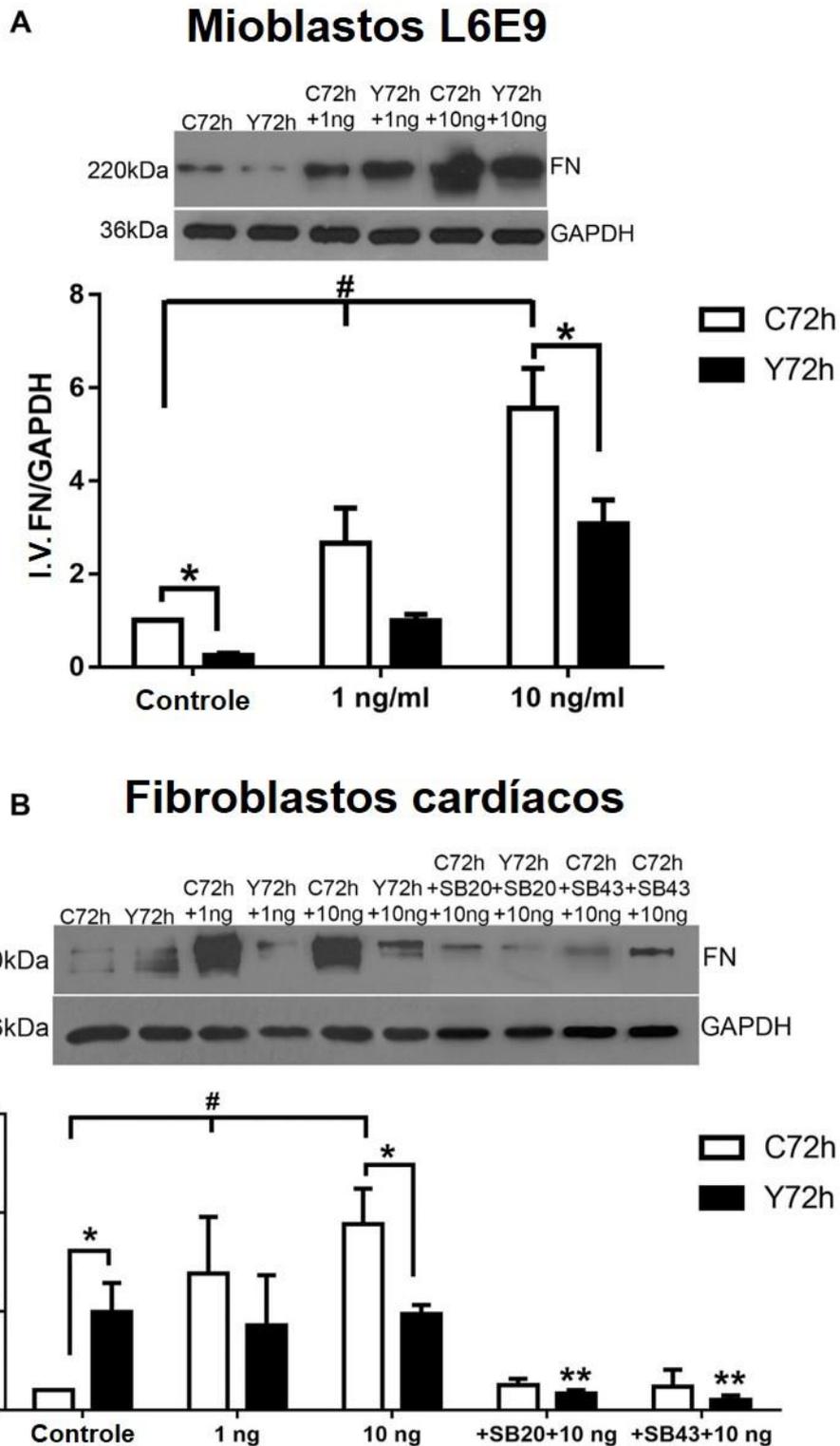


Figura 4.4 - Depósito de fibronectina em mioblastos esqueléticos L6E9 e fibroblastos cardíacos estimulados com TGF- β . (A) Em culturas normais, o tratamento com 1 ng/mL de TGF- β durante 48 h promove o aumento na expressão de FN em mioblastos esqueléticos de L6E9, em uma maneira dose dependente após a adição de 1 e 10 ng/mL de TGF- β . Em mioblastos esqueléticos L6E9 infectados com *T. cruzi* (72h) e estimulados com TGF- β (1 e 10 ng/mL) foi observado um aumento da expressão de FN quando comparado com culturas infectadas sem tratamento, porém uma redução na expressão de FN quando comparado com culturas não infectadas, mesmo após o tratamento com TGF- β (1 e 10 ng / mL). * $p \leq 0,05$ comparado a pares não infectados; # $p \leq 0,05$ comparado ao controle não tratado e não infectado; N = 4. (B) Cultura de FCs normais estimuladas com TGF- β (1 e 10 ng/mL), mostrou um aumento da expressão de FN de acordo com a dose administrada. Em FC infectado e não estimulado, há um aumento na expressão do FN quando comparado com os seus homólogos normais.

Em FC infectados, estimulados com TGF- β (1 e 10 ng / mL), observou-se uma redução da expressão de FN quando comparados com os seus pares estimulados. O pré-tratamento da cultura com inibidores de p38 (SB203580) e SMAD2 (SB431543) preveniu o aumento na expressão de FN pelo TGF- β . Barras brancas correspondem a culturas controle, não infectadas (C72h), enquanto barras pretas representam culturas infectadas pelo *T. cruzi* (cepa Y) (Y72h). * $p \leq 0,05$ comparado aos pares não infectados; # $p \leq 0,05$ em comparação com a cultura não infectada e não estimulada e ** $p \leq 0,05$ em comparação com os controles estimulados com TGF- β (10 ng / mL). N = 3.

4.5 – Regulação positiva de FN em fibroblastos cardíacos infectados pelo *T. cruzi*.

Para avaliar a participação direta do TGF- β induzido pelo *T. cruzi* na expressão de FN, culturas infectadas com *T. cruzi* por 24h foram tratadas com SB431542 (10 μ M) por 1 hora e a expressão de FN foi analisada após 72h de infecção. A inibição de ALK5 impediu o aumento da expressão de FN resultante da infecção pelo *T. cruzi*, quando comparados com a cultura infectada não tratada, sugerindo que o TGF- β estimulado pelo parasita pode estar participando na indução da síntese de FN (Figura 4.5).

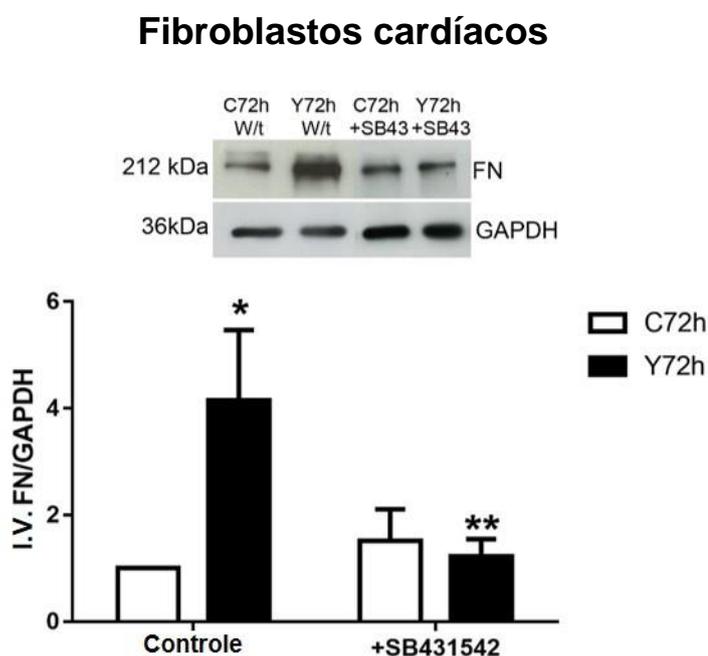


Figura 4.5 – Depósito de FN em fibroblastos cardíacos após tratamento com inibidor SB431542. FN= Fibronectina. Infecção pelo *T. cruzi* (Y72h) em fibroblastos cardíacos resulta em aumento dos níveis de FN detectado por *western blot* quando comparados com a cultura controle não infectada (C72h). Inibição da ativação da via de SMAD pelo SB431542 preveniu a expressão de FN promovido pela infecção pelo *T. cruzi* em fibroblastos cardíacos. Barras brancas correspondem a cultura controle não infectadas (C72h), enquanto barras negras representam culturas infectadas pelo *T. cruzi* (cepa Y) (Y72h). * $p \leq 0,05$ vs. C72h não estimulado; ** $p \leq 0,05$ vs. Y72h não estimulado. N = 3.

4.6 – Regulação da rede fibrilar de fibronectina após a infecção pelo *T. cruzi*.

A distribuição de fibrilas de FN na matriz extracelular em mioblastos esqueléticos L6E9 e FCs infectados pelo *T. cruzi*, estimulados com TGF- β por 48 horas, foi avaliada por imunofluorescência indireta. A infecção pelo *T. cruzi* resultou em uma redução na expressão de FN em mioblastos esqueléticos de L6E9 (Figura 4.6B-C; E-F; H-I), enquanto culturas controles apresentaram uma ampla distribuição de fibrilas de FN na MEC (Figura 4.6A, D, G). Por outro lado, FCs mostraram uma intensificação geral na marcação de FN após infecção, localizada em células não infectadas das culturas, com uma redução ou nenhuma marcação de fibrilas de FN nas células infectadas (Figura 4.7 BC; EF; HI) quando comparadas com culturas controles (Figura 4.7 A, D, G). Culturas de mioblastos esqueléticos L6E9 (Figura 4.6E-F; HI) e de FCs (Figura 4.7E-F; HI) altamente infectadas pelo *T. cruzi*, estimuladas com TGF- β (1 e 10 ng/mL) revelaram um aumento geral nas fibrilas de FN na MEC em comparação com culturas controle não estimuladas (Figura 4.6A-C e Figura 4.7A-C). No entanto, o aumento de FN nessas culturas infectadas, estimuladas com TGF- β , foi localizado em células adjacentes não infectadas, enquanto células altamente infectadas apresentaram uma redução na distribuição de FN mesmo após adição de altas concentrações de TGF- β (1 e 10 ng/mL) (Figura 4.6E-F; HI e Figura 4.7C EF; HI) em comparação com a cultura controle não estimulada. Em ambos os tipos celulares, a expressão de FN foi redistribuída, sendo observada nas bordas das células infectadas enquanto fibrilas de FN foram observadas espalhadas mais uniformemente em culturas controles não infectados (Figura 4.6 e Figura. 4.7).

A medida da área ocupada por fibrilas de FN foi realizada através de processamento de imagem (Figura 4.6J e 4.7J), no qual confirmou essas observações apresentadas. Mioblastos L6E9 apresentaram um decréscimo de 29% na área de FN após a infecção pelo *T. cruzi*, enquanto um aumento de 1,5 vezes foi observado na cultura infectada não tratada de FCs. Com a adição de TGF- β , a área ocupada por FN aumentou 3,2 vezes (1 ng/mL) e 3,5 vezes (10 ng/mL) para L6E9 (Figura. 4.6J), enquanto em culturas de FC o aumento foi de 2,8 vezes (1 ng/mL) e 2,3 vezes (10 ng/mL) (Figura. 4.7J). A infecção pelo *T. cruzi* impediu a estimulação da expressão de FN por TGF- β em ambos os tipos celulares, onde mioblastos esqueléticos L6E9 mostraram uma redução na espessura da fibrila de FN de 72% com 1 ng/mL e 79% para 10 ng/mL, quando comparados com os pares estimulados não infectados (Figura 4.6J). Culturas de FC também mostraram baixa resposta ao TGF- β , com área remanescente de FN semelhante a cultura controle após o estímulo com TGF- β ,

representando um decréscimo de 37% (1 ng/mL) e 21% (10 ng/mL) quando comparado a culturas estimuladas não infectadas (Figura 4.7J). Embora não tenhamos conseguido detectar o mesmo nível de expressão de FN após o estímulo com TGF- β com o processamento de imagem do que o revelado por *western blot*, nossas medidas levam em conta apenas a área ocupada por fibrilas de FN e não a intensidade da marcação, e os padrões de modulação são similares entre as duas abordagens, confirmando o fenômeno biológico.

Distribuição espacial de FN em mioblastos L6E9 infectados com *T. cruzi*

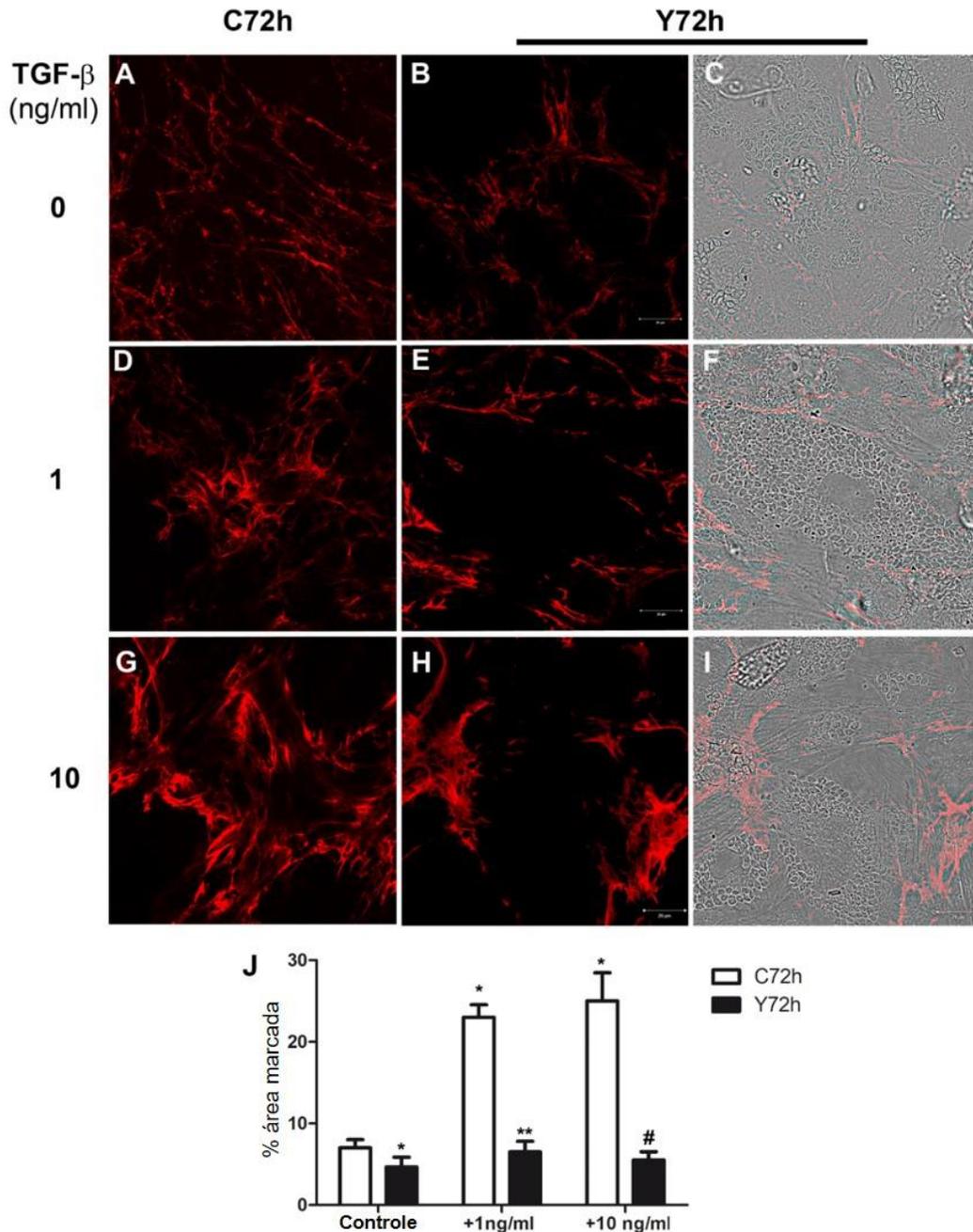


Figura 4.6 - Distribuição de fibronectina em mioblastos esqueléticos L6E9 infectados com *T. cruzi* e estimulados com TGF- β . FN= fibronectina. Infecção pelo *T. cruzi* (72 h) reduziu a marcação de fibrilas de FN (vermelho) em mioblastos esqueléticos L6E9, quando comparados com a cultura controle não infectadas (A, D, G). O estímulo em mioblastos esqueléticos L6E9 infectados com *T. cruzi* estimulados com 1 ng / mL (EF) ou 10 ng / mL (HI) de TGF- β induz o aumento na expressão de FN somente em áreas não infectadas, quando comparado com culturas não infectadas e estimuladas com TGF- β (D, 1 ng / mL; G, 10 ng / mL), que apresentaram um aumento generalizado de FN. (J) Áreas de FN foram quantificadas com o software Image J em que mostrou uma redução na área e no espessamento de fibrilas de FN após a infecção e o estímulo com TGF- β em culturas não infectadas. Contraste por interferência diferencial (DIC) foi utilizado para apresentar parasitos intracelulares em células hospedeiras. * $p \leq 0,05$ vs. não tratado, não infectado (C72h); ** $p \leq 0,05$ vs. não infectado + 1 ng/mL de TGF- β ; # $p \leq 0,05$ vs. não infectado + 10 ng/mL de TGF- β . Barra = 20 μ m. N=3.

Distribuição espacial de FN em fibroblastos cardíacos infectados com *T. cruzi*

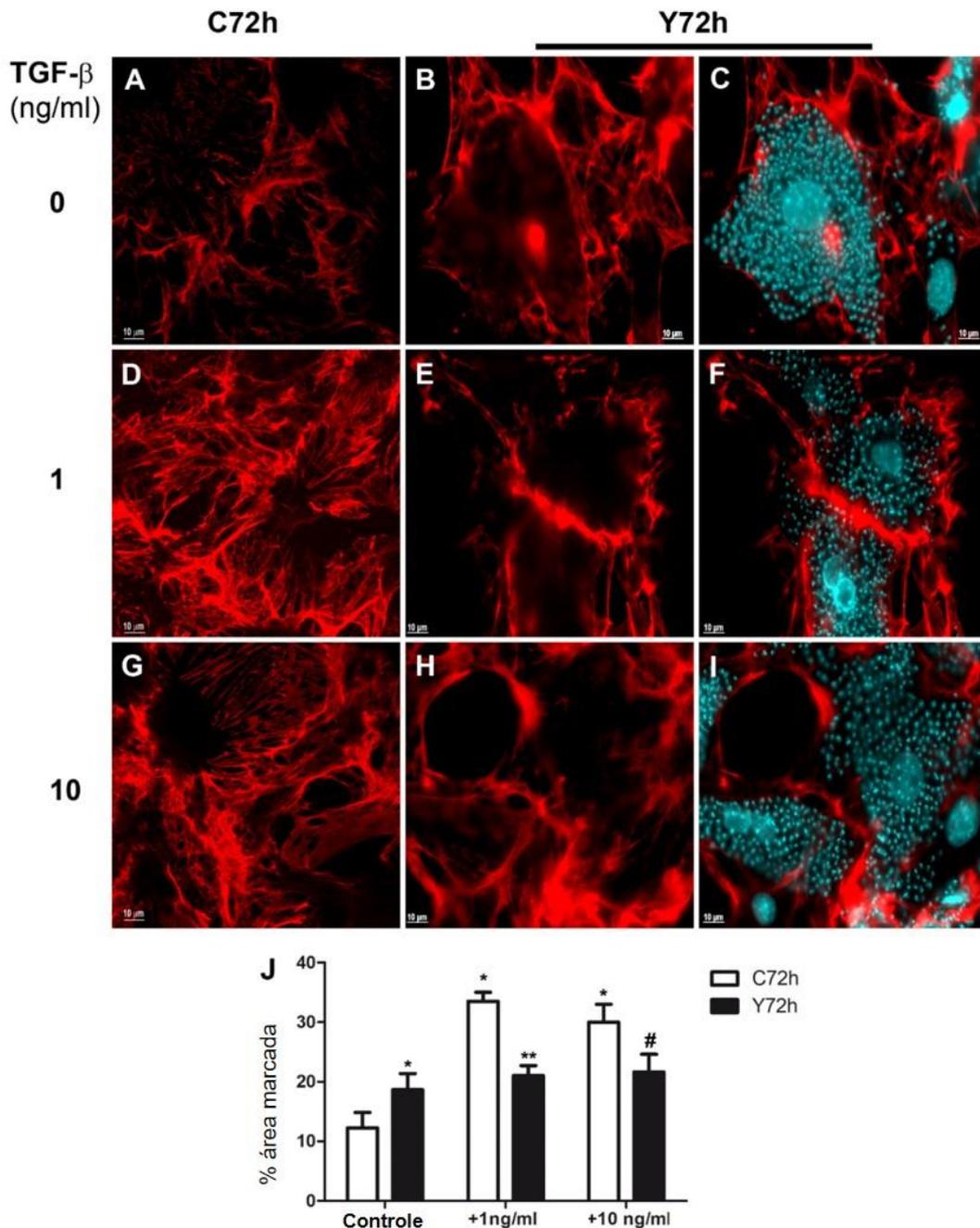


Figura 4.7 - Distribuição de fibronectina em fibroblastos cardíacos infectados pelo *T. cruzi* e estimulados com TGF- β . FN=fibronectina; FC= fibroblastos cardíacos. Coloração FN (vermelha) em FC não infectado, infectado com *T. cruzi* (B-C), mostrando intensificação da expressão de FN após 72 h de infecção, enquanto células altamente infectadas apresentaram redução localizada, quando comparadas a cultura controle não infectada (A). As culturas de FC apresentaram maior expressão de FN após tratamento com 1 ng / mL (D) e 10 ng / mL (G) de TGF- β . A cultura de FC ainda apresentava uma redução localizada da marcação de fibrilas de FN nas células infectadas, mesmo após o tratamento com TGF-(E-F, 1 ng / mL; H-I, 10 ng / mL). (J) Quantificação da espessura da fibrila FN por processamento de imagem com o software ImageJ. O DAPI (azul) foi utilizado para marcar o núcleo da célula hospedeira e cinetoplasto de parasitos intracelulares. * $p \leq 0,05$ vs. controle não infectado não infectado (C72h); ** $p \leq 0,05$ vs. não infectado + 1 ng / mL de TGF- β ; # $p \leq 0,05$ vs. não infectado + 10 ng / mL de TGF- β . Barra = 20 μ m. N=3.

Uma vez que fibroblastos cardíacos foram mais responsivos ao estímulo com TGF- β , nos propusemos a avaliar o efeito do TGF- β , TNF- α e IFN- γ na síntese e secreção de componentes de MEC, vias de sinalização e proliferação celular apenas em fibroblastos cardíacos não infectados e infectados pelo *T. cruzi* por 72 h e estimulados com citocinas por 48 h para avaliar componentes de MEC e proliferação celular ou 1 h de interação afim de investigar vias de sinalização que são disparadas após os estímulos com TGF- β , TNF- α e IFN- γ .

4.7 – Estímulo com TGF- β em culturas de fibroblastos cardíacos infectados pelo *T. cruzi*.

O perfil de infecção pelo *T. cruzi* foi quantificado em fibroblastos cardíacos através da contagem do número de células totais, células infectadas e parasitos intracelulares, permitindo a cálculo da porcentagem de infecção na cultura, bem como o número de amastigotas intracelulares em células infectadas. Culturas não estimuladas apresentaram elevado grau de infecção após 72 horas de infecção, com $80,5 \pm 17,3\%$ de células infectadas na cultura, e 137 ± 29 parasitos por célula infectada. O estímulo com TGF- β nas culturas não afetou os níveis de infecção, em que culturas estimuladas com TGF- β apresentaram $90 \pm 15\%$ de infecção e $138,4 \pm 62$ parasitos por célula infectada (1 ng / mL) e $90,3 \pm 8,7\%$ de infecção e 144 ± 24 parasitos por célula infectada (10 ng / mL).

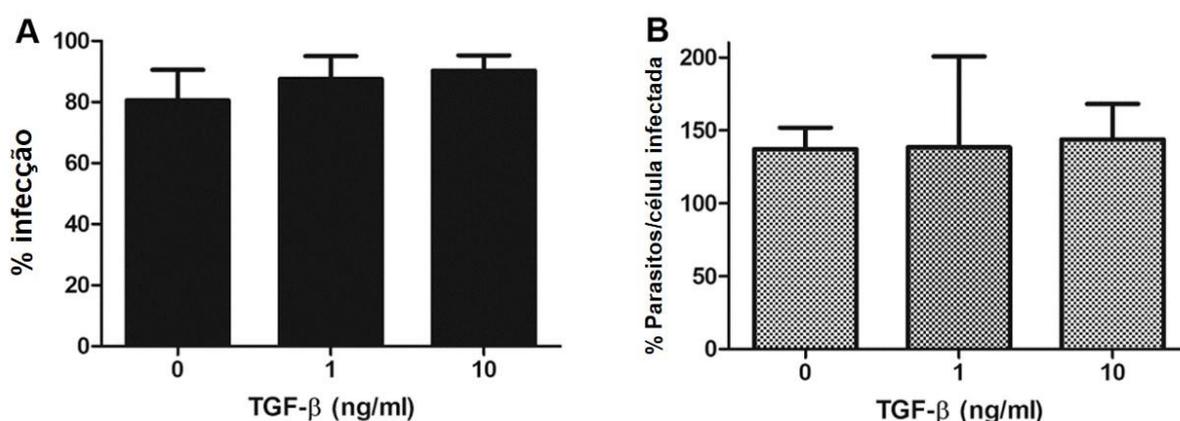


Figura. 4.8 – Quantificação dos níveis de infecção em fibroblastos cardíacos pelo *T. cruzi*. (A) Porcentagem de fibroblastos cardíacos infectados após o estímulo com TGF- β ; (B) Número de amastigotas intracelulares por célula infectada com adição de TGF- β . N=2.

4.8 – Modulação do citoesqueleto de actina em fibroblastos cardíacos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.

Para avaliar se o *T. cruzi* induz a quebra do citoesqueleto em fibroblastos cardíacos, fibroblastos cardíacos não infectadas e infectados com *T. cruzi*, estimulados ou não com TGF- β , foram marcados com com faloidina para visualizar microfilamentos de actina, juntamente com a marcação regular de FN por imunofluorescência indireta. Nossos resultados mostraram que o *T. cruzi* induz uma desorganização dos microfilamentos de actina (Figura 4.9 C-D), localizados na célula infectada, quando comparados com a cultura controle (Figura. 4.9 A-B) que apresentam rede de actina difundida. A quebra dos microfilamentos pelo parasito não é afetado com o estímulo com TGF- β , onde células altamente infectadas também apresentam uma quebra do citoesqueleto (Figura 4.9 G-H). Este fenômeno reflete na organização das fibrilas de FN, que é dependente de citoesqueleto. Culturas de FC infectadas com *T. cruzi* apresentaram uma distribuição localizada de redes de FN preferencialmente em áreas não infectadas da cultura (Figura 4.9 C-D), mesmo após estímulo com TGF- β (Figura 4.9 G-H).

Citoesqueleto de actina em fibroblastos cardíacos infectados com *T. cruzi*

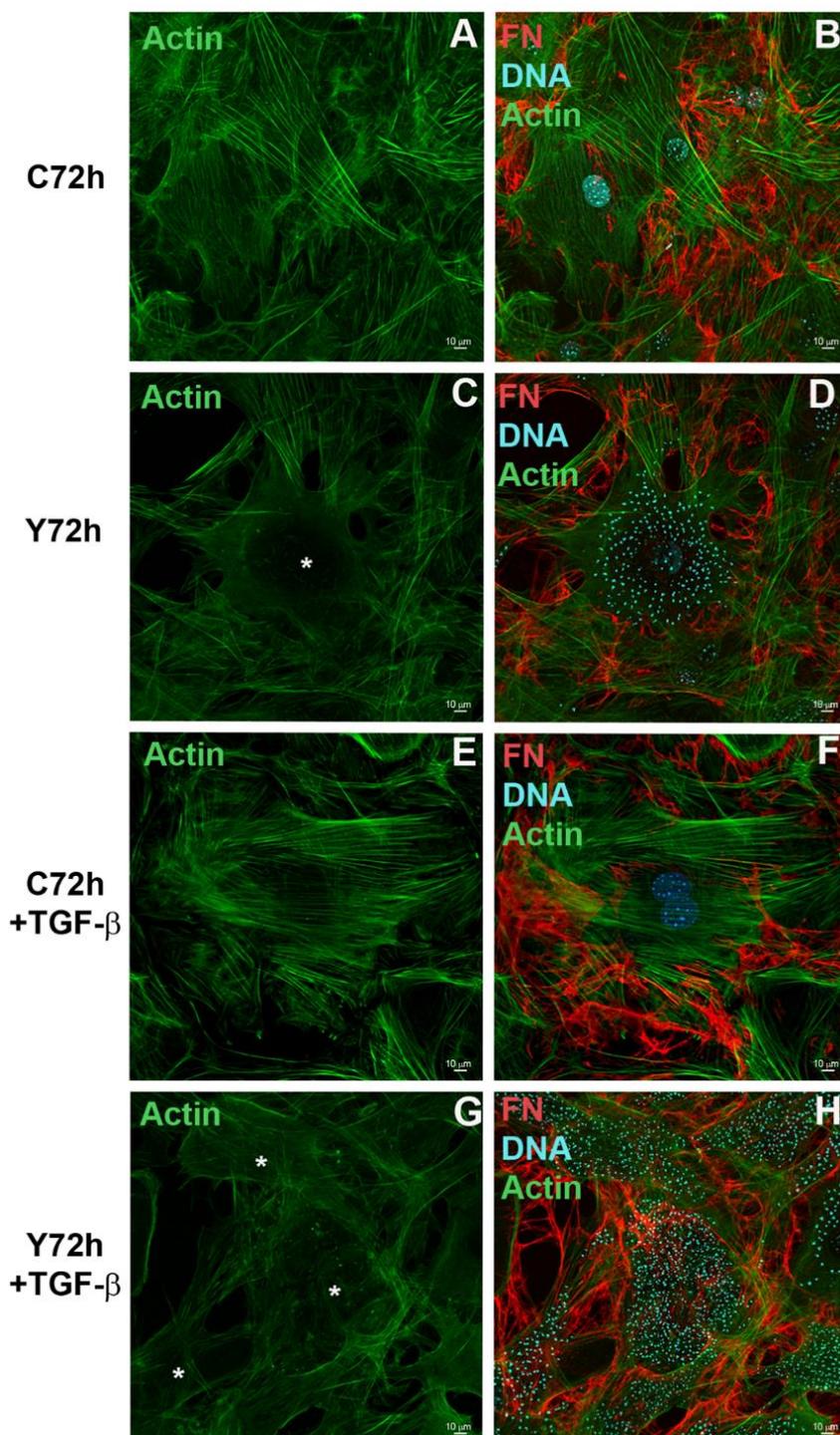


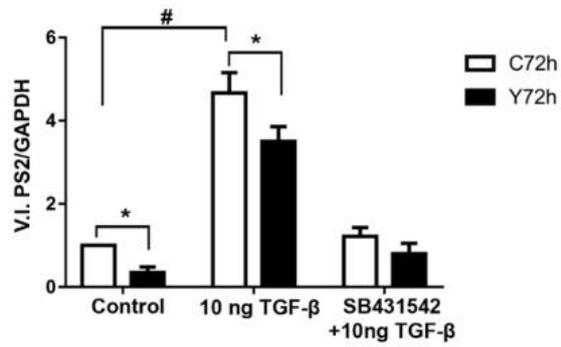
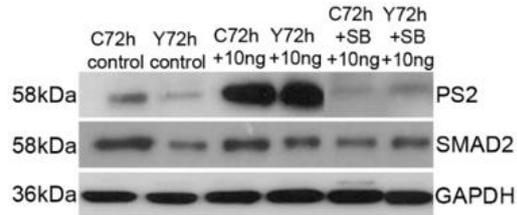
Figura 4.9 – Modulação do citoesqueleto de actina em fibroblastos cardíacos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Citoesqueleto de actina foi marcado com faloidina-FITC (verde). DAPI (azul) foi usado para identificar o núcleo da célula hospedeira e cinetoplasto dos parasitos intracelulares. A imunomarcacão de fibronectina está representado em vermelho. (A-B) Culturas controle não infectadas; (C-D) Infecção pelo *T. cruzi* desorganiza citoesqueleto de actina em FCs; (E-F) FC estimulados com TGF- β mostrando um aumento de fibrilas de FN na MEC (F); (G-H) Culturas de FC infectadas pelo *T. cruzi* e estimuladas com TGF- β (10 ng/mL) apresentam uma degradação miofibrilar da actina e na deslocalização da rede FN.* localização correspondente dos parasitas intracelulares. Barra = 10 μ m. N=2.

4.9 – Vias de sinalização envolvidas na modulação da MEC disparada pela infecção de fibroblasto cardíaco por *T. cruzi*.

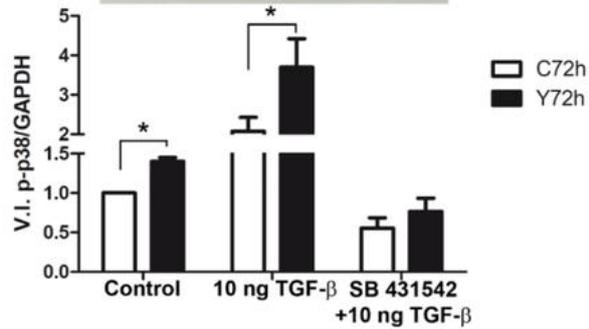
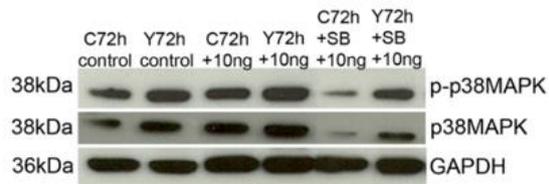
A associação de fibroblastos, células efectoras de fibrose, culturas de FC infectados pelo *T. cruzi* apresentaram uma redução na expressão de FN quando comparados com seus pares não infectados estimulados com TGF- β . Através desses dados, nos propusemos a avaliar detalhadamente a regulação das vias de sinalização envolvidas na modulação da MEC. Analisamos os perfis de ativação das vias de sinalização de SMAD 2 fosforilada (PS2), p38 MAPK fosforilados (p-p38 MAPK) e c-Jun fosforilados (p-c-Jun) em FC não infectados e infectados pelo *T. cruzi* (72 h) submetidos ou não ao estímulo com 10 ng/mL de TGF- β . Culturas de FC controle e infectadas com *T. cruzi* foram estimuladas com TGF- β . Uma redução de 59% na ativação do PS2 foi evidenciada em culturas de FC infectadas quando comparadas aos seus pares não infectados (Figura 4.10A). A adição de TGF- β exógeno induziu um aumento significativo de 4,6 vezes na ativação de PS2 de culturas FC infectadas com *T. cruzi* em comparação com culturas infectadas não estimuladas (Figura 4.10A). No entanto, uma redução de 28% na ativação da via SMAD2 foi evidenciada em cultura infectada pelo *T. cruzi* por 72h e não estimulada pelo TGF- β quando comparada aos níveis de fosforilação PS2 em cultura não infectada e estimulada por TGF- β (Figura 4.10A). Como esperado, uma inibição da ativação de PS2 foi revelada após o tratamento de culturas de FC com o inibidor farmacológico específico SB431542 (inibidor de sinalização por ALK5), atingindo níveis semelhantes aos controles (Figura 4.10A). Curiosamente, alta ativação de p38 MAPK foi revelada em FCs infectados com *T. cruzi* em comparação com culturas não infectadas, alcançando um aumento significativo de 54% na ativação desta via. A adição de 10 ng / mL de TGF- β induziu um aumento na fosforilação de p38 MAPK em culturas de FC não infectadas e infectadas, mas sua ativação foi maior em culturas infectadas, com 78% de aumento. O tratamento com SB431542 antes do estímulo com TGF- β levou a uma redução na fosforilação de p38 MAPK em ambas as condições (Figura 4.10B). A regulação positiva da via de sinalização c-Jun também foi induzida pela infecção pelo *T. cruzi*, sendo esse aumento significativo de ~2 vezes a fosforilação de c-Jun em comparação com FC não infectados (Figura 4.10C). Embora tenha sido observada uma ativação de 25% da via c-Jun em células não infectadas estimuladas, o aumento nos níveis de c-Jun fosforilado em FCs infectados com *T. cruzi* estimulado excedeu este valor em 35%. O SB431542 impediu a fosforilação de c-Jun em culturas de FC não infectadas e infectadas com *T. cruzi*.

Vias de sinalização canônica e alternativa do TGF- β

A



B



C

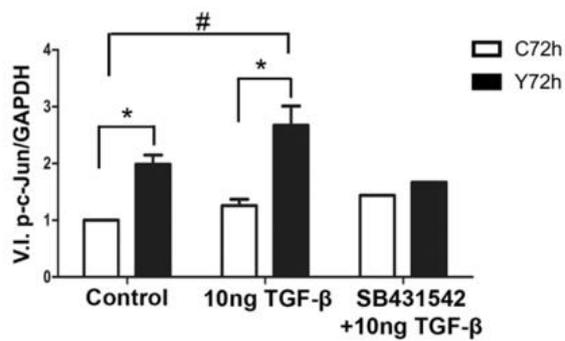
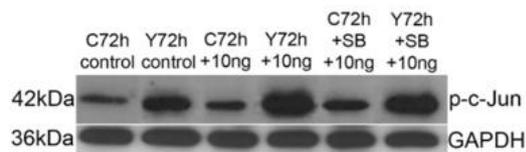


Figura 4.10 - Detecção de PS2, p-p38 MAPK e p-c-Jun em fibroblastos cardíacos não infectados e infectados pelo *T. cruzi*. PS2 = SMAD 2 fosforilada. p-p38 MAPK = p38 MAPK fosforilada. p-c-Jun = c-Jun fosforilada. (A) Detecção de PS2. Cultura de FC não infectados mostrou um aumento da fosforilação de SMAD2 quando tratados com 10 ng/mL de TGF- β . FC infectados apresentaram um aumento na fosforilação de SMAD2 após o estímulo com 10 ng / mL quando comparados com culturas de FC infectada não estimulada. O inibidor de SB431542 impediu a fosforilação de SMAD 2 em culturas de FC após o estímulo com TGF- β . (B) Detecção de p38 MAPK fosforilada. Em cultura não infectada de FC estimuladas com 10 ng / mL de TGF- β foi observado um aumento na fosforilação de p38MAPK. A infecção pelo *T. cruzi* não resultou em diferenças significativas na fosforilação da p38 MAPK,. Após a adição de 10 ng / mL de TGF- β , a via de sinalização foi acionada em FC. O inibidor SB431542 preveniu a fosforilação de p38 MAPK em cultura de FC não infectadas e infectadas estimuladas com 10 ng / mL de TGF- β . (C) Detecção de c-Jun fosforilada. A infecção pelo *T. cruzi* promoveu um aumento da via de sinalização c-Jun. A adição de TGF- β em culturas normais resultou em 25% de aumento na detecção de c-Jun. O aumento desencadeado pela infecção permanece e é aumentado após o estímulo com TGF- β . Em todos os painéis, as barras brancas correspondem às culturas controle, não infectadas (C72h), enquanto as barras pretas representam os níveis de culturas infectadas pelo *T. cruzi* (cepa Y) (Y72h). * $p \leq 0,05$ comparou seus pares de controle. N = 3.

4.10 – Detecção de SMAD 2 fosforilada em fibroblastos cardíacos infectados pelo *T. cruzi*.

Para avaliar se o *T. cruzi* pode modular a translocação de SMAD 2 fosforilada (PS2) ao núcleo em células infectadas pelo *T. cruzi*, fibroblastos cardíacos não infectados e infectados foram pré-tratados ou não com o inibidor de ALK5 SB431542, estimulados com TGF- β (10 ng/mL), e analisamos a localização de PS2 por imunofluorescência. Nossos dados mostraram que culturas controle não infectadas apresentam PS2 constitutivo no núcleo e no citoplasma (Figura 4.11A-B). A adição de TGF- β induz a fosforilação de SMAD2 com marcação intensa nos núcleos (Figura 4.11E-F) e um aumento de 50% no número de núcleos positivos para PS2 (Figura 4.11Q). A adição de SB431542 reduz a expressão constitutiva de PS2 (Figura 4.7 I-J), com diminuição de 26% nos núcleos positivos para PS2 (Figura 4.11Q). O inibidor também impede a fosforilação de SMAD2 após o estímulo pelo TGF- β (Figura 4.11M-N), correspondendo a 66% de inibição da ativação de PS2 no núcleo quando comparado a cultura FC estimulada com TGF- β (Figura 4.11Q). A infecção pelo *T. cruzi* em fibroblastos cardíacos reduz a fosforilação de SMAD 2 em núcleos de células hospedeiras (Figura 4.11C-D), com uma diminuição de 10% da localização de PS2 no núcleo. A presença de parasitos intracelulares resultou em uma inibição significativa na ativação de SMAD 2 após o estímulo com TGF- β (Figura 4.11G-H), com uma redução de 45% na localização nuclear de PS2 quando comparados com controles não infectados estimulados com TGF- β (Figura 4.11Q). A infecção pelo *T. cruzi* teve um efeito sinérgico com SB431542 em cultura de FC, apresentando baixa detecção de PS2 (Figura 4.11K-L) e uma redução de 48% nos núcleos positivos para PS2 quando comparados a cultura controle não infectada tratadas com SB431542 (Figura 4.11Q). O pré-tratamento de culturas infectadas com o inibidor de ALK5 antes da adição de TGF- β também resultou em uma baixa detecção de PS2 em FC (Figura 4.11O-P) e induziu uma inibição de 54% no número de núcleos positivos para PS2 quando comparados com culturas estimuladas com TGF- β e com os pares não infectados (Figura 4.11Q).

Localização de PS2 em FC estimulados com TGF- β

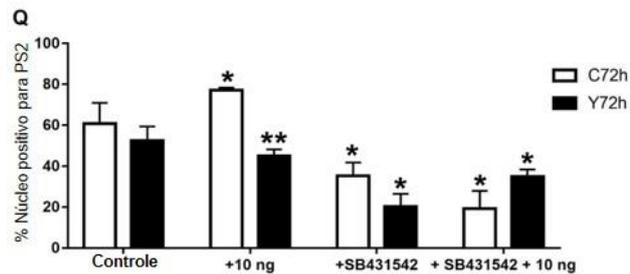
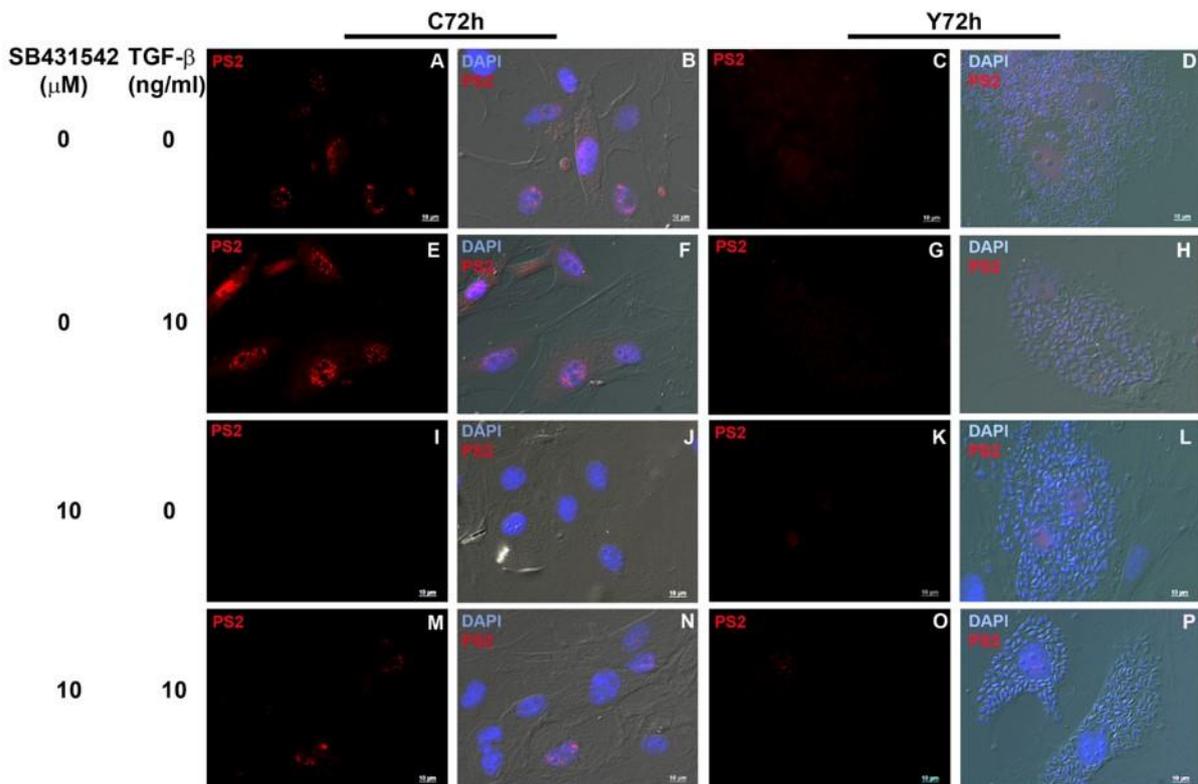


Figura 4.11 – Detecção de SMAD 2 fosforilada em fibroblastos cardíacos infectados pelo *T. cruzi*. PS2 = SMAD 2 fosforilada. A marcação de PS2 está mostrada em vermelho (A, C, E, G, I, K, M, O), enquanto os núcleos de células são representados em azul após a marcação com DAPI e com DIC (B, D, F, H, J, L, N, P). (A-B) Cultura controle não infectada (C72h) revelou a fosforilação constitutiva de SMAD 2; (C-D) A infecção pelo *T. cruzi* (72h-Y72h) reduziu a fosforilação de SMAD 2 (Y72h); (E-F) O tratamento com TGF- β em culturas não infectadas; (G-H) A infecção pelo *T. cruzi* impediu a sinalização do PS2 em FC; O SB431542 inibiu a detecção de PS2 em culturas de FC não infectadas (I-J) e infectadas pelo *T. cruzi* (K-L); (M-N) SB431542 impediu a detecção de PS2 após o estímulo com TGF- β ; (O-P) A infecção pelo *T. cruzi* e o tratamento com SB431542 resultaram em uma baixa detecção de PS2 em FC. (Q) Quantificação da porcentagem de núcleos positivos para PS2. * $p < 0,05$ vs. controle não tratado e não infectado; ** $p < 0,05$ vs. C72h + TGF- β . Barra = 10 μ m. N=3.

4.11 – Proliferação de fibroblastos cardíacos infectados pelo *T. cruzi* e estimulados com TGF- β .

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica e desempenha diversas funções na célula hospedeira. Foi observado através do estímulo com TGF- β um aumento na expressão de FN na MEC, na detecção da via clássica e alternativa de sinalização em FC não infectado e infectado pelo *T. cruzi*. Para avaliar se a infecção pelo *T. cruzi* e o TGF- β desempenham um papel na proliferação em FC, culturas foram infectadas pelo *T. cruzi* e estimuladas por 48 horas com diferentes concentrações de TGF- β (1 e 10 ng/mL). Curiosamente, a infecção por *T. cruzi* aumentou a proliferação de FC em 37% em comparação com células não infectadas. Culturas não infectadas e infectadas com *T. cruzi* apresentaram uma resposta semelhante na indução da proliferação de FC após o estímulo com TGF- β . Níveis de proliferação celular 2,5X maiores foram revelados após o estímulo com 10 ng/mL de TGF- β tanto em culturas não infectadas quanto infectadas pelo *T. cruzi* (Figura 4.12).

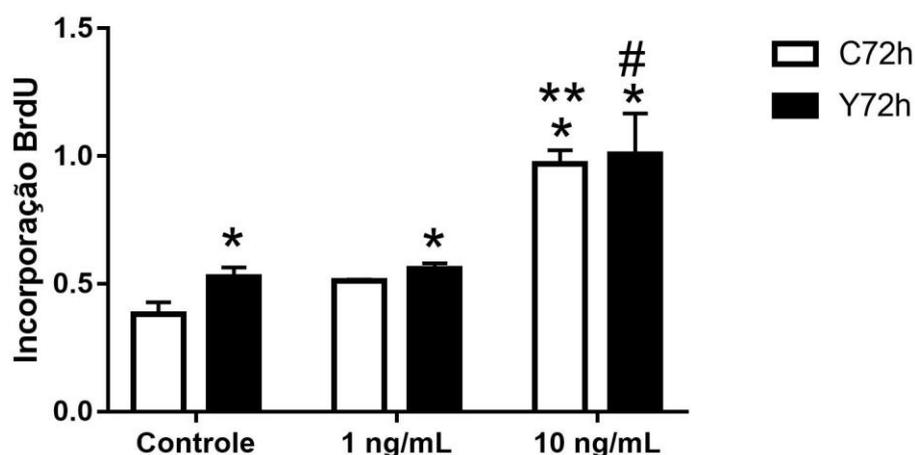


Figure 4.12 – Proliferação de fibroblastos cardíacos estimulados com TGF- β . Fibroblastos cardíacos estimulados com diferentes concentrações de TGF- β (1 e 10 ng/mL) mostraram uma alta proliferação de fibroblastos cardíacos de forma dose dependente quando comparados com FC não estimulados. * $p \leq 0,05$ vs. cultura controle não tratado e não infectado; ** $p \leq 0,05$ vs. controle + 1 ng / mL de TGF- β ; # $p \leq 0,05$ vs. *T. cruzi* 72h + 1 ng/mL de TGF- β . N=3.

Resultados *in vitro*

Parte II: TNF- α e

IFN- γ

4.12 – Depósito de fibronectina em fibroblastos cardíacos infectados pelo *T. cruzi* e estimulados por TNF- α e IFN- γ .

Após nossos resultados mostrarem uma regulação na expressão de FN na MEC após o estímulo com TGF- β , nos propomos a avaliar o efeito de TNF- α e IFN- γ em culturas de fibroblastos cardíacos infectados com *T. cruzi*. FC normais e infectados com *T. cruzi* (cepa Y) foram estimulados com TNF- α e IFN- γ em diferentes concentrações (10, 50 e 100 ng/mL) (Figura 4.13A e 4.13B). Em todas as concentrações foi observado um aumento na expressão de FN. O aumento de FN foi observado a partir de doses menores (10 ng/mL), se intensificando após o estímulo com 50 ng/mL quando comparados com a cultura controle. Em concordância com nossos dados anteriores de tratamento com TGF- β , culturas de FC infectadas pelo *T. cruzi* mostram aumento da expressão de FN na MEC. No entanto em culturas infectadas pelo *T. cruzi* e estimuladas com TNF- α , apresentaram perfil distinto quanto na expressão de FN na MEC, com uma redução na expressão de FN quando comparados com seus pares não infectados estimulados (Figura 4.13A). Também analisamos se o estímulo com IFN- γ apresentava efeitos similares ao TNF- α em fibroblastos cardíacos não infectados e infectados pelo *T. cruzi*. Para isso, culturas não infectadas de FC foram estimuladas com diferentes concentrações de IFN- γ (10, 50 e 100 ng/mL). Após o estímulo com diferentes concentrações de IFN- γ , foi observado um aumento na expressão de FN na MEC a partir de 10 ng/mL, sendo esse aumento mais significativo quando estimulados com 100 ng/mL. Após o estímulo com diferentes concentrações de IFN- γ (10, 50 e 100 ng/mL), FC infectados pelo *T. cruzi*, mostraram uma redução na expressão de FN na MEC quando comparados com seus pares não infectados estimulados com 10 e 100 ng/mL de IFN- γ (Figura 4.13B).

Depósito de FN na MEC após o estímulo com TNF- α e IFN- γ

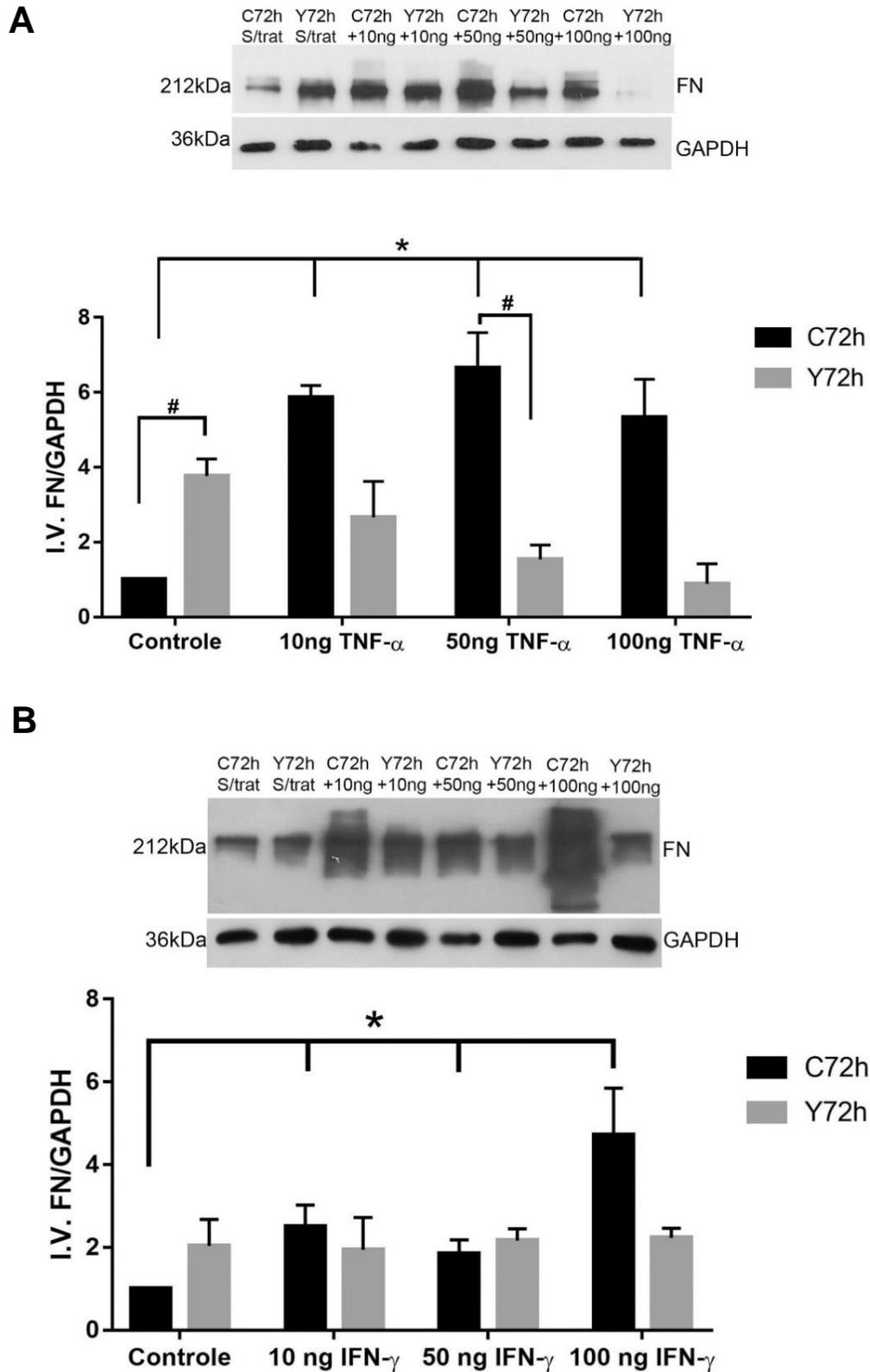


Figura 4.13 – Depósito de fibronectina em cultura de fibroblastos cardíacos estimulados com TNF- α e IFN- γ . FN = Fibronectina. (A) Culturas não infectadas de FC foram estimulados com 10, 50 e 100 ng/mL de TNF- α . O estímulo resultou um aumento na expressão de fibronectina em FC. FC

infectados com *T. cruzi* mostraram aumento na deposição de FN na MEC. No entanto, em culturas infectadas e estimuladas com TNF- α , houve uma redução na expressão de FN quando comparados com seus pares normais estimulados. (B) Culturas não infectadas de FC foram estimuladas com 10, 50 e 100 ng/mL de IFN- γ . A partir de doses menores, 10 ng/mL foi observado um aumento na expressão de FN com aumento mais expressivo após 100 ng/mL. A infecção nesse tipo celular propicia um aumento na expressão de FN. Em culturas infectadas e estimuladas com diferentes concentrações de IFN- γ , uma redução na expressão de FN quando comparados com seus pares normais estimulados com 10 e 100 ng/mL foi observada. Em todos os painéis, as barras pretas correspondem a cultura controle, não infectada (C72h), enquanto que as barras cinzas representam os níveis de FN em culturas infectadas pelo *T. cruzi* (cepa Y) (Y72h). * $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura controle e # $p \leq 0.05$ quando comparados com seus pares estimulados. N=4.

4.13 – Depósito de colágeno em cultura de fibroblastos cardíacos.

O quadro de fibrose cardíaca na doença de Chagas é caracterizado pelo aumento exacerbado de componentes de MEC no tecido cardíaco, incluindo colágeno. Além de observarmos o efeito de citocinas pro-inflamatórias no depósito de FN na MEC em cultura primária de FC infectadas pelo *T. cruzi* (cepa Y), analisamos também o depósito de colágeno total na MEC. Utilizamos o corante Sirius Red/Fast Green para medir a deposição de colágeno total em culturas de FC não infectadas e infectadas pelo *T. cruzi* e estimuladas com TNF- α (Figura 4.14A) e IFN- γ (Figura 4.14B) em diferentes concentrações (10, 50 e 100 ng/mL). Após o estímulo com as citocinas, foi observado aumento na expressão de colágeno em FC de forma dose dependente de concentração (Figura 4.14A). A infecção pelo *T. cruzi* desencadeou aumento na deposição de colágeno em FC. O estímulo com TNF- α (10, 50 e 100 ng/mL) em cultura de FC infectadas pelo *T. cruzi*, resultou em aumento na deposição de colágeno na MEC (Figura 4.14A). Em relação ao tratamento com IFN- γ , todas as concentrações analisadas foram efetivas em estimular colágeno em FC, a partir de 10 ng/ml. Assim como observado no tratamento com TNF- α , culturas de FC infectadas pelo *T. cruzi* e estimuladas com IFN- γ (10, 50 e 100 ng/mL), mostraram aumento na deposição de colágeno total na MEC em todas as concentrações analisadas (Figura 4.14B).

Depósito de colágeno após o estímulo com TNF- α e IFN- γ

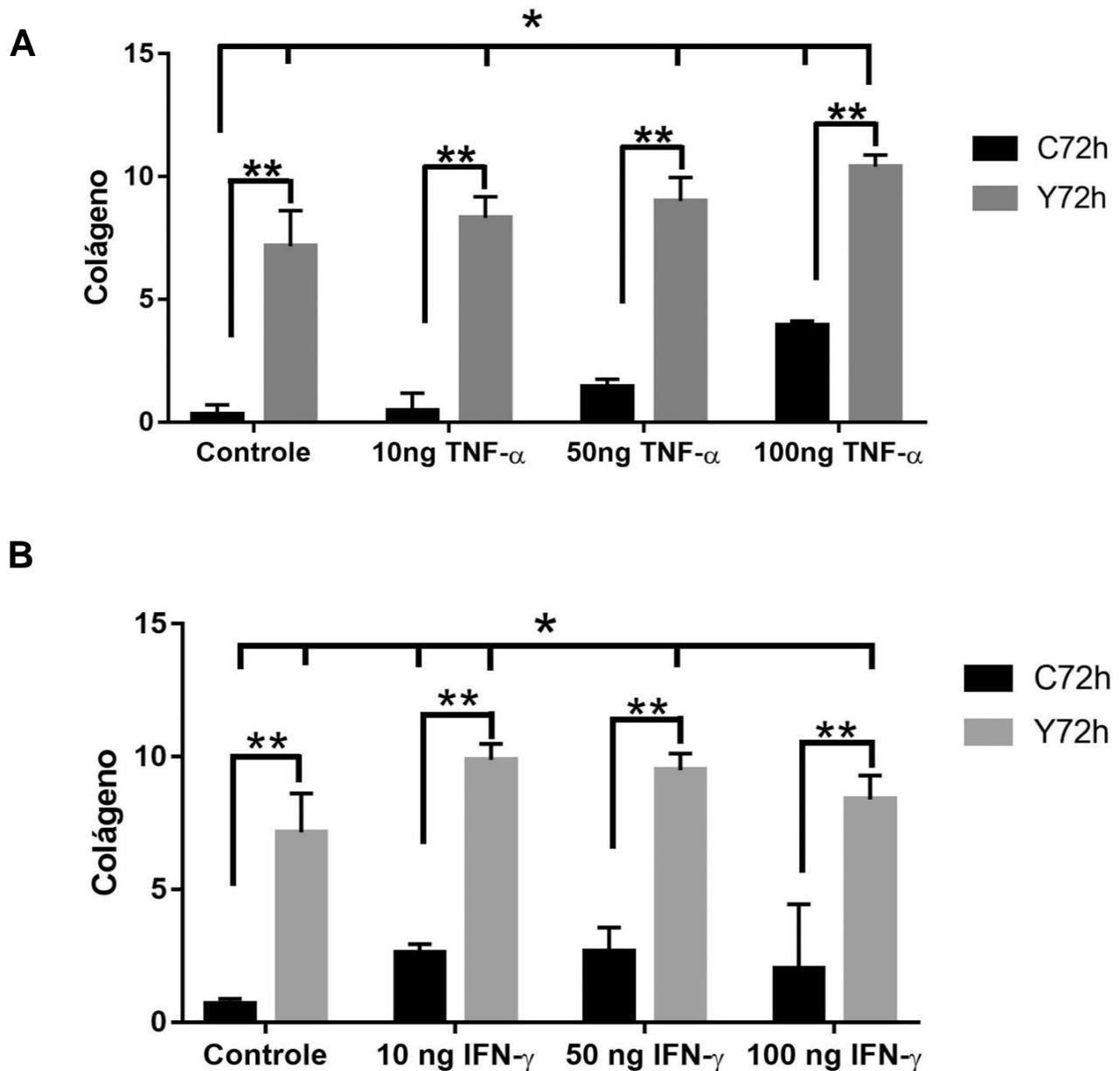


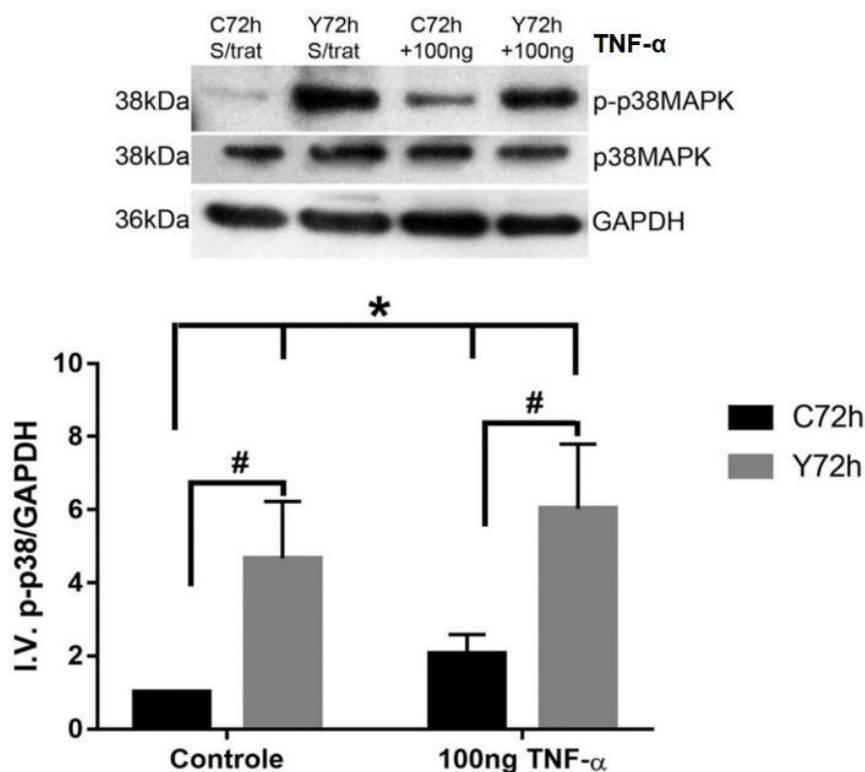
Figura 4.14 – Depósito de colágeno em cultura primária de fibroblastos cardíacos. Cultura de fibroblastos cardíacos não infectadas e infectadas com *T. cruzi* (cepa Y) foram estimuladas com TNF- α ou IFN- γ (10, 50 e 100 ng/mL). (A) O estímulo com diferentes concentrações de TNF- α resulta em um aumento da expressão de colágeno, de forma dose dependente de concentração. A infecção em FC resulta em aumento na expressão de colágeno. Com o estímulo de diferentes concentrações de TNF- α em FC infectados com *T. cruzi*, dados revelaram um aumento na deposição de colágeno na MEC sob essas condições de forma dose dependente. (B) O estímulo com diferentes concentrações de IFN- γ em FC não infectadas, permitiram um aumento na expressão de colágeno total na MEC. A infecção em FC modula a expressão de colágeno total, sendo observado um aumento na expressão dessa proteína. O estímulo do IFN- γ em FC infectados com *T. cruzi* acarreta um aumento na expressão de colágeno de forma dose dependente de concentração. Em todos os painéis, as barras pretas correspondem a culturas controle, não infectadas (C72h), enquanto que as barras cinzas representam os níveis de culturas infectadas pelo *T. cruzi* (cepa Y) (Y72h). * $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura controle; ** $p \leq 0.05$ quando comparados com seus pares; # $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura controle. N=2.

4.14 – Vias de sinalização MAPK em cultura primária de fibroblastos cardíacos estimulados com TNF- α ou IFN- γ .

Nosso estudo revelou que fibronectina e colágeno têm expressão aumentada quando FC são estimulados com TNF- α e IFN- γ . Para analisar se proteínas da via de sinalização da família MAPK estão envolvidas no processo de síntese e secreção de proteínas de MEC, a fosforilação de p38MAPK e c-Jun foram analisadas em cultura primária de fibroblastos cardíacos não infectadas e infectados pelo *T. cruzi*. FC não infectadas e infectados pelo *T. cruzi* foram estimuladas com 100 ng/mL de TNF- α ou IFN- γ (Figura 4.15A e Figura 4.15B), respectivamente. A infecção pelo *T. cruzi* em FC resultou em um aumento na fosforilação de p38 MAPK quando comparados com a cultura não infectadas não infectada e não tratada (Figura 4.15A e 4.15B). Em culturas normais de FC estimuladas com 100 ng/mL com TNF- α ou IFN- γ , foi observado um aumento na fosforilação de p38 MAPK (p-p38 MAPK) (Figura 4.15A e 4.15B). O aumento na fosforilação de p38 MAPK em FC infectadas pelo *T. cruzi* e estimulados com 100 ng/mL de TNF- α ou IFN- γ permaneceu inalterado em relação às culturas não infectadas (Figura 4.15A e 4.15B). Também avaliamos a via de sinalização de c-Jun em FC. Inicialmente, culturas normais de FC estimulados com 100 ng/mL de TNF- α (Figura 4.16A) e IFN- γ (Figura 4.16B), mostraram aumento na fosforilação de c-Jun quando comparados com a cultura controle não estimulada. Por sua vez, a infecção pelo *T. cruzi* em FC resultou em um aumento na fosforilação de c-Jun (Figura 4.16A e 4.16B). Após o estímulo com 100 ng/mL de TNF- α (Figura 4.16A) ou IFN- γ (Figura 4.16B) em FC infectados pelo *T. cruzi*, aumento na fosforilação de c-Jun foi observado quando comparado com seus pares estimulados.

Via de sinalização p38 MAPK após estímulo com TNF- α e IFN- γ

A



B

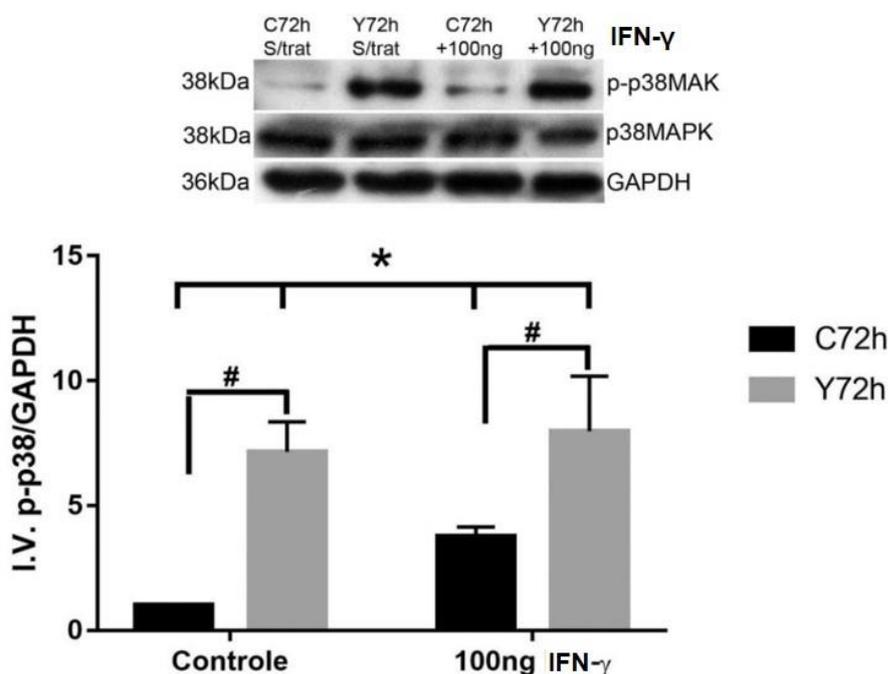
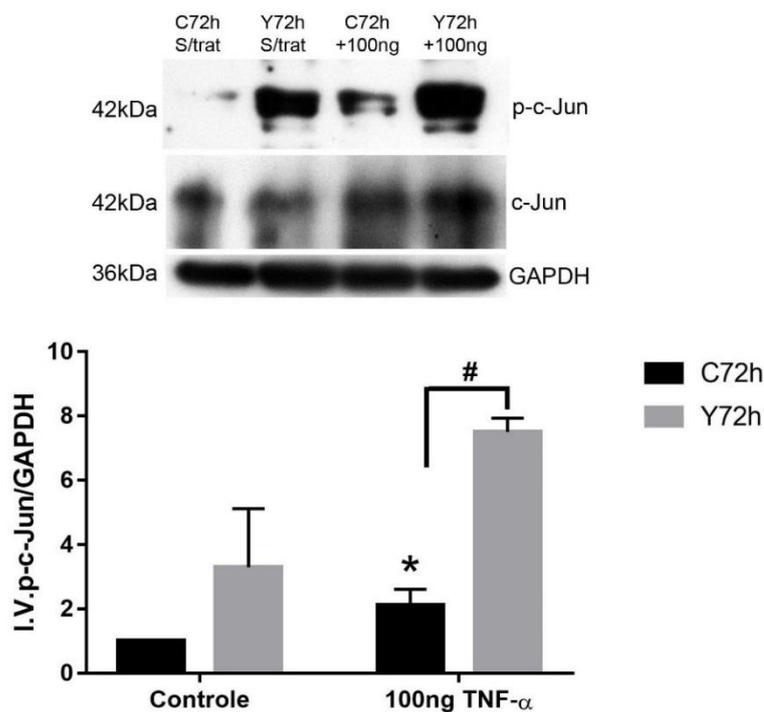


Figura 4.15 – Detecção de p38 MAPK fosforilada em cultura primária de fibroblastos cardíacos. Cultura primária de fibroblastos cardíacos foram infectadas com *T. cruzi* (cepa Y) e estimuladas com 100 ng/mL de TNF- α e IFN- γ . (A-B) Como observado anteriormente, FC infectados com *T. cruzi*, apresentam aumento na fosforilação de p38 MAPK. O estímulo de 100 ng/mL de TNF- α (A) e IFN- γ (B) resultou em um aumento na fosforilação de p38 MAPK quando comparado com a cultura controle. Em cultura de FC infectadas e estimuladas com 100 ng/mL de TNF- α (A) ou IFN- γ (B), foi observado um aumento na fosforilação de p38 MAPK quando comparados com a cultura controle e com seu par não infectada estimulado. * $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura controle; # $p \leq 0.05$ quando comparados com seus pares. N=4.

Vias de sinalização c-Jun após estímulo com TNF- α e IFN- γ

A



B

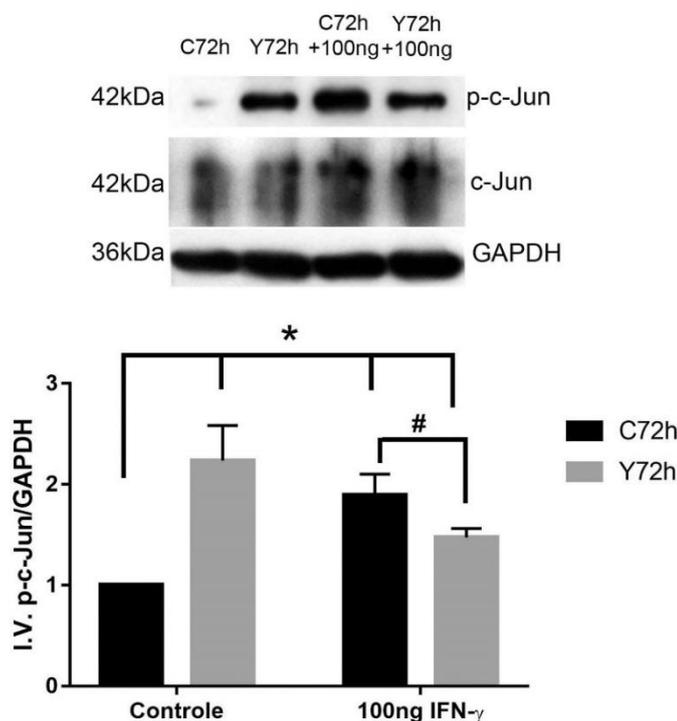


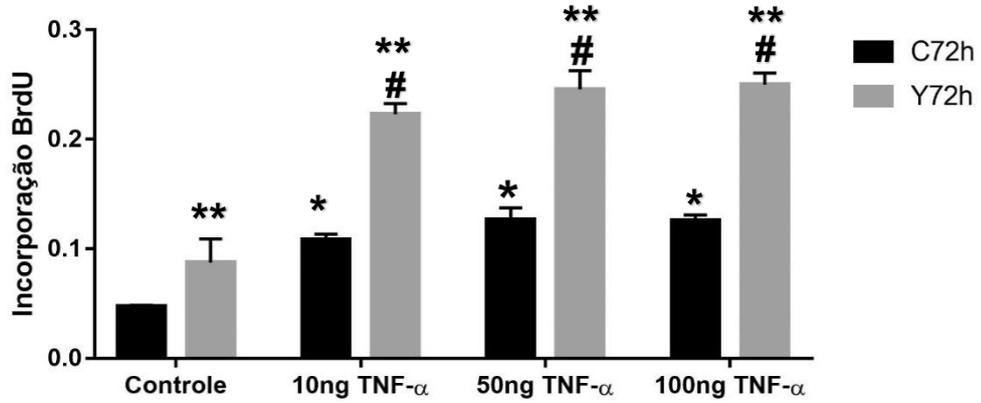
Figura 4.16 – Detecção de c-Jun fosforilada em cultura primária de fibroblastos cardíacos. A infecção pelo *T. cruzi* resultou em aumento na fosforilação de c-Jun. O estímulo de 100 ng/mL de TNF- α (A) e IFN- γ (B) resultou em um aumento na fosforilação de c-Jun em culturas de FC quando comparados com a cultura controle. Em cultura de FC infectadas com *T. cruzi* e estimuladas com 100 ng/mL de TNF- α , aumento na fosforilação de c-Jun foi observado um quando comparados com a cultura controle e com seu par normal estimulado (A). No entanto, a infecção pelo *T. cruzi* reduz a estimulação de c-Jun por IFN- γ (B). * $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura controle; # $p \leq 0.05$ quando comparados com seus pares. N=4.

4.15 – Proliferação de fibroblastos cardíacos estimulados com TNF- α e IFN- γ .

Avaliamos a proliferação de FC não infectados e infectados pelo *T. cruzi*, através de ensaios de incorporação de 5-bromo-2'-deoxyuridine, um análogo do nucleosídeo timidina, após o estímulo com TNF- α e IFN- γ em diferentes concentrações (10, 50 e 100 ng/mL). Culturas de FC estimuladas com diferentes concentrações (10, 50 e 100 ng/mL) de TNF- α (Figura 4.17A) e IFN- γ (Figura 4.17B) resultou em aumento na proliferação de FC em todas as concentrações quando comparado com a cultura controle não estimulada. A infecção pelo *T. cruzi* modulou a proliferação de FC, confirmando nossos dados prévios. Após o estímulo com TNF- α (Figura 4.17A) e IFN- γ (Figura 4.17B) em FC infectados pelo *T. cruzi*, foi observado um aumento na proliferação celular quando comparados com a cultura infectada não estimulada.

Proliferação de FC estimulados com TNF- α e IFN- γ

A



B

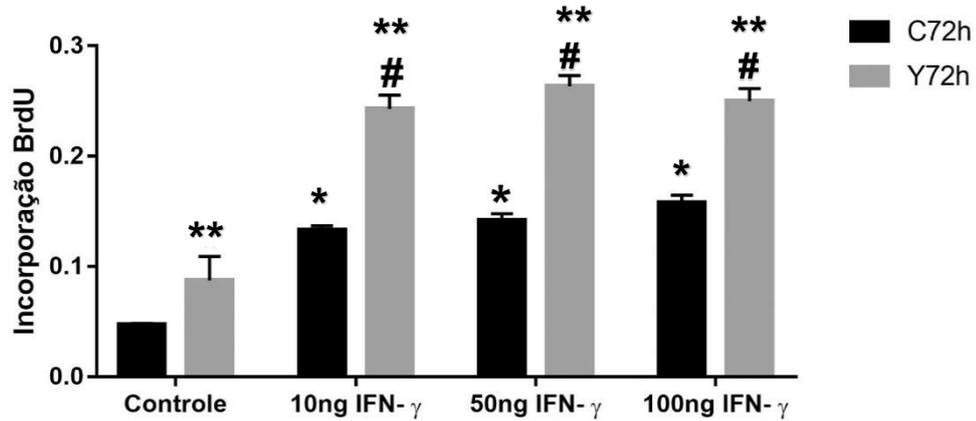


Figura 4.17 – Proliferação de fibroblastos cardíacos estimulados com TNF- α e IFN- γ . Culturas de FC não infectadas e infectadas pelo *T. cruzi* da cepa Y, foram estimuladas com TNF- α e IFN- γ para avaliar a proliferação de FC através da incorporação do 5-bromo-2'-deoxyuridine. TNF- α (A) e IFN- γ (B) promoveram aumento na proliferação celular em FC em todas as concentrações testadas (10, 50 e 100 ng/mL). A infecção pelo *T. cruzi* disparou a proliferação nesse tipo celular (A e B). O estímulo de TNF- α (A) e IFN- γ (B) em cultura de FC infectados com *T. cruzi*, levou a aumento na proliferação de FC. * $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura controle; ** $p \leq 0.05$ quando comparados com seus pares; # $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura infectada, não estimulada. N=3.

Resultados *in vitro*

Parte III:

Compostos

4.16 – Efeito da infecção pelo *T. cruzi* e de inibidores de vias de sinalização na expressão de colágeno em fibroblastos cardíacos humano (FCh).

Nossos resultados anteriores mostram que o *T. cruzi* estimula a síntese de FN e colágeno em fibroblastos cardíacos murinos de cultura primária, através das vias de sinalização p38 MAPK e c-Jun. Assim, o próximo passo foi estabelecer modelos de triagem de compostos anti-fibrose induzida pelo *T. cruzi in vitro* e investigar se esses compostos são potenciais para o tratamento da fibrose cardíaca na doença de Chagas. No nosso estudo, linhagem de fibroblastos cardíacos humanos imortalizados foram obtidas como doação para execução do nosso projeto. A partir desse evento, para medir a expressão de colágeno e de proteínas totais em FCh infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil), utilizamos os corantes Sirius Red/Fast Green, que permitem avaliar a medida do colágeno em conjunto o efeito citotóxico pela medida simultânea de proteínas totais. A infecção pelo *T. cruzi* estimulou aumento na síntese e no depósito de colágeno total. A fim de promover a inibição de colágeno, compostos como Benzonidazol 100 μ M, Pirfenidona (inibidor de TGF- β e TNF- α , 1000 μ M), Losmapimod (inibidor de p38 MAPK, 30 μ M) e SP600125 (inibidor de c-Jun, 10 μ M) foram administrados em concentrações únicas em FCh infectados com *T. cruzi* (Figura 4.18A). Nossos dados revelaram que os compostos em diferentes concentrações, reduziram a deposição de colágeno em FCh infectados pelo *T. cruzi*.

No entanto, o processo de fibrose da doença de Chagas é desencadeado e sustentado tanto pela inflamação quanto por fatores parasitários. Assim, culturas de FCh foram estimuladas com soro de camundongos BALB/c fêmeas não infectadas ou infectados pelo *T. cruzi* (cepa CL-Luc entre 90 e 120 dpi), para avaliar efeitos parácrinos promovidos pela infecção pelo *T. cruzi* na MEC de células hospedeiras. Nossos dados revelaram que o soro de camundongos infectados propicia um aumento no depósito de colágeno em FCh. O tratamento com 100 μ M de Benzonidazol, 1000 μ M de pirfenidona, 30 μ M de Losmapimod e 10 μ M de SP600125, reduziram a síntese e deposição de colágeno em FCh estimulados com soro de camundongos infectados pelo *T. cruzi* (Figura 4.18B).

Expressão de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos infectados com *T. cruzi* e estimulados com soro de animais infectados

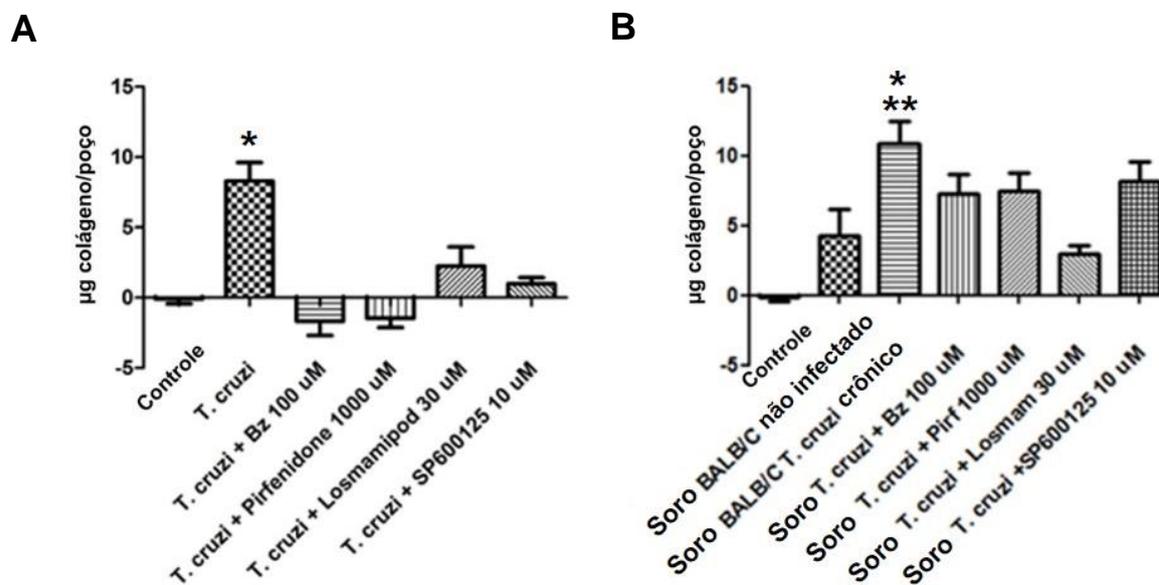


Figura 4.18 – *T. cruzi* modula expressão de colágeno e inibidores de sinalização inibem estímulo de colágeno. (A) A infecção pelo *T. cruzi* (cepa Brazil), (B) e o estímulo com soro de camundongos não infectados e infectados, acarretaram no aumento da expressão de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos. Dados revelaram que o tratamento com Bz, Pirfenidona, Losmapimod e SP600125 promoveram uma redução na expressão de colágeno em culturas de FCh infectados pelo (A) *T. cruzi* e (B) estimulados com soro de camundongos não infectados e infectados pelo *T. cruzi*. * $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura controle; ** $p \leq 0.05$ quando comparados com soro não infectado. N=3.

4.17 – Depósito de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos (FCh) estimulados com meio condicionado e lisado do parasito.

O processo de fibrose é um fenômeno desencadeado e sustentado pela presença de células inflamatórias acionadas por moléculas secretadas pelo parasito, e não apenas diretamente através da infecção. Na fase crônica, uma vez a fibrose estabelecida, ninhos de amastigotas não são facilmente visualizados, e a quantidade de fibrose não é proporcional ao grau de infecção. Por sua vez, esse efeito parácrino pode ser um fator chave na modulação de componentes de MEC em células efetoras como o FCh no desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas. Para avaliar o efeito parácrino da infecção pelo *T. cruzi* na expressão de colágeno e FN na MEC, culturas de FCh foram estimulados com 150µg/mL de meio condicionado pelo parasito (MCP) ou com o lisado do *T. cruzi* (TCL). Com a utilização do corante Sirius red, foi possível detectar a expressão de colágeno após o estímulo em FCh com antígenos de *T. cruzi*. Nossos resultados revelaram que doses únicas de MCP e TCL induzem a expressão de colágeno na MEC em culturas de FCh quando comparados com a cultura controle (Figura 4.19A). Avaliamos também a expressão de colágeno utilizando curva de concentração de MCP variando entre 0,02 – 150 µg/mL de MCP. O estímulo com diferentes concentrações de MCP induziu aumento linear na expressão de colágeno na MEC em FCh (Figura 4.19B). Após a análise da expressão de colágeno na MEC em FCh estimulados com MCP e TCL, avaliamos também o papel de MCP na distribuição espacial de FN na MEC por imunofluorescência indireta. FCh foram estimuladas com MCP. Resultados revelaram um aumento na expressão de FN na MEC quando comparados com a cultura controle não infectada e não estimulada (Figura 4.19C). Dados de processamento de imagem confirmaram o aumento na expressão de FN na MEC, quando comparados com a cultura controle (Figura 4.19D).

Depósito de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos estimulados com meio condicionado e lisado do parasito

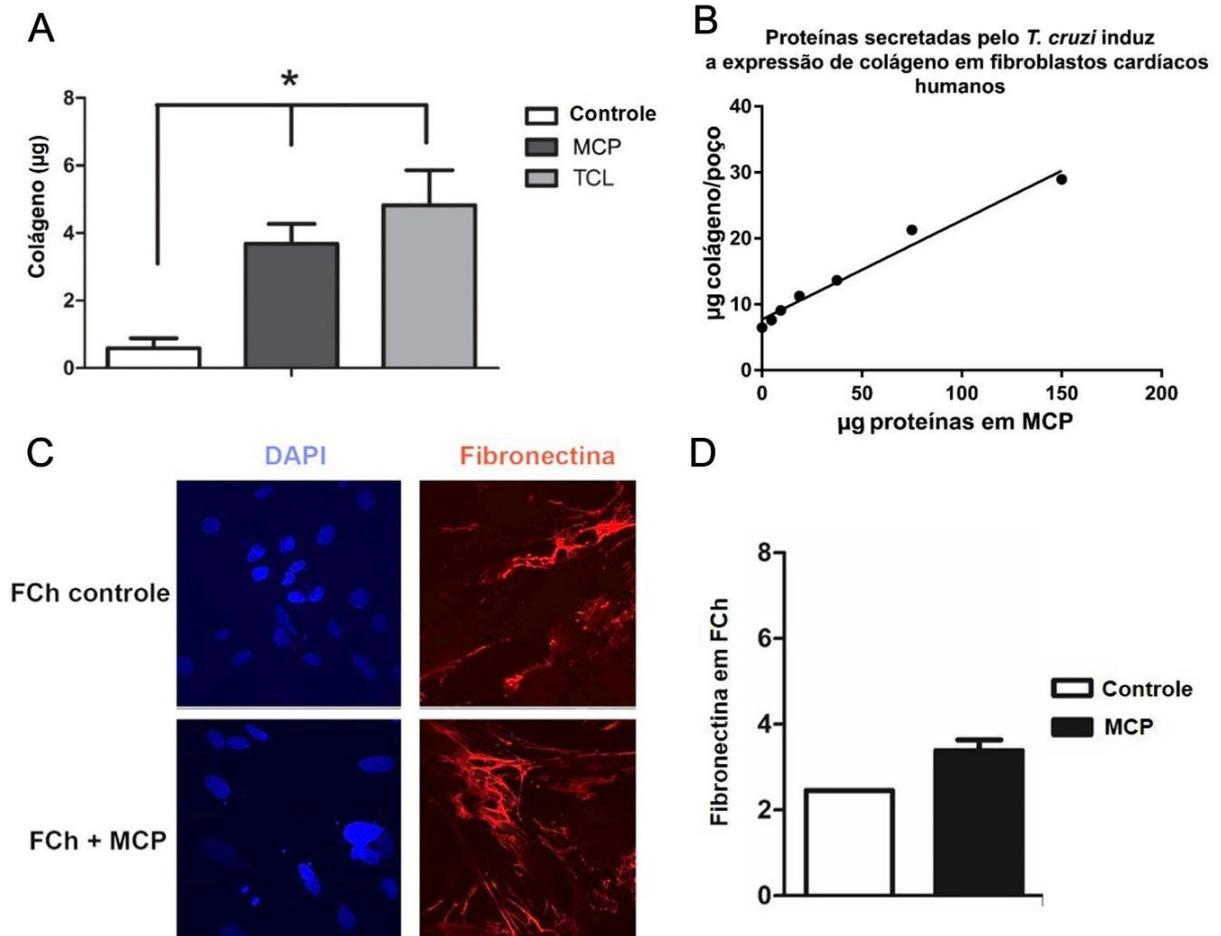


Figura 4.19 – Meio condicionado pelo parasita e lisado do *T. cruzi* estimulam MEC em FCh. FCh = fibroblastos cardíacos humanos. MCP = meio condicionado pelo parasito. TCL = *T. cruzi* lisado. Culturas de fibroblastos cardíacos humanos foram estimulados com meio condicionado por *T. cruzi* e lisado do parasito. (A) MCP e TCL estimularam o aumento na expressão de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos. (B) Concentrações crescentes de MCP (0,02 – 150µg/mL) em FCh construíram uma curva linear de aumento na deposição de colágeno na MEC. (C) Análises qualitativas por imunofluorescência revelaram que o estímulo com MCP em FCh promoveu um aumento na expressão de FN na MEC. (D) Dados quantitativos por processamento de imagem foram consistentes e resultaram em um aumento na expressão de FN na MEC após o estímulo de MCP em FCh. Barra=10µm. N=2.

4.18 – Ação de compostos e glicosaminoglicanos no depósito de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos infectados com *T. cruzi*

FCh infectados pelo *T. cruzi* ou estimulados com soro de camundongos infectados, tratados com doses únicas de diferentes compostos (benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125), reduziram a expressão de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos. Assim, realizamos os ensaios com curva de concentração dos inibidores, na faixa de 0,04 – 100 μM para benzonidazol (100 μM), losmapimod e SP600125 e de 0,45 –1000 μM para pirfenidona. Nosso ensaio foi sensível o suficiente para construir curvas dose-resposta sigmoidais de inibição de colágeno em FCh infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil), apresentando um bom Z'prime, $Z' = 0,55$ (Figura 4.20A). Os inibidores alcançaram os seguintes valores de IC₅₀ para a inibição de colágeno: benzonidazol = 31,3 μM , pirfenidona = 114 μM , losmapimod = 17,6 μM e SP600125 = 3,9 μM . O corante Sirius red/Fast green, utilizado em nosso estudo para marcar colágeno e proteínas totais, fornece dados também quanto a toxicidade dos compostos administrados em FCh infectados com *T. cruzi*. Os valores para o CC₅₀ dos inibidores de sinalização foram: benzonidazol = 161 μM , pirfenidona >1000 μM , losmapimod = 85,5 μM e SP600125 = 45,6 μM . Pirfenidona e benzonidazol foram os compostos mais seletivos nessa abordagem. Apesar da baixa seletividade em nosso modelo, ensaios clínicos já demonstraram a segurança de uso de pirfenidona e Losmapimod em pacientes (Figura 4.20B).

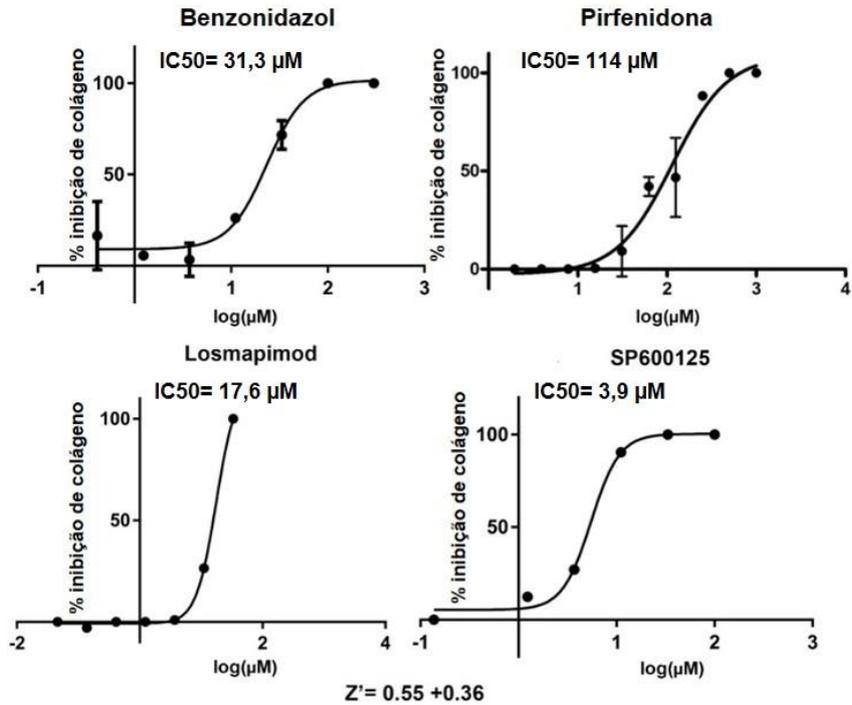
Analizamos também a atividade dos compostos na expressão de colágeno em FCh estimulados com meio condicionado por *T. cruzi* e lisado do parasito, que são capazes de promover um aumento de FN e colágeno na MEC (Figura 4.21 A e B). Realizamos tratamento das culturas com os inibidores em curva de concentração na mesma faixa utilizada anteriormente. Nossos resultados mostraram que apenas o inibidor SP600125 inibiu a expressão de colágeno em FCh estimuladas com meio condicionado do parasito (Figura 4.21A). Também avaliamos FCh estimulados com lisado do parasito e nossos dados revelaram que o tratamento com benzonidazol, (Figura 4.21B) e pirfenidona (Figura 4.21C) inibiram a expressão de colágeno em FCh.

Além de avaliar o efeito do benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125, também investigamos o efeito de diferentes glicosaminoglicanos e seus análogos, na inibição da deposição de colágeno em FCh infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil), uma vez que glicosaminoglicanos e proteoglicanos são importantes no processo de cicatrização e fibrose. No nosso ensaio testamos uma biblioteca de 24

glicosaminoglicanos contendo diferentes GAGs e heparinas de diferentes origens, graus de sulfatação e pesos moleculares. Entre os 24 GAG's testados, 10 apresentaram efeito na inibição de colágeno em culturas de FCh infectados pelo *T. cruzi*, sendo considerados eficazes com a inibição superior a 85% numa concentração de 100 µg/mL de GAG's. Mesmo que diferentes classes de GAG's tenham sido incluídas na biblioteca, derivados de heparina e seus análogos apresentaram um efeito maior na inibição de colágeno em FCh infectados pelo *T. cruzi* (Tabela 4.1).

Inibição de colágeno em FCh infectados pelo *T. cruzi*

A



Toxicidade em FCh tratados com inibidores

B

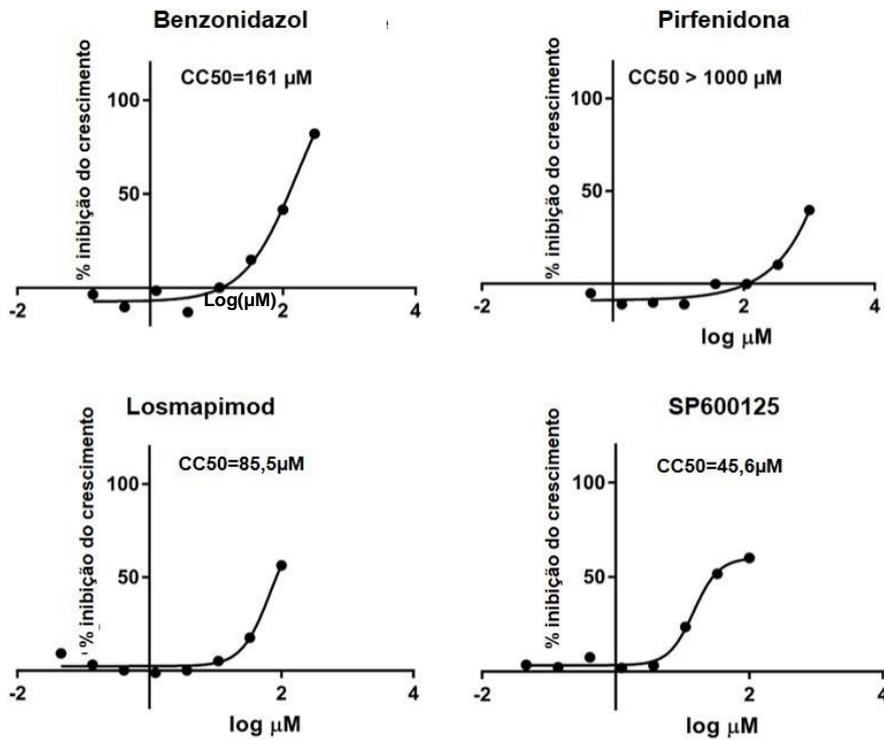


Figura. 4.20 – Inibição de colágeno em FCh infectados pelo *T. cruzi*. FCh = Fibroblastos cardíacos humano. (A) Compostos foram eficazes em reduzir a expressão de colágeno em FCh infectados com *T. cruzi* (cepa Brasil) apresentando um $Z' = 0,55$. (B) A medida de proteínas totais pelo corante Fast green permitiu avaliar a toxicidade de inibidores de sinalização em FCh infectados com *T. cruzi* e o cálculo de CC_{50} para cada composto. $N=3$.

Inibição de colágeno em FCh estimulados com MCP e TCL

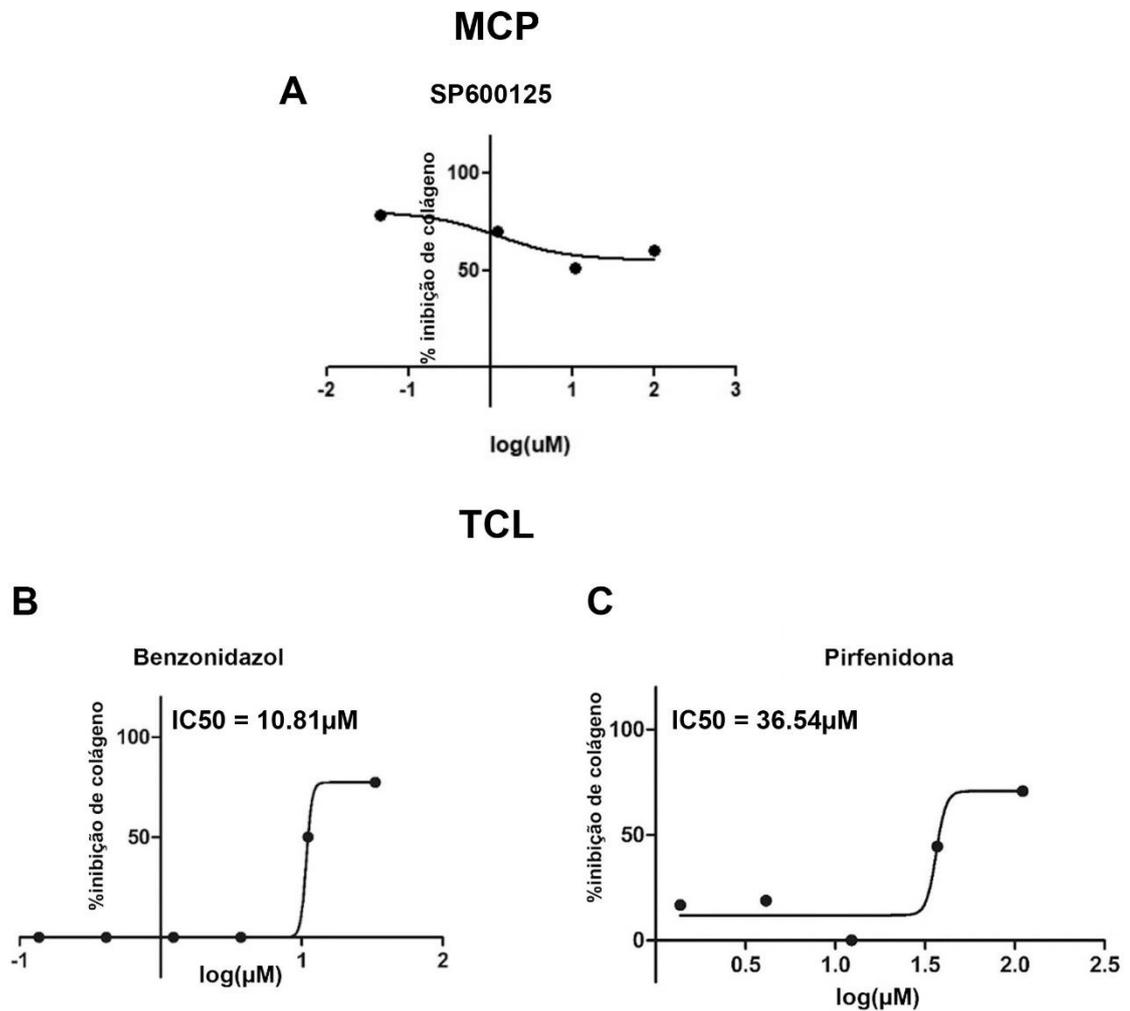


Figura. 4.21 – Inibição de colágeno em FCh estimulados com MCP e TCL. FCh = Fibroblastos cardíacos humano. MCP = Meio condicionado pelo parasito. TCL = Lisado do *T. cruzi*. (A) Em culturas de FCh tratados com benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125, apenas o tratamento com SP600125 inibiu a expressão de colágeno em FCh estimulados com meio condicionado do parasito. (B e C) O tratamento com benzonidazole e pirfenidona em FCh estimulados com lisado do parasito promoveu inibição da expressão de colágeno em FCh. N=3.

Inibição de colágeno em FCh infectados tratados com GAG's

% inibição de colágeno		GAG's (100µg/mL)
GAG09	166.6	Keratan Sulfato
GAG10	87.53	Heparin N-desulfatada
GAG11	98.00	DeS-heparina
GAG18	119.78	Oligos de heparina tamanho dp 10
GAG19	124.41	Oligos de heparina tamanho dp 12
GAG20	159.31	Oligos de heparina tamanho dp 14
GAG21	206.73	Oligos de heparina tamanho dp 16
GAG22	136.01	Oligos de heparina tamanho dp 18
GAG23	107.63	Oligos de heparina tamanho dp 20
GAG25	94.05	Heparina de baixo peso molecular (de mucosa intestinal de porco)

Tabela 4.1 – Ação de glicosaminoglicanos no depósito de colágeno em FCh infectados pelo *T. cruzi*. FCh = Fibroblastos cardíacos humano. GAG's = Glicosaminoglicanos. O tratamento com 24 GAG's em FCh (Heparina e seus análogos) foram eficazes em inibir o depósito de colágeno em FCh infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil). N=2.

4.19 – Ação de diferentes compostos e GAG's na infecção pelo *T. cruzi*.

Para investigar se os compostos e GAG's possuem atividade tripanocida, culturas infectadas com *T. cruzi* (cepa Brazil) foram tratadas com curvas de concentração dos inibidores estudados na mesma faixa utilizada anteriormente e com os 24 GAG's (100µg/mL). Dados revelaram que FCh infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil), tratados com pirfenidona (1000 µM), losmapimod (30 µM) e SP600125 (10 µM) não apresentaram eficácia na infecção pelo *T. cruzi* quando comparados com o tratamento com benzonidazol (100 µM) (Figura 4.22).

Avaliamos a atividade antiparasitária (calculando o % de redução da infecção) e a viabilidade celular em uma curva de concentração variando 0,04 – 100 µM de benzonidazol, 0,45 – 1000 µM de pirfenidona, 0,04 – 100 µM de Losmapimod e 0,04 – 100 µM de SP600125. O tratamento com benzonidazol (Figura 4.23A), pirfenidona (Figura 4.23B), Losmapimod (Figura 4.23C) e SP600125 (Figura 4.23D) em FCh infectados com *T. cruzi* revelou que apenas o benzonidazol, composto de referência no experimento, apresentou uma redução no percentual de infecção em FCh infectados pelo *T. cruzi*. Pirfenidona, losmapimod e SP600125 não apresentaram o mesmo efeito quanto a redução da infecção. O ensaio tripanocida baseado em imagem também permite avaliar a citotoxicidade, e à medida que aumenta a concentração dos inibidores testados, a viabilidade celular é reduzida em níveis proporcionais aos obtidos nos ensaios com corante Sirius Red/Fast green.

Analizamos também a atividade antiparasitária dos 24 GAG's disponíveis em nossa biblioteca. Nossos resultados revelaram que GAG1 (heparina intestinal), GAG12 (heparina 2-dissulfato), GAG21 (Heparina oligo dp16) e GAG25 heparina LMW) promoveram uma redução no número de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* quando comparados com a cultura infectada não tratada (Figura 4.24A). A quantificação da infecção em cultura de FCh tratados com glicosaminoglicanos mostrou redução significativa, alcançando níveis máximos de 77% de inibição quando tratados com GAG1 (heparina intestinal suína) (Figura 4.24B). Entre eles, apenas os GAG21 e GAG25 induzem inibição do estímulo de colágeno pelo parasita, sugerindo que os outros GAGs mostram atividade anti-fibrose por outros mecanismos.

Ação de compostos em FCh infectados pelo *T. cruzi*

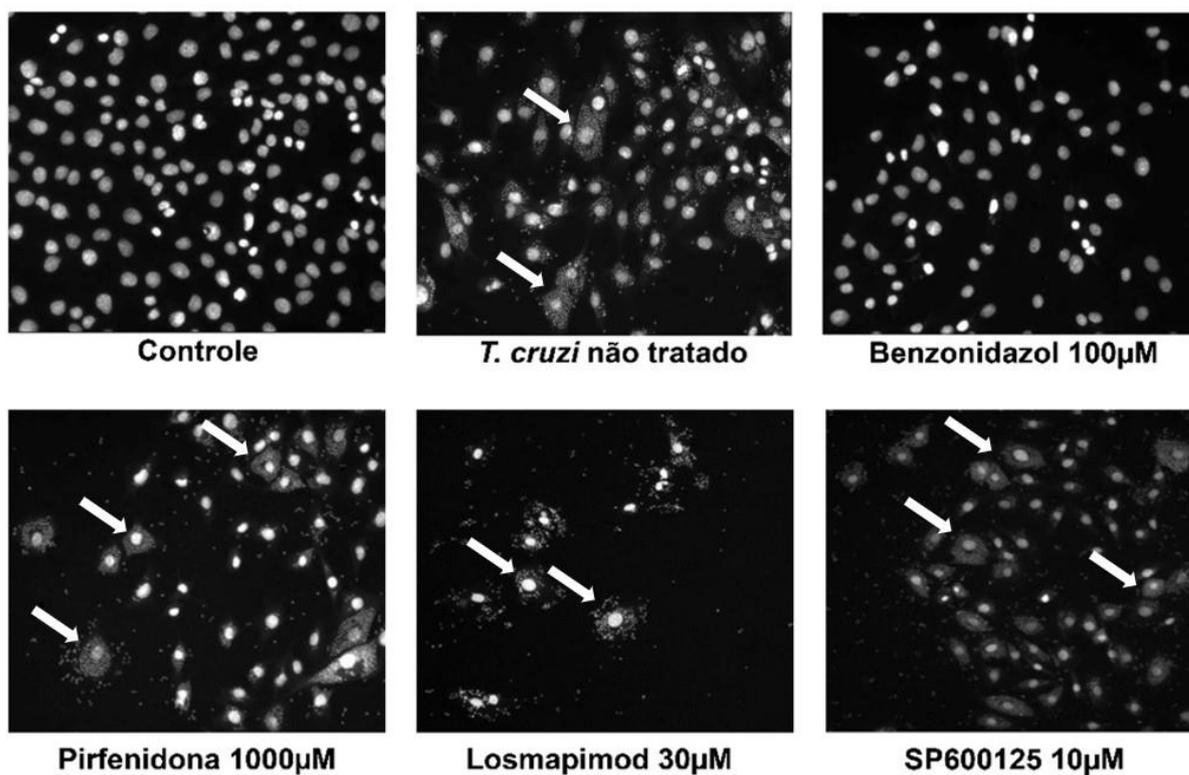


Figura 4.22 – Efeito de diferentes compostos em FCh infectados pelo *T. cruzi*. FCh = Fibroblastos cardíacos humano. Imagens obtidas pelo software ImageXpress em FCh infectados pelo *T. cruzi* (seta) tratados com diferentes concentrações de benzonidazol (100 µM), pirfenidona (1000 µM), losmapimod (30 µM) e SP600125 (10 µM). Pirfenidona, losmapimod e SP600125 não foram eficazes contra a infecção pelo *T. cruzi* quando comparados com a cultura de FCh tratadas com benzonidazol. N=2.

Atividade antiparasitária em FCh infectados pelo *T. cruzi*

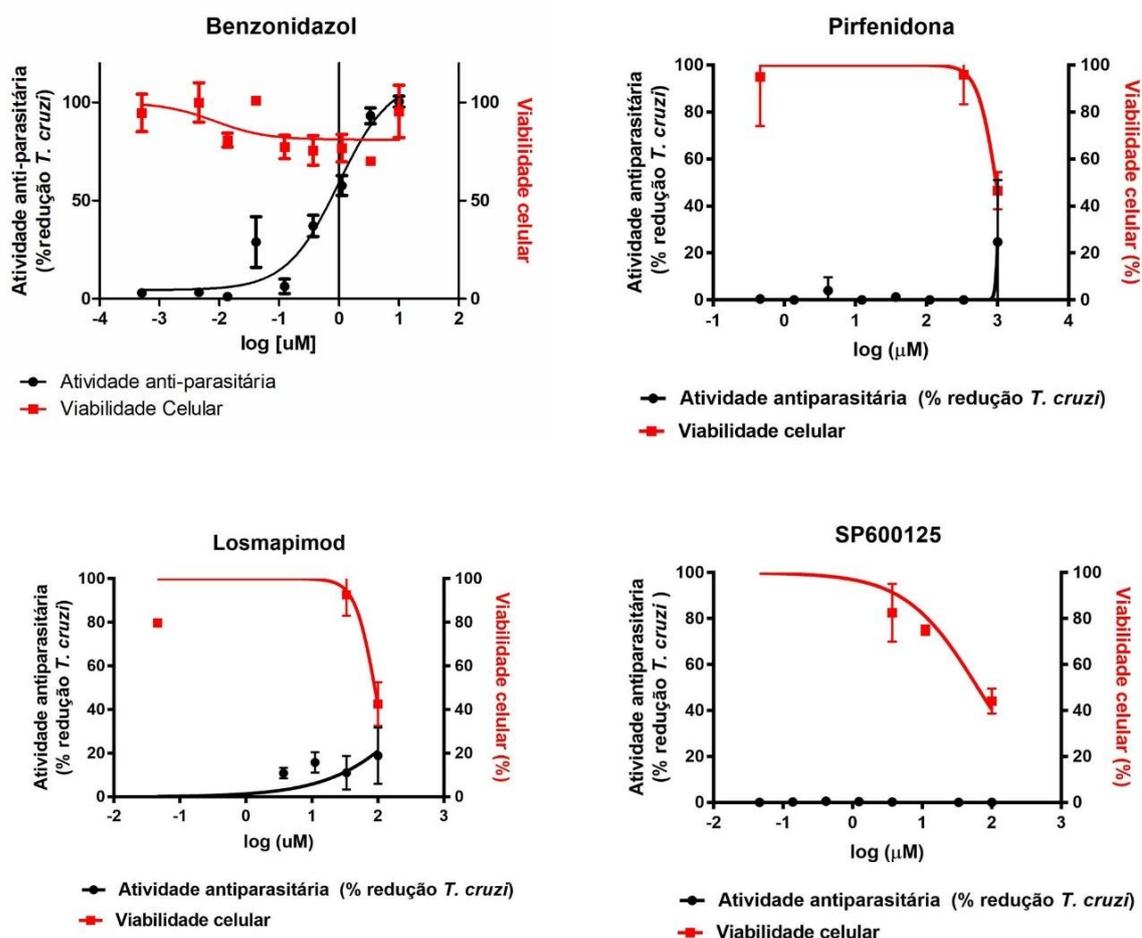


Figura 4.23 – Atividade antiparasitária em FCh infectados pelo *T. cruzi*, tratados com diferentes compostos. FCh = Fibroblastos cardíacos humano. Curvas sigmóides dose resposta de inibição da infecção pelo *T. cruzi* revelaram que apenas o benzonidazol promoveu redução no percentual de infecção pelo *T. cruzi* em FCh. Pirfenidona, losmapimod e SP600125 não apresentaram a mesma eficácia com relação a atividade antiparasitária observada em FCh infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil). N=2.

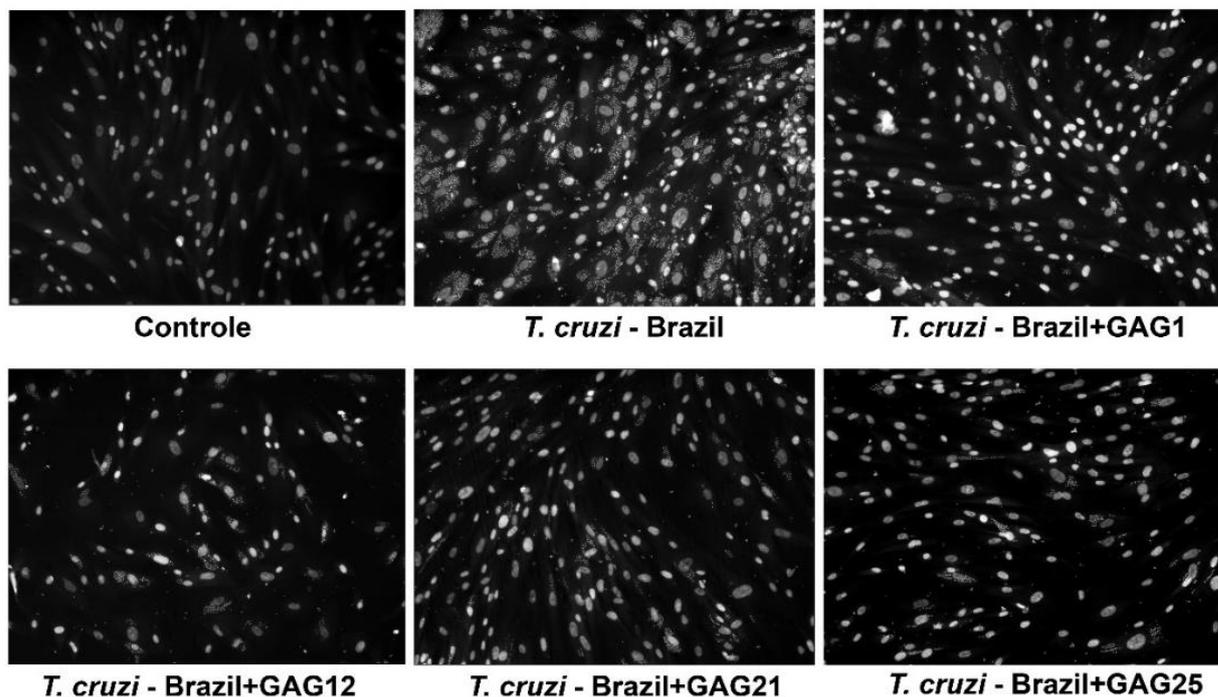
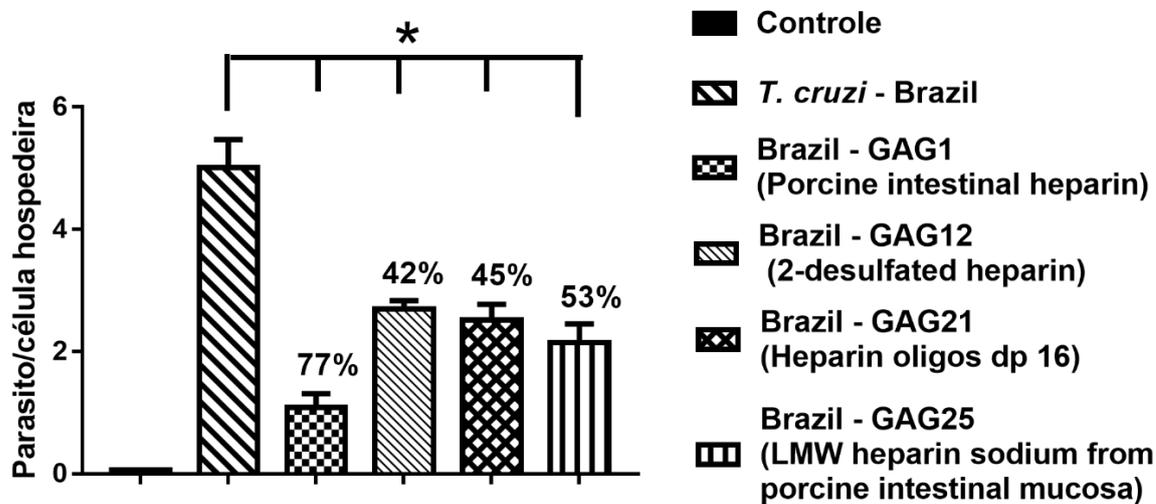
A**Ação de GAG's na infecção pelo *T. cruzi*****B**

Figura. 4.24 – Ação de GAG's na infecção pelo *T. cruzi*. GAG's = Glicosaminoglicanos. (A) Imagens obtidas por ImageXpress revelaram que dos 24 GAG's testados, GAG1, 12, 21 e 25 foram eficazes promovendo uma redução na infecção pelo *T. cruzi* quando comparados com a cultura infectada, não tratada. (B) Dados quantitativos mostraram que GAG1, 12, 21 e 25 levaram a uma redução na infecção pelo *T. cruzi* em FCh, alcançando um percentual de redução máxima de 77% com GAG1. * $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura infectada não tratada. N=2.

4.20 – Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos.

Para investigar se os inibidores de sinalização e GAG's possuem efeito direto na expressão de colágeno, ou se foram influenciados por processos distintos, avaliamos a proliferação de fibroblastos cardíacos humanos infectados diretamente com *T. cruzi*, ou estimulados com meio condicionado do parasito, com lisado de *T. cruzi* ou com soro de camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Em todas as condições, realizamos tratamento com benzonidazol (100 µM), pirfenidona (1000 µM), losmapimod (30 µM) e SP600125 (10 µM) e a proliferação foi avaliada pela incorporação do BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine). FCh infectados com *T. cruzi* (Figura. 4.25A), estimulados com meio condicionado do parasito (Figura. 4.25B), com o lisado do *T. cruzi* (Figura. 4.25C) e com o soro de camundongos infectados com *T. cruzi* (Figura. 4.25D) mostraram aumento na proliferação de FCh. Em todas as condições testadas, o tratamento com benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125 não foi eficaz em inibir a proliferação de FCh infectados ou estimulados.

Além disso, analisamos também o efeito direto dos inibidores em FCh não infectados e não tratados. Benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125 não afetaram a proliferação de FCh não infectados (Figura. 4.25E).

Além de testarmos a proliferação com inibidores de sinalização, testamos a proliferação de FCh infectadas com *T. cruzi* após o tratamento com GAG's. Nossos dados mostraram que todos os 24 GAG's foram eficazes na redução da proliferação de FCh infectados pelo *T. cruzi*. GAG8 (dermatan dissulfato) e GAG17 (Oligossacarídeo de heparina dp8) apresentaram níveis de proliferação similares a cultura controle não tratada (Figura 4.26).

Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos

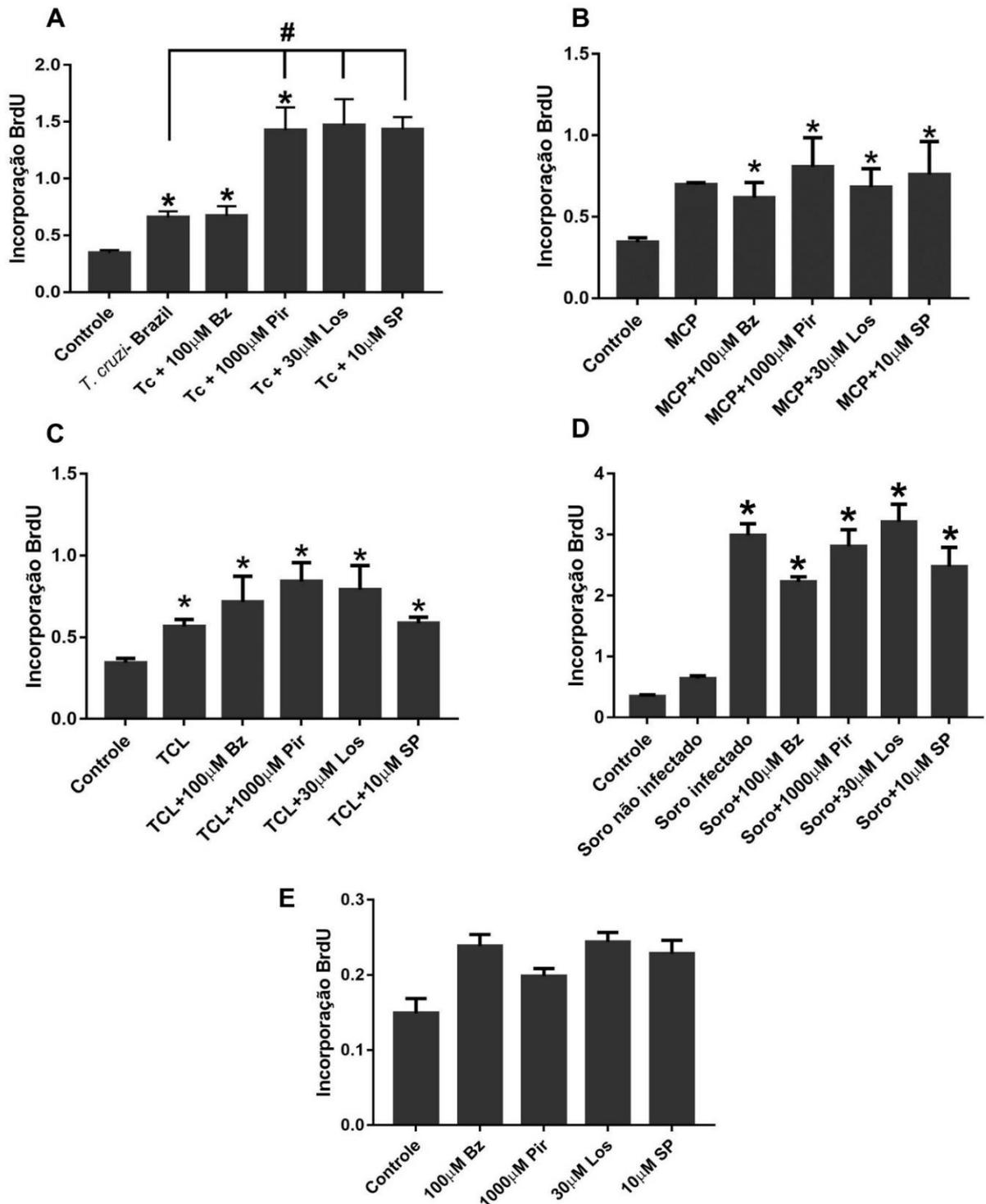


Figura. 4.25 – Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos. Tc = *T. cruzi*. MCP = Meio condicionado do parasito. TCL = Lisado do *T. cruzi*. (A) A proliferação de FCh foi avaliada por incorporação de BrdU em FCh diretamente infectados pelo *T. cruzi*, (B) estimulados com MCP, (C) com o lisado do *T. cruzi* ou (D) com soro de camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Todas as condições testadas promovem o aumento da proliferação de FCh e o tratamento com benzonidazol (100 μ M), pirfenidona (1000 μ M), losmapimod (30 μ M) e SP600125 (10 μ M) não acarretou em uma redução na proliferação de FCh. (E) A ação direta dos inibidores de sinalização em FCh não modulam a proliferação desse tipo celular. * $p \leq 0.05$ quando comparados com a cultura controle. # $p \leq 0.05$ quando comparados com a infectada não estimulada e não tratada. N=2.

Proliferação de fibroblastos cardíacos infectados com *T. cruzi* e tratados com GAG's

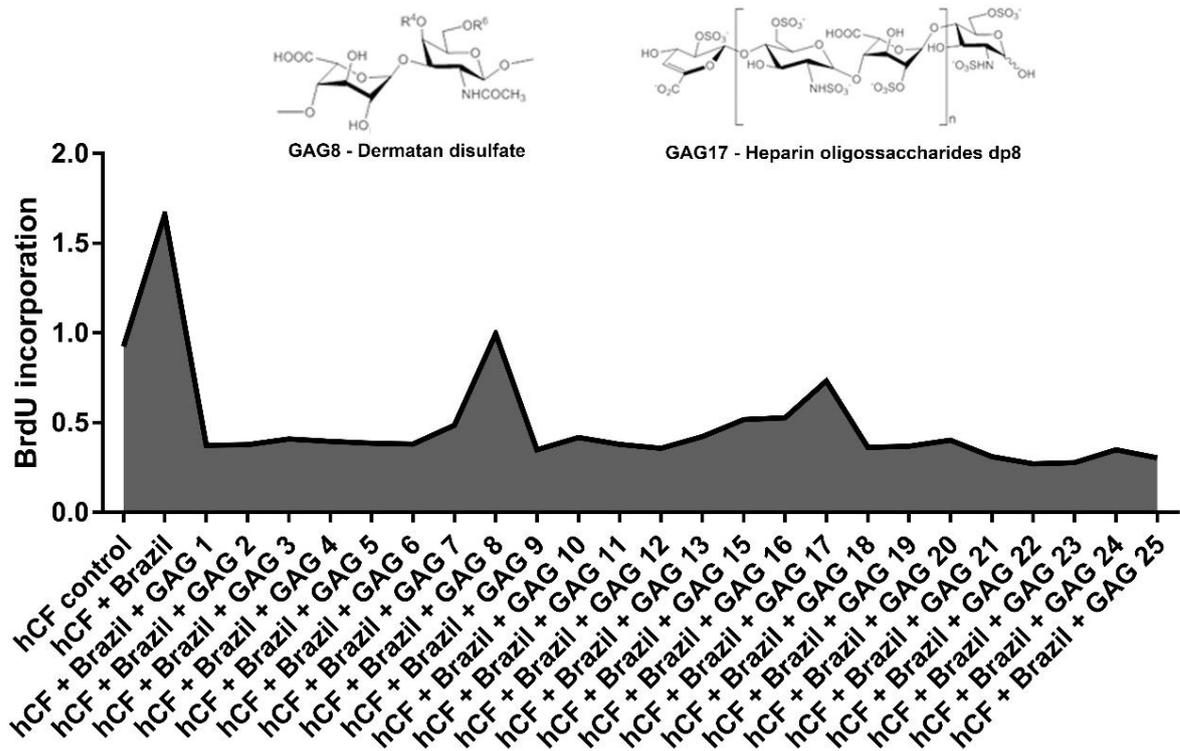


Figura 4.26 – Proliferação de fibroblastos cardíacos humanos tratados com GAG's. GAG's = Glicosaminoglicanos. Todos os 24 GAG's reduziram a proliferação de FCh infectadas por *T. cruzi*, enquanto GAG8 e GAG17 apresentaram níveis de proliferação similares a cultura controle não infectada e não tratada. N=2.

Ensaaios

in vivo

Para avaliar o potencial dos compostos como possíveis candidatos para o tratamento da fibrose cardíaca na doença de Chagas, realizamos ensaios experimentais *in vivo* em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil). Os animais foram tratados com benzonidazol (100 mg/kg), pirfenidona (200 mg/kg), losmapimod (15 mg/kg) e SP600125 (3 mg/kg) em diferentes estágios da doença, no início da fase crônica com 60 dpi, antes da instalação da fibrose, e com 100 dpi, quando a fase crônica está mais avançada e os sintomas proeminentes.

4.21 – Ecocardiograma.

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados diariamente por 28 dias após 60 e 100 dpi com benzonidazol (100 mg/kg), pirfenidona (200 mg/kg), losmapimod (15 mg/kg) administrados via gavagem e SP600125 (3 mg/kg) administrados via intraperitoneal. Foi realizado o ecocardiograma para avaliar hipertrofia em camundongos infectados pelo *T. cruzi* tratados com diferentes compostos. Avaliamos a medida da massa do ventrículo esquerdo com relação a massa corporal (LVM/BW) (Figura 4.27A) e o diâmetro do ventrículo esquerdo com relação a massa corporal (LVDd/BW) (Figura 4.23B). Nossos dados mostram hipertrofia cardíaca estatisticamente significativa em animais infectados em 128 dpi. No entanto, observamos que os compostos administrados em camundongos infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) após 60 e 100 dpi não foram capazes de evitar o estabelecimento do processo de hipertrofia cardíaca (Figura 4.27 A-B).

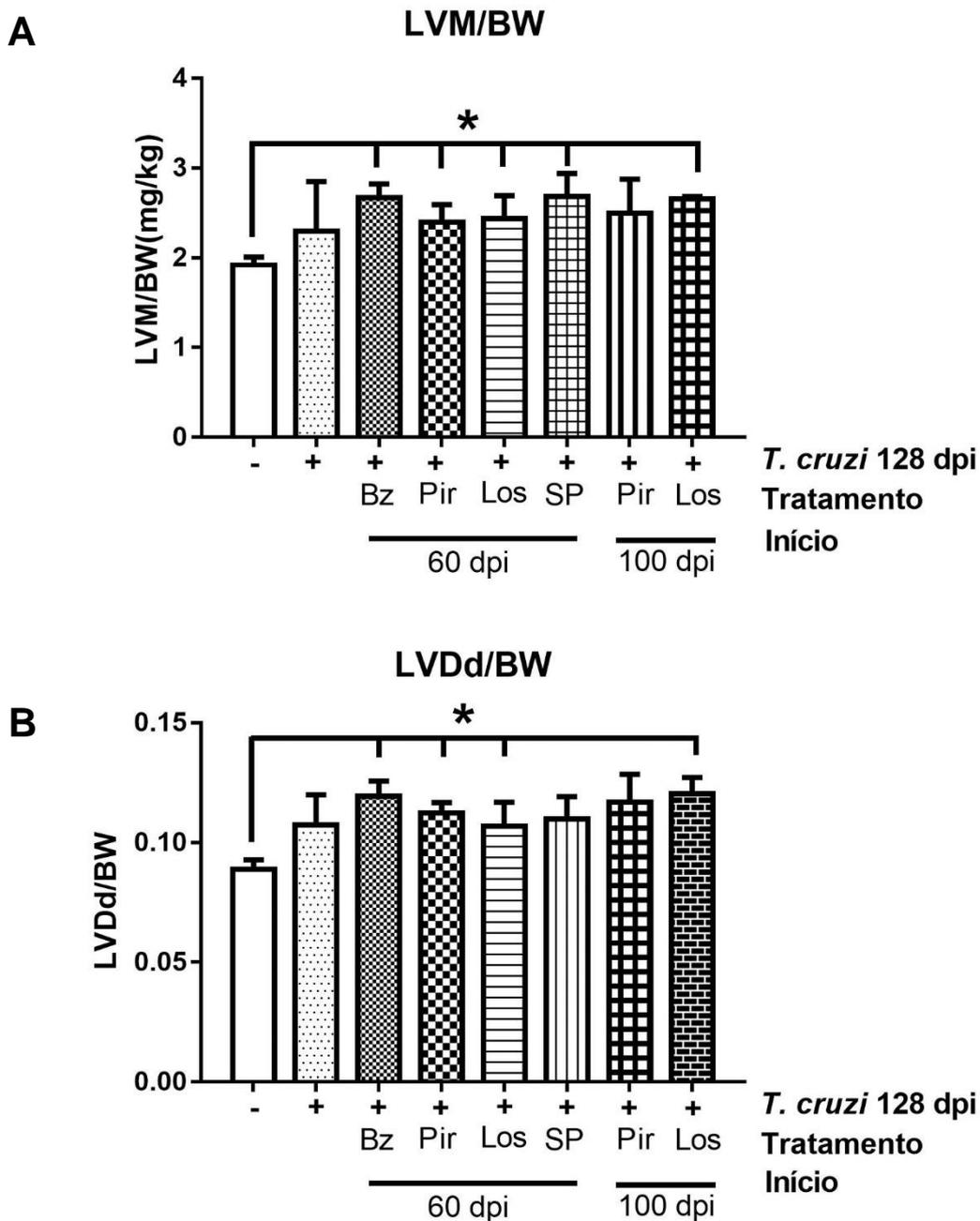


Figura 4.27 – Ecocardiograma em camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi*. Os parâmetros de LVM/BW (sigla em inglês para massa corporal do ventrículo esquerdo com relação a massa corporal) e LVDd/BW (sigla em inglês para diâmetro do ventrículo esquerdo com relação a massa corporal) revelaram hipertrofia em camundongos infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil) após 60 e 100dpi tratados com diferentes compostos. Não houve comprometimento da função cardíaca. Compostos inibidores da via de TGF- β , p38 MAPK e c-Jun não reverteram esse processo. * $p \leq 0.05$ quando comparados com o controle. N=1.

4.22 – Carga parasitária no tecido cardíaco em C57BL/6 infectados com *T. cruzi*.

Após a avaliação por ecocardiograma com 128 dpi, os animais foram eutanasiados e amostras de tecido cardíaco foram utilizadas para detectar a presença do *T. cruzi* por PCR quantitativo. Todos os camundongos foram positivos para presença do DNA para *T.cruzi*, apesar dos baixos níveis de carga parasitária analisada. Os inibidores de sinalização pirfenidona, losmapimod e SP600125, administrados em camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* em diferentes esquemas de tratamento, não resultaram em redução da carga parasitária no tecido cardíaco. Estes dados são similares ao modelo in vitro após o tratamento com inibidores sinalização em FCh infectados com *T. cruzi*. (Figura. 4.28).

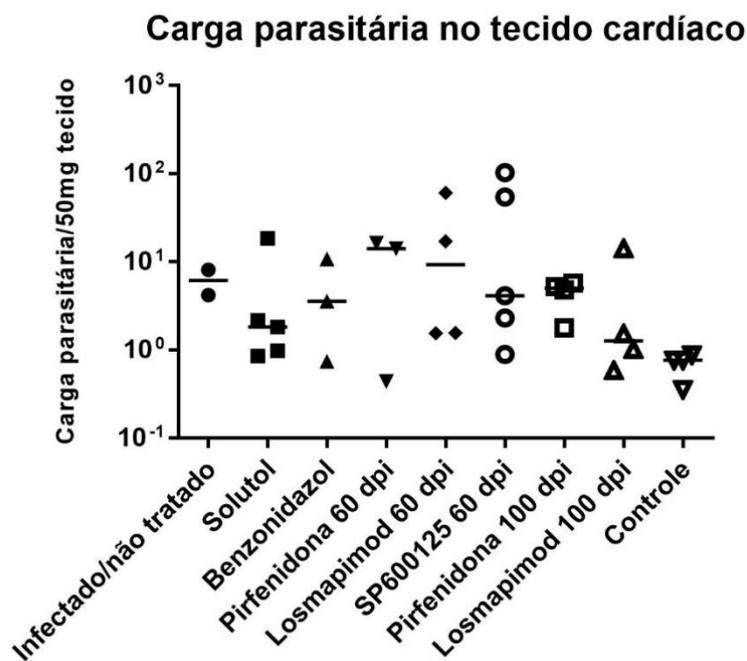
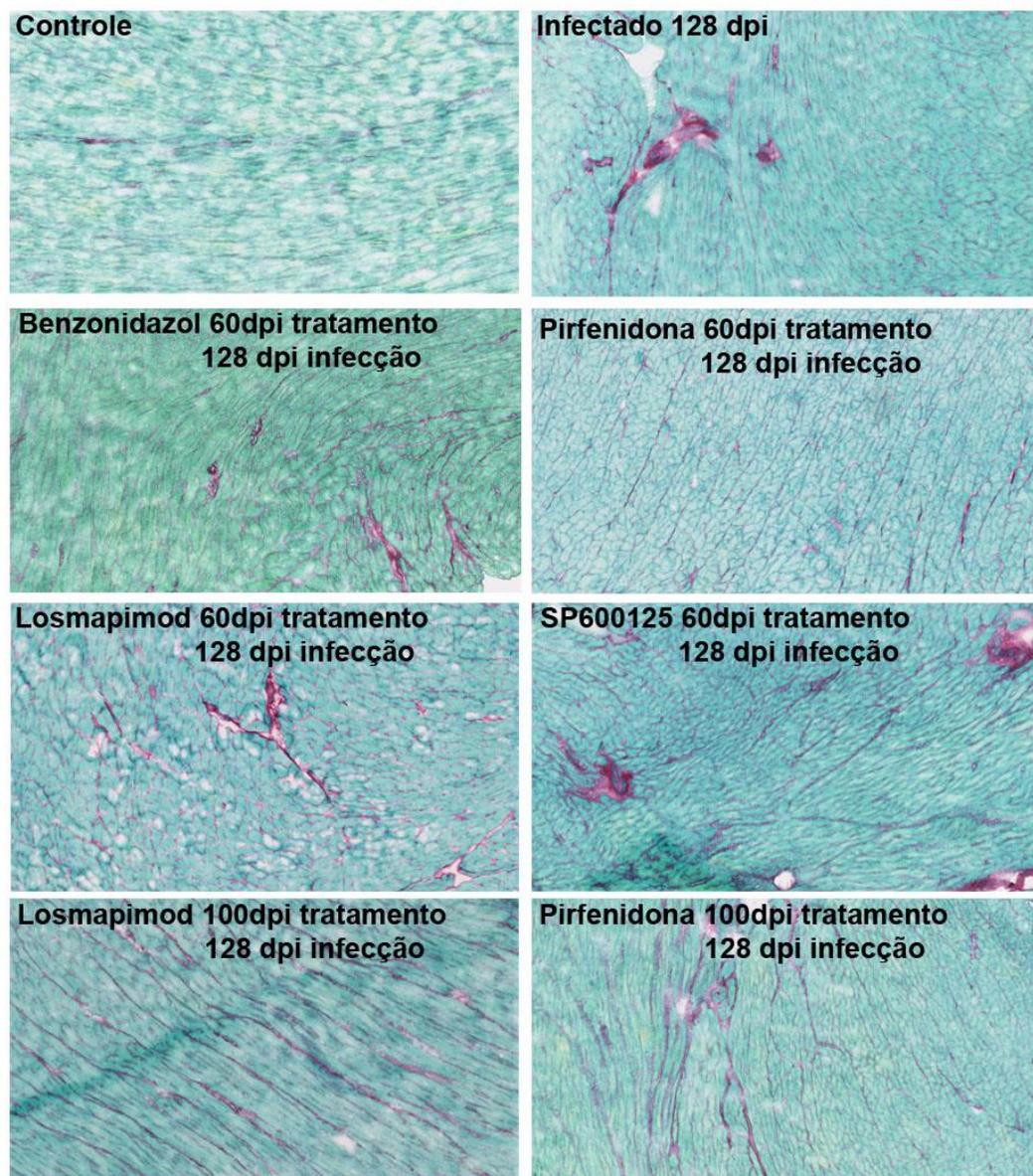


Figura 4.28 – Carga parasitária no tecido cardíaco. A medida da carga parasitária no coração por PCR quantitativo mostrou que apesar dos animais apresentarem reação positiva para o parasita, os níveis de infecção estavam baixos. O tratamento com inibidores sinalização pirfenidona, losmapimod e SP600125 não modulou a infecção no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6. N=1.

4.23 – Depósito de colágeno em tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi*.

Analizamos o desenvolvimento da fibrose no tecido cardíaco em camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* cepa Brazil, avaliando se os compostos utilizados no estudo apresentaram eficácia em reduzir a deposição de colágeno da MEC. Cortes de coração de camundongos tratados após 60 e 100 dpi com benzonidazole (100 mg/kg), pirfenidona (200 mg/kg), losmapimod (15 mg/kg) e SP600125 (3 mg/kg) foram corados com Sirius Red/Fast green. Imagens obtidas após a coloração revelaram que houve aumento na marcação de colágeno intersticial no tecido cardíaco. Após o tratamento com 60 dpi com o inibidor pirfenidona (200 mg/kg) foi observado uma redução na expressão de colágeno no tecido cardíaco. No entanto, o tratamento com benzonidazol (100 mg/kg), losmapimod (15 mg/kg) e SP600125 (3 mg/kg) após 60 e 100 dpi não apresentaram eficácia na modulação da na deposição de colágeno no tecido cardíaco (Figura. 4.29A). Análises de processamento de imagem com software Image J revelaram que o tecido infectado apresentou um aumento significativo na expressão de colágeno quando comparados com tecido controle. O tratamento com benzonidazol, losmapimod e SP600125 com 60 dpi, não foi eficaz quanto a redução da expressão de colágeno total no tecido cardíaco. Em contraste, o tratamento com pirfenidona com 60dpi, promoveu uma redução na expressão de colágeno total na MEC. O tratamento com pirfenidona e losmapimod com 100 dpi não resultou em redução na expressão de colágeno total quando comparados com tecido controle não infectado e não tratado (Figura. 4.29B). Dados quantitativos obtidos por western blot de extratos do tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* da cepa Brazil revelaram que pirfenidona (60dpi) apresentou eficácia na redução de colágeno do tipo I, abundante no tecido cardíaco juntamente com o colágeno do tipo III, corroborando com dados obtidos das imagens histológicas para colágeno total. No entanto, tratamento com outros inibidores em diferentes esquemas não mostrou eficácia quanto a redução de colágeno total no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil) (Figura. 4.30C).

A



B

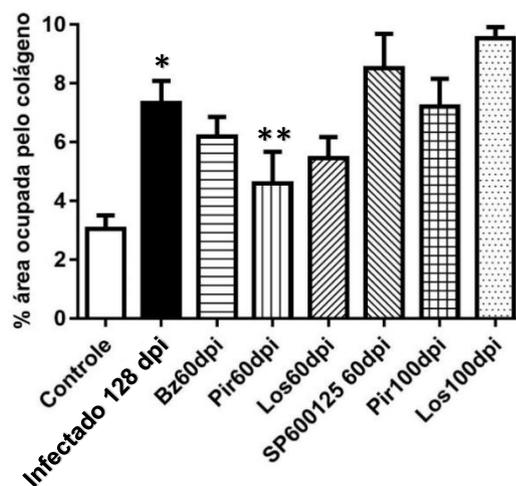
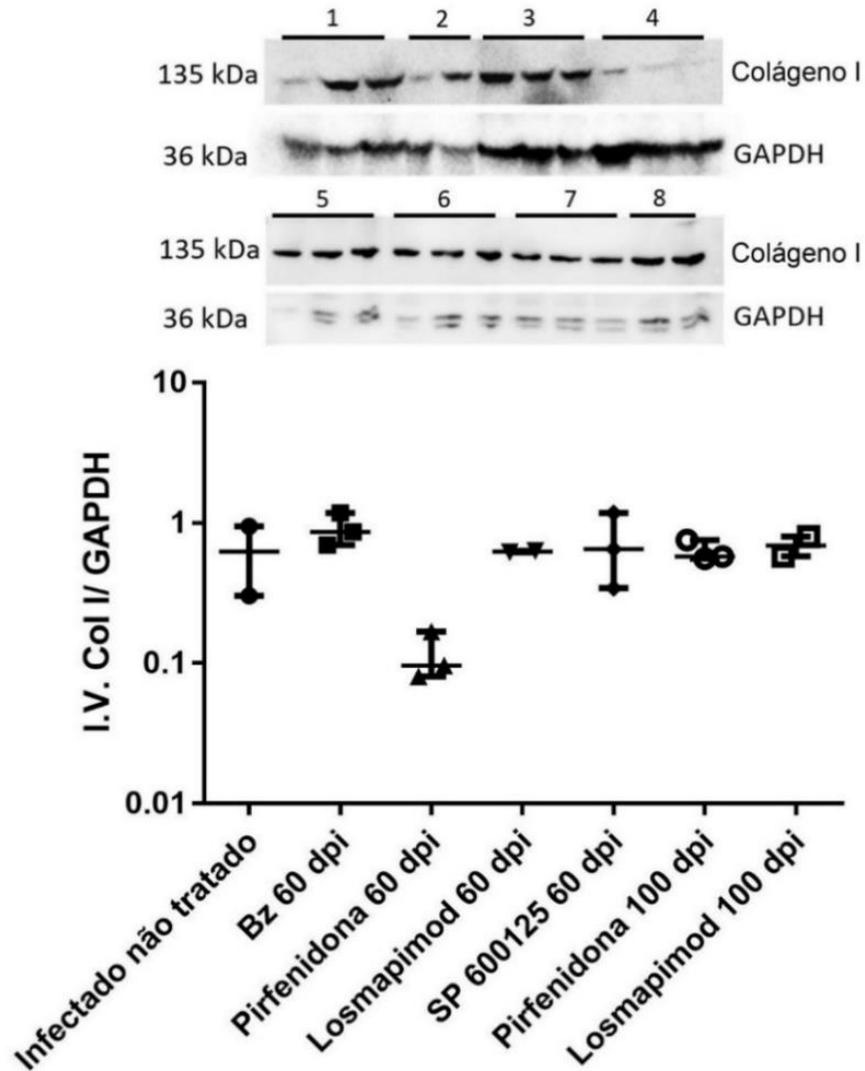


Figura 4.29 – Análise de colágeno no tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*. Tecido cardíaco de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil) foram corados com Sirius red/Fast green para marcação de colágeno (roxo) e proteínas totais (verde). O tratamento com pirfenidona com 60dp reduziu na expressão de colágeno total na MEC. Os outros inibidores não apresentaram eficácia quanto a redução de colágeno total tanto após tratamento com

60 e 100 dpi. (B) Análise de imagens histológicas foram realizadas pelo software Image J para colágeno total e dados revelaram que apenas pirfenidona com 60 dpi apresentou efeito na redução de colágeno total. Os outros inibidores em diferentes esquemas de tratamento não apresentaram a mesma resposta frente a redução de colágeno na MEC. * $p \leq 0,05$ comparado com ao controle não infectado; ** $p \leq 0,05$ comparado ao infectado não tratado. N=1.

**Expressão de colágeno I em
corações de camundongos infectados com
*T. cruzi***



Legenda das bandas de colágeno I:

- | |
|--|
| 1 – Controle |
| 2 – Infectado e não tratado 128 dpi |
| 3 – Benzonidazole 60dpi; 128 dpi infectado |
| 4 – Pirfenidona 60dpi; 128 dpi infectado |
| 5 – Losmapimod 60dpi; 128 dpi infectado |
| 6 – SP600125 60dpi; 128 dpi infectado |
| 7 – Pirfenidona 100dpi; 128 dpi infectado |
| 8 – Losmapimod 100dpi; 128 dpi infectado |

Figura 4.30 – Depósito de colágeno I em corações de camundongos infectados pelo *T. cruzi*
 Dados quantitativos por *western blot* corroboraram dados quantitativos obtidos pelas análises de processamento de imagem em que apenas pirfenidona apresentou um efeito na redução de colágeno na MEC no tecido cardíaco tratado. * $p \leq 0,05$ comparado com ao controle não infectado; ** $p \leq 0,05$ comparado ao infectado não tratado. N=1.

Discussão

5 – DISCUSSÃO

Indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* apresentam uma progressão diferencial da doença de Chagas. Enquanto cerca de 60% dos indivíduos infectados permanecem na forma indeterminada, 30% desenvolvem a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) anos depois após a infecção. Falha cardíaca, tromboembolismo e arritmias estão entre os sintomas mais comuns em pacientes com CCC (Nunes et al., 2018). A CCC é caracterizada pela presença de fibrose focal causado pela persistência do *T. cruzi* no tecido cardíaco.

Nossos dados foram obtidos utilizando modelos in vitro de cultivo celular. Culturas de FC e mioblastos L6E9 estimulados com TGF- β , apresentaram um aumento no depósito de FN na MEC a partir de uma concentração micromolar de TGF- β , em contraste a dados anteriores do grupo com cardiomiócitos, que só foram responsivos a concentrações 10 vezes maiores dessa citocina (Calvet et al., 2009). Além disso, a infecção pelo *T. cruzi* em culturas de FC foi capaz de levar a um aumento no depósito de FN na MEC. Os resultados obtidos com mioblastos L6E9 e fibroblastos estão de acordo com dados da literatura, sendo observado aumento de colágeno e FN em L6E9 a partir de 50 pM de TGF- β (Ignatz RA, 1986, 1987) e em fibroblastos cardíacos após tratamento com 5 ng/mL de TGF- β (AM et al., 2004). A prevalência de fibroblastos no tecido cardíaco (Deb and Ubil, 2014) sugere que esse tipo celular desempenha um papel importante no remodelamento de matriz extracelular através da resposta aos estímulos com TGF- β .

As diferenças observadas em relação à expressão de matriz extracelular entre as linhagens podem potencialmente ser explicadas pela expressão distinta de receptores de TGF- β nestes tipos celulares. A endogлина, um dos receptores de TGF- β do tipo III, é capaz de influenciar algumas respostas celulares frente ao estímulo do TGF- β , sendo altamente expresso no tecido cardíaco e com importância na regulação dos processos fibróticos (Rodríguez-barbero et al., 2006).

Nosso estudo mostrou que culturas de FC e L6E9, infectadas pelo *T. cruzi* e estimuladas com TGF- β , apresentam redução na expressão de fibrilas de FN na MEC. Na cultura infectada, células adjacentes não infectadas, responderam ao estímulo com TGF- β sendo observado um aumento na distribuição espacial de FN na MEC. Essa redução de FN na MEC especificamente na célula infectada pelo *T. cruzi* pode estar associada a vários fatores, como a quebra do citoesqueleto de actina provocados pela infecção, o que impede o ancoramento de FN a integrinas na superfície celular. A infecção pelo *T. cruzi* pode também modular a ativação de SMADs

inibitórias (SMAD 6 e 7), impedindo que ocorra a via de sinalização de SMADs induzida pelo TGF- β e que o seu sinal não seja translocado para o núcleo (Yan et al., 2009). Além disso, camundongos infectados pelo *T. cruzi* apresentaram uma superexpressão nos níveis de TGF- β (Waghabi et al., 2002). A inibição dos receptores T β RI e II com inibidores específicos durante a fase aguda experimental da doença de Chagas, impediu o desenvolvimento do dano cardíaco quando administrados no início (3 dpi) ou no final da fase aguda da doença de Chagas (20 dpi) e conseqüentemente resultou em redução de fibronectina e colágeno na MEC (de Oliveira et al., 2012).

Uma vez que TGF- β modula a síntese e secreção de FN na MEC, nos interessamos em definir quais vias de sinalização entre as vias clássica e alternativa do TGF- β poderiam estar participando do estabelecimento da fibrose no tecido cardíaco. Nossos estudos demonstraram que vias de sinalização SMAD 2 e p38 MAPK fosforilados foram detectados em níveis elevados após o estímulo com TGF- β em FC, MC e mioblastos L6E9. Diante desse evento, dados reportaram que a via de sinalização p38 MAPK no tecido cardíaco, encontra-se ativada após a presença de injúrias, com o desenvolvimento de hipertrofia em cardiomiócitos, e ativação adicional de proteínas importantes para esse processo como MKK3 e MKK6 (Cuenda and Rousseau, 2007). Nossos dados revelaram que a fosforilação de p38 MAPK foi maior em cardiomiócitos do que em culturas de FC, sugerindo que a via p38 MAPK pode estar modulando na hipertrofia celular ao invés da fibrose em cardiomiócitos (Kojonazarov et al., 2017). A superexpressão específica de proteínas MKK3 e MKK6, no coração de camundongos, estão associadas com a resposta hipertrófica de cardiomiócitos e a presença de uma fibrose intersticial cardíaca acentuada, com o afinamento da parede ventricular, com a disfunção ventricular e com a expressão de genes característicos do processo de insuficiência cardíaca. A ação do inibidor da via de p38 MAPK, o PH797804 em camundongos, promoveu uma melhora na função e na redução da fibrose cardíaca (Kojonazarov et al., 2017; Liang and Molkentin, 2003; Yokota, Tomohiro and Wang, 2016).

Além de avaliarmos a detecção de vias de sinalização SMAD e da família MAPK, como p38 MAPK e c-Jun em culturas não infectadas de cardiomiócitos, fibroblastos cardíacos e mioblastos esqueléticos L6E9, analisamos também o perfil dessas vias de sinalização em culturas de FC infectadas pelo *T. cruzi* e estimulados com TGF- β , uma vez que fibroblastos cardíacos são células responsáveis pela síntese de proteínas na MEC. Nossos dados mostraram que os níveis de PS2 foram aumentados em culturas de FC infectadas com *T. cruzi* após a adição de TGF- β (10

ng/mL) quando comparados com culturas controle não infectada. Foi demonstrado que a infecção pelo *T. cruzi* previne significativamente o estímulo do TGF- β na localização do PS2 em núcleos de FC. A presença do parasito intracelular em culturas de FC parece estar modulando a via de sinalização clássica e impedindo a transdução de sinal para o núcleo. Estudos em culturas de cardiomiócitos mostraram que o *T. cruzi* capta o TGF- β endógeno para multiplicação e desenvolvimento na célula hospedeira, utilizando-o para seu ciclo biológico (Waghabi et al., 2005). Nossos dados revelaram que a infecção pelo *T. cruzi* com a presença endógena do TGF- β , foi suficiente para desencadear um aumento na expressão de FN na matriz extracelular parácrinamente em células adjacentes não infectadas pelo *T. cruzi*. O tratamento com o inibidor específico do receptor T β RI/ALK5, reduziu a expressão de FN na matriz extracelular.

Aumento da fosforilação da via p38 MAPK foi evidenciado em culturas de FC após a infecção pelo *T. cruzi* por 72 h e o estímulo com TGF- β por 1 h. Em culturas de macrófagos infectados pelo *T. cruzi*, a adição exógena da cruzipaina, a cisteína protease mais abundante do *T. cruzi*, e o inibidor da via JNK, SP600125, induz o disparo e amplificação do sinal p38MAPK nesse tipo celular, favorecendo a sobrevivência e a proliferação do parasito em macrófagos (Stempin et al., 2008). Em outros modelos de cardiomiopatia, a p38 MAPK também demonstrou ser uma via crítica para a fibrose, uma vez que o *knockout* para o gene p38 α , Map14k, em fibroblastos cardíacos bloqueou a diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos levando a uma redução da fibrose cardíaca (Molkentin et al., 2017) . Assim, nossas evidências sugerem que a fosforilação da p38 MAPK pode modular a deposição de proteínas da MEC em FC infectados pelo *T. cruzi*, tendo potencial para ser alvo candidato para a intervenção contra a fibrose cardíaca na doença de Chagas.

Para investigar se o aumento de FN em culturas de FC infectados pelo *T. cruzi* foi causado pela proliferação de FC estimulada pelo parasito, foi avaliado a incorporação de BrdU em culturas de FC infectadas com *T. cruzi* estimuladas com diferentes concentrações de TGF- β . Nossos resultados mostraram que a infecção pelo *T. cruzi* e o TGF- β promoveram a proliferação de fibroblastos cardíacos, com resposta ao TGF- β observada de forma dose-dependente, um efeito consistente com o desenvolvimento de fibrose no miocárdio na doença de Chagas. Evidências mostraram que moléculas derivadas do *T. cruzi* ativam a proliferação de fibroblastos. Dados relataram que o meio condicionado de culturas infectadas pelo *T. cruzi* e extratos de amastigotas, estimularam a incorporação de timidina [3H] em fibroblastos

dérmicos humanos, embora os autores não tenham sido capazes de identificar qual molécula do parasito foi responsável por esse processo (Wyller DJ, Libby P, Prakash S, Prioli RP, 1987). Dados reportaram que a calreticulina recombinante de *T. cruzi* (TcCRT) induz a migração de fibroblastos em ensaios de scratch plate e aumenta a proliferação de fibroblastos dérmicos humanos em três ordens de grandeza mais eficientemente do que a calreticulina humana recombinante (Arias et al., 2015). Assim, o *T. cruzi* pode potencialmente modular a proliferação de fibroblastos cardíacos diretamente pela infecção ou por efeito parácrino de células infectadas sobre células não infectadas, ou através dos antígenos remanescentes de parasitos mortos no tecido cardíaco de pacientes portadores da doença de Chagas (Reis et al., 1997), possivelmente atuando via calreticulina de *T. cruzi*. A proliferação de fibroblastos cardíacos pode ser alvo para tratamento da doença, uma vez que a tetrandrina, um composto utilizado para tratamento de câncer, pode inibir a proliferação de fibroblastos cardíacos induzida pelo TGF- β (Q et al., 2018) e podendo ser um candidato promissor para o tratamento de fibrose cardíaca na doença de Chagas.

Na doença de Chagas, ainda na fase aguda da doença, a presença da parasita no tecido cardíaco é atenuada pela resposta imune, porém a infecção ainda persiste na fase crônica em uma baixa intensidade. Devido a essa persistência, pacientes que desenvolvem cardiomiopatia chagásica crônica exibem uma resposta imunológica exarcebada do tipo Th1, com uma miocardite difusa, com um aumento exarcebado no número de células T CD8+ produtoras de TNF- α e IFN- γ , sendo encontrados em níveis elevados no plasma de pacientes infectados pelo *T. cruzi*. Esses fatores podem estar associados com o desenvolvimento de danos nas fibras cardíacas e conseqüentemente com o desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas (Cunha-Neto and Chevillard, 2014).

Nosso estudo mostrou que culturas não infectadas de FC estimulados com TNF- α e IFN- γ apresentaram aumento na expressão de FN e colágeno em todas as concentrações analisadas. Uma vez que na fase crônica há uma redução da carga parasitária no tecido cardíaco, o aumento de TNF- α e IFN- γ podem estar participando na síntese e deposição de componentes de MEC em FC. Nossos resultados estão em concordância com dados já publicados uma vez que o TNF- α estimula o aumento na deposição de colágeno no quadro de fibrose atrial e ventricular, contribuindo para o remodelamento adverso no ventrículo esquerdo, conduzindo a uma disfunção ventricular devido a uma intensa deposição de componentes de MEC (Liew et al., 2013; Sun et al., 2007). O IFN- γ também possui importância na deposição de

componentes de matriz extracelular. A liberação de IFN- γ produzidos pelas células T, estimula em macrófagos a expressão da proteína MCP-1, importante para o recrutamento de macrófagos, leucócitos, aumento da inflamação e por fim, com o desenvolvimento da fibrose cardíaca (Han et al., 2012).

Além de avaliarmos a expressão de FN e colágeno em FC não infectados estimulados com TNF- α e IFN- γ , analisamos também a expressão dessas proteínas em FC infectados pelo *T. cruzi*. A infecção pelo parasito induziu o aumento no depósito de FN e colágeno na MEC. O estímulo com TNF- α e IFN- γ em FC infectados pelo *T. cruzi*, promoveu uma redução no depósito de FN e um aumento de colágeno na MEC. Esses dados podem ser explicados uma vez que o estímulo com TNF- α em FC infectados pelo *T. cruzi* induz inicialmente a diferenciação celular de fibroblastos para miofibroblastos e a proliferação celular (Coelho et al., 2018).

Observamos aumento de FN e colágeno na MEC em FC estimulados com TNF- α e IFN- γ , similar a modelos de cães infectados pelo *T. cruzi*, que apresentam alta produção de IFN- γ e TNF- α e redução de IL-10, desenvolvendo cardiomiopatia com a presença de células inflamatórias e fibrose focal (Guedes et al., 2009). Ainda, dados *in vivo* revelaram que camundongos infectados pelo *T. cruzi* (cepa Colombiana), apresentaram uma progressão na deposição de colágeno no ventrículo direito e esquerdo. A infecção pelo *T. cruzi*, por sua vez, proporciona em uma intensa deposição de colágeno no ventrículo esquerdo, associados a presença de infiltrado inflamatório com elevados níveis de TNF- α e TGF- β no plasma de camundongos infectados (Cruz et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que em pacientes com a doença de Crohn's, a fibrose intestinal está intimamente associada com o aumento de TNF- α após a interação de miofibroblastos via receptor TNFR2, resultando em aumento na produção de colágeno na MEC. Nesses pacientes, TNF- α , juntamente com o fator de crescimento de insulina (IGF-I), potencialmente contribuem para o desenvolvimento da fibrose no intestino (Theiss et al., 2005). Essas citocinas, portanto, são importantes para a gênese da fibrose cardíaca na doença de Chagas.

Além do TNF- α apresentar uma importância no desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas, estudos relataram o envolvimento do IFN- γ no desenvolvimento da falha cardíaca. No tecido cardíaco, o desenvolvimento da hipertrofia e fibrose, através da intensa deposição de colágeno, estão associados com a elevada produção de IFN- γ (Scott P Levick and Goldspink, 2014). A presença do parasito no tecido cardíaco aciona a resposta imune do hospedeiro. Citocinas como o IFN- γ , são secretados por células T (Th1) inflamatórias, em que pode estar associada

com o desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas. Esses dados estão de acordo com nosso estudo em que a adição exógena de IFN- γ promove um efeito parácrino em FC, sendo observado um aumento na síntese e deposição de colágeno na MEC. Em modelos *in vivo* em corações de camundongos nocautes para IFN- γ , foi observado uma redução de células positivas para α -SMA⁺ (marcador específico para miofibroblastos), sugerindo uma redução na diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos (Scott P Levick and Goldspink, 2014).

Nosso estudo revelou que TNF- α e IFN- γ promovem um efeito regulatório na produção de componentes de MEC. No entanto, as vias de sinalização que medeiam a resposta de expressão de componentes de MEC ainda não estão completamente elucidadas. No nosso estudo, avaliamos se as proteínas da família MAPK participam do processo de síntese e deposição de MEC. Nossos resultados obtidos em fibroblastos cardíacos infectados com *T. cruzi* da cepa Y revelaram um aumento na fosforilação de p38 MAPK e c-Jun. O estímulo com TNF- α e IFN- γ em FC não infectadas e infectadas pelo *T. cruzi*, resultou em aumento na fosforilação de p38 MAPK e c-Jun. O TNF- α e o IFN- γ ao interagir com seus receptores específicos em culturas de FC não infectados e infectados pelo *T. cruzi*, disparam vias de sinalização MAPK como p38 e c-Jun, a qual podem contribuir no remodelamento no tecido cardíaco. Estes dados estão de acordo com estudos *in vivo* que mostraram que a ativação de p38 MAPK por si só não é capaz de promover a hipertrofia em cardiomiócitos (Yibin, 2007) porém essa via pode vir a participar do remodelamento tecidual com a síntese e deposição de proteínas de MEC, além de reduzir a função contrátil do coração (Arabacilar and Marber, 2015). A superexpressão de MKK3 ou MKK6 (importantes para fosforilação de p38 MAPK) no coração aumenta a fibrose intersticial com o espessamento da parede ventricular e a morte prematura com a progressão da falha cardíaca (Arabacilar and Marber, 2015; Kojonazarov et al., 2017). Além disso, a inibição endógena de p38 MAPK com o inibidor PD169316, proporciona efeito cardioprotetor e sua ativação no miocárdio conduz a uma restritiva cardiomiopatia, com uma quantidade exarcebada de fibrose intersticial. (Rose et al., 2010). Microarranjos de DNA de animais que apresentavam alterações cardíacas com o aumento de p38 MAPK revelaram que os genes relacionados à inflamação e fibrose estavam altamente regulados.

Além da via de p38 MAPK ser importante no processo fibrótico, nosso estudo também abordou a participação da via de JNK em FC não infectados e infectados pelo *T. cruzi* no processo fibrótico. O estímulo com TNF- α e IFN- γ em FC não infectados e

infectados promoveu a fosforilação da via de JNK. Nossos dados são consistentes com dados da literatura onde a fosforilação da via de JNK apresenta um importante papel no desenvolvimento de cardiomiopatias. Como observamos no nosso estudo um aumento na fosforilação da via de JNK em FC não infectados e infectados pelo *T. cruzi*, juntamente com o aumento na deposição de fibronectina e colágeno, estudos *in vivo* em modelos de animais revelaram que a via de JNK não participa do processo cardíaco hipertrófico, mas participa no remodelamento tecidual com o desenvolvimento de uma cardiomiopatia letal restritiva (Cui et al., 2007; Sabapathy, 2012). Dados reportam que a via de JNK aciona a síntese de fibronectina, não de colágeno. O remodelamento tecidual proporciona a fosforilação da proteína JNK, a qual aumenta a espessura da parede do miocárdio com a deposição de proteínas de MEC (Kumar et al., 2015; Sabapathy, 2012; Wu et al., 2011). Análises histológicas e ecocardiográficas demonstraram que o tratamento do coração de camundongos tratados com inibidores da via de JNK, impediu a dilatação do ventrículo esquerdo, a redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e uma redução na fibrose no miocárdio (Wu et al., 2011). O aumento sérico de TNF- α e IFN- γ encontrados em pacientes infectados pelo *T. cruzi*, portanto, são citocinas importantes para o desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas.

Nosso estudo também avaliou a participação de TNF- α e IFN- γ na proliferação de FC não infectadas e infectadas pelo *T. cruzi*, mostrando aumento na proliferação de FC. Fibroblastos cardíacos atuam como sensor de injúrias no tecido através de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Esses DAMPs são importantes para a proliferação de FC, migração, diferenciação e produção de mediadores fibróticos. (Turner, 2016). Além de TNF- α e IFN- γ , outros autores mostraram que níveis elevados de interleucina-18 (IL-18) *in vitro* também estimulam a proliferação de fibroblastos cardíacos (Fix et al., 2011). Estudos também relatam que a ativação de p38 MAPK induz a síntese e secreção de citocinas como TNF- α e IFN- γ . O efeito autócrino e parácrino de TNF- α e IFN- γ levam ao recrutamento e proliferação de fibroblastos cardíacos no tecido, importantes para o processo de deposição de proteínas na MEC e conseqüentemente com o desenvolvimento da fibrose cardíaca (Rose et al., 2010).

Outra abordagem no nosso estudo foi avaliar mecanismos que propiciam o desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas, através da triagem de compostos com potencial anti-fibrótico utilizando fibroblastos cardíacos humanos. Atualmente, os tratamentos fornecidos para pacientes de doença de Chagas são

compostos tripanocidas e não possuem atividades anti-fibróticas (Duschak, 2016). Como não há um tratamento específico CCC, o tratamento realizado nesses pacientes é semelhante de indivíduos que desenvolvem cardiomiopatias causados por outras etiologias, com o uso de diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima de conversão da angiotensina e espironolactona (Botoni et al., 2007).

Nosso estudo avaliou o potencial anti-fibrótico de compostos que atuam em vias de sinalização que podem ter papel na redução na fibrose cardíaca na CCC. Ensaios *in vitro* foram realizados em FCh não infectados e infectados pelo *T. cruzi* ou estimulados com meio condicionado pelo parasito, lisado do parasito e soro de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, tratados com benzonidazol, pifenidona (inibidor da via de TGF- β), losmapimod (inibidor de p-38 MAPk) e SP600125 (inibidor de c-jun).

Nosso estudo avaliou inicialmente a deposição de fibronectina e colágeno em FCh estimulados com meio condicionado pelo parasito, com lisado de *T. cruzi* ou infectados por este patógeno. Todas as condições testadas foram capazes de induzir a produção de colágeno em FCh. Outros autores mostraram que antígenos secretados pelo parasito pertencentes à família de transialidases induzem um aumento na expressão de fibronectina, colágeno I e laminina em fibroblastos da linhagem L929 (Pinho et al., 2002), revelando a importância dessas moléculas secretadas pelo parasito na síntese e no depósito de FN e colágeno na MEC. Além de induzir a síntese e o depósito de componentes de MEC, antígenos do parasito também promovem a secreção de citocinas inflamatórias como IL-10 e TNF- α pelas células B. Essas citocinas são importantes nos processos imunomodulatórios acionados pelo *T. cruzi*. (Nogueira et al., 2015). Ainda, tripomastigotas provindos de cultura de célula, formas metacíclicas e epimastigotas do *T. cruzi*, foram capazes de induzir a liberação de microvesículas de células HTP-1. A liberação de microvesículas através da interação parasito-célula hospedeira, foram capazes de induzir um aumento significativo na porcentagem de células Vero infectadas pelo *T. cruzi* (Ramirez et al., 2017). Os antígenos presentes em microvesículas secretadas pelo parasito, ou mesmo antígenos remanescentes da lise do *T. cruzi* que permanecem no interstício cardíaco (Moraes et al., 2004), podem modular na síntese e depósito de componentes de MEC em FCh, sendo portanto, importantes no desenvolvimento da fibrose cardíaca na fase crônica da doença de Chagas.

Pacientes com CCC apresentam uma redução na parasitemia, na carga parasitária tecidual e uma extensiva e reparativa fibrose no miocárdio. Atualmente o

benzonidazol (que possui ação tripanocida) é o único fármaco utilizado para o tratamento de pacientes infectados pelo *T. cruzi* (Morillo et al., 2017). Esse composto é eficaz apenas na fase aguda da doença, levando a uma redução na carga parasitária em 80% nos casos reportados. Porém, não existe um composto que seja eficaz para indivíduos que desenvolvem CCC. O projeto BENEFIT foi designado para avaliar a eficácia e a segurança em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica tratados com o benzonidazol. No entanto, o projeto BENEFIT revelou que o tratamento com benzonidazol na fase crônica da doença não resulta em melhora clínica em pacientes com CCC (Pecoul et al., 2016; Rassi et al., 2017). Na busca de possíveis alvos candidatos para o tratamento contra a fibrose cardíaca na doença de Chagas, ensaios experimentais mostraram que tratamento com o inibidor GW788388 (um inibidor seletivo de T β R1/ALK5) em camundongos infectados pelo *T. cruzi* promoveu uma redução nos níveis de TGF- β circulante, na fosforilação de SMAD 2/3, e na diminuição da deposição de proteínas na MEC no coração. A ação desse composto levou a uma melhoria na função cardíaca com o aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Ainda, o inibidor GW788388 regulou também a expressão de MMP's e TIMP's, que são essenciais na regulação de componentes de MEC, sendo estes fatores importantes para impedir a progressão da fibrose cardíaca e sua reversão na doença de Chagas (Ferreira et al., 2019).

Assim como o TGF- β apresenta uma importância na gênese da fibrose cardíaca, nossos dados revelaram que o estímulo do TNF- α e IFN- γ em FC propicia uma regulação no depósito de componentes de MEC, disparando vias de sinalização da família MAPK (proteínas p38 e JNK) e promovendo proliferação em FC. Dados in vivo reforçam a importância dessas citocinas na fibrose cardíaca, já que camundongos C57BL/6 cronicamente infectados pelo *T. cruzi* da cepa Colombiana, apresentam níveis elevados de TNF- α no soro. A neutralização do TNF- α com o anticorpo infliximab promoveu melhorias no ECG, no dano cardíaco causado pela infecção e uma redução no depósito de FN na MEC. O conjunto desses dados reforçam a importância do TNF- α no desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas (Pereira et al., 2014).

Tendo em vista que observamos ativação das vias de sinalização acionadas por TGF- β (SMAD's), TNF- α e IFN- γ (proteínas p38 MAPK e JNK, em nosso estudo, avaliamos a atividade dos compostos pirfenidona, losmapimod e SP600125 (Figura 5.1).

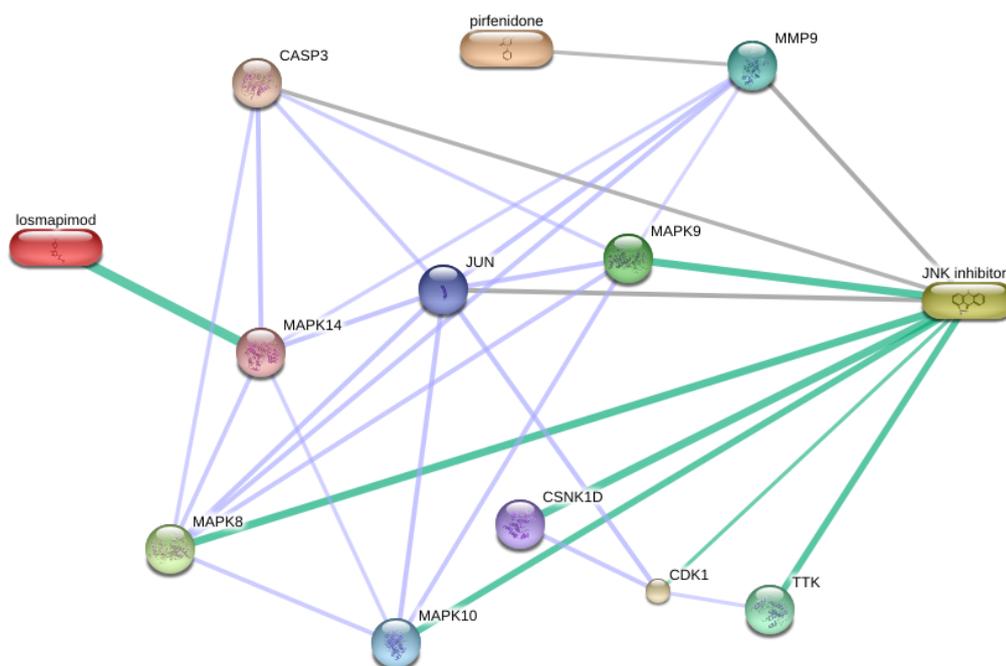


Figura 5.1 – Rede de compostos: pirfenidona, losmapimod e SP600125. Afinidade de ligação com proteínas da família MAPK. Fonte: <http://stitch.embl.de/> - acessado em 21-07-2019.

A pirfenidona é um inibidor sintético que apresenta propriedades anti-inflamatórias e anti-fibróticas *in vitro* e *in vivo* (Hall et al., 2018). Esse inibidor é utilizado comercialmente em pacientes que desenvolvem fibrose pulmonar idiopática e atua em vias de sinalização disparadas por TNF- α e TGF- β como proteínas da via de sinalização de SMAD's e MAPK (Kim and Keating, 2015). Losmapimod é um inibidor sintético da via de p38 MAPK (LK et al., 2014) o SP600125 é um inibidor sintético da via de sinalização JNK, com o potencial de inibir as isoformas existentes JNK1, JNK2 e JNK3, sendo a via de JNK3 predominante no tecido cardíaco (Bennett et al., 2001).

Nossos ensaios foram sensíveis o suficiente para construir curvas dose resposta sigmoidais de concentração em fibroblastos cardíacos humanos infectados pelo *T. cruzi*, estimulados com meio condicionado e com o lisado do *T. cruzi*. Nossos dados *in vitro* revelaram que os compostos pirfenidona, losmapimod, SP600125 e 10 GAG's foram eficazes na inibição de colágeno proposto no nosso modelo de fibroblastos cardíacos humanos infectados pelo *T. cruzi*.

A pirfenidona já foi descrita possuindo efeito anti-fibrótico em FC em uma maneira direta, com a inibição de colágeno (Shi et al., 2011). Por sua vez, já foi demonstrado que losmapimod, um inibidor seletivo para a via de p38 MAPK, inibe a produção de colágeno total através do fator de transcrição do miocárdio A (MRTF-A) (Kojonazarov et al., 2017). O tratamento com SP600125 em modelos *in vivo* de

camundongos com cardiomiopatia dilatada reduz significativamente a expressão de colágeno e fibronectina, impedindo assim a progressão da fibrose cardíaca (Wu et al., 2011).

Além de avaliarmos o efeito dos compostos na síntese e deposição de colágeno, investigamos se diferentes glicosaminoglicanos e seus análogos apresentavam efeito inibitório na deposição de colágeno na MEC, já que dados reportaram que diferentes análogos de heparan sulfato (RGTA – sigla em inglês para agentes regeneradores) promoveram uma redução no depósito de colágeno do tipo I e III na MEC em células de músculo liso (Alexakis et al., 2004). Após essas informações, testamos no nosso estudo 24 glicosaminoglicanos e análogos em FCh infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil). Dos 24 GAG's testados, 10 foram eficazes inibindo a síntese e deposição de colágeno total na MEC.

Além de observarmos o potencial anti-fibrótico com pirfenidona, losmapimod, benzonidazol e SP6001245 e diferentes GAG's, analisamos também no nosso estudo se esses compostos apresentavam efeito tripanocida. Nossos dados demonstraram que pirfenidona, losmapimod e SP600125 não apresentaram eficácia na infecção quando comparados com o composto referência benzonidazol, que eliminou o parasito intracelular. Dos 24 GAG's testados, 4 GAG's (heparina intestinal suína, heparina 2-desulfatada, oligos de heparina e heparina sódica de baixo peso molecular) apresentaram efeito na infecção pelo *T. cruzi*, apresentando níveis de até 77% de inibição em FCh. Porém entre eles, apenas oligos de heparina e heparina sódica de baixo peso molecular apresentaram atividade na redução do depósito de colágeno em FCh infectados pelo *T. cruzi*. Dados obtidos no nosso estudo corroboram com dados anteriores reportados do nosso grupo em que proteoglicanos de heparan sulfato medeiam a invasão de formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* em cardiomiócitos. O tratamento com heparina e heparan sulfato em formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi* levaram a uma redução nos índices de infecção do parasito em cardiomiócitos (Bambino-Medeiros et al., 2011; Calvet et al., 2003; Oliveira et al., 2008).

Além de avaliarmos a participação de diferentes compostos na deposição de colágeno e na infecção pelo *T. cruzi*, abordamos também a participação de pirfenidona, losmapimod, SP600125 e os 24 GAG's e seus análogos na proliferação de FCh infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil). Nossos dados revelaram que pirfenidona, losmapimod e SP600125 não foram eficazes contra a proliferação de FCh induzida pela infecção pelo *T. cruzi*, enquanto todos os 24 GAG's e análogos

promoveram uma inibição da proliferação de FCh infectados pelo *T. cruzi*. Em contraste, outros autores mostraram que a pirfenidona apresentou uma eficácia em inibir a proliferação de fibroblastos cardíacos de cultura de ratos mas não afetaram a viabilidade celular, sugerindo que o efeito anti proliferativo apresentado não foi ocasionado por efeito citotóxico direto da pirfenidona (Shi et al., 2011). O efeito anti-proliferativo de GAG's em diferentes células já é descrito em que heparina e heparina de-N-sulfatada inibem a proliferação de fibroblastos pulmonares induzida pelo PDGF (Sasaki et al., 2000).

Portanto, os dados *in vitro* do nosso estudo mostraram que pirfenidona, losmapimod, SP600125 apresentaram atividade anti-fibrótica e não tripanocida. Já diferentes glicosaminoglicanos e seus análogos apresentaram atividade tripanocida e impediram a proliferação de FCh infectados pelo *T. cruzi*. Esse conjunto de dados *in vitro* revelou que esses compostos e diferentes GAG's, podem ser candidatos potenciais para o tratamento da fibrose cardíaca na doença de Chagas.

Além de realizar ensaios *in vitro* e avaliar a participação das citocinas na deposição na MEC, vias de sinalização, proliferação celular, e com tratamento com inibidores de sinalização em FCh infectados pelo *T. cruzi*, realizamos ensaios *in vivo* em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) para avaliar a eficácia dos compostos (benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125) na deposição de colágeno, através da administração de pirfenidona, losmapimod, SP600125 e benzonidazol como controle.

Para realizar o ensaio *in vivo*, utilizamos a linhagem de camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil). A escolha do modelo foi a partir de dados da literatura que demonstraram que a linhagem de camundongo C57BL/6 é mais susceptível para o desenvolvimento da miocardite crônica, resultando em alterações eletrocardiográficas, hipertrofia e fibrose cardíaca (Pereira et al., 2014). A partir disso, camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* foram tratados com 200 mg/kg de pirfenidona, 15 mg/kg de losmapimod e 3 mg/kg de SP600125 após 60dpi e 100 dpi. No final do tratamento, avaliamos a função cardíaca por ecocardiograma, a presença de parasitos no tecido por PCR quantitativo, e a deposição de colágeno na MEC através de coloração por Sirius Red em cortes histológicos. Na doença de Chagas, ecocardiograma é utilizado no diagnóstico de CCC em pacientes infectados pelo *T. cruzi*. Pacientes com CCC apresentam ecocardiograma alterados, com um aumento no diâmetro do ventrículo esquerdo, sendo este associado com anormalidades presentes na parede segmentar. Uma vez que a doença progride para a forma crônica

cardíaca, danos no tecido são observados e conseqüentemente são observados alterações estruturais e funcionais no órgão. Anormalidades presentes na contratilidade do ventrículo esquerdo em pacientes com CCC podem ocorrer em qualquer estágio da doença, atingindo cerca de 50% dos pacientes com CCC (Acquatella et al., 2018; Sánchez-Montalvá et al., 2016). Dados do ecocardiograma em camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) sugeriram uma pequena hipertrofia no tecido cardíaco após os parâmetros analisados como a massa do ventrículo esquerdo com relação a massa corporal (LVM/BW) e o diâmetro do ventrículo esquerdo com relação a massa corporal (LVDd/BW). Porém, pirfenidona, benzonidazol, losmapimod e SP600125 em diferentes dpi's, não reverteram ou impediram a pequena hipertrofia instalada no tecido.

Após a análise do ecocardiograma, avaliamos a carga parasitária no tecido cardíaco em camundongos C57BL/6. Nossos dados demonstraram que não houve diferença significativa na carga parasitária após o tratamento com pirfenidona, losmapimod e SP600125. Esses dados estão de acordo com o modelo *in vitro* em que culturas de FCh infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) em que esses compostos não foram eficazes contra a infecção pelo *T. cruzi*.

Também avaliamos a deposição de colágeno total após o tratamento com pirfenidona, losmapimod e SP600125 após 60 e 100dpi. Nosso estudo revelou que apenas o tratamento com a pirfenidona após 60dpi apresentou eficácia em camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil) na redução do depósito de colágeno, quando comparados com tecidos de camundongos infectados pelo *T. cruzi* não tratados. A pirfenidona é um composto importante porque possui propriedades anti-fibróticas, anti-inflamatórias e anti-oxidantes (Wang et al., 2013). Outros compostos foram descritos com atividade semelhante. O tratamento de camundongos CD1 infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil) com verapamil, promoveu uma redução na inflamação e do desenvolvimento da fibrose na fase aguda da doença de Chagas após tratamento nas fases iniciais da infecção, enquanto tratamento tardio não resultou em efeito benéfico (De Souza et al., 2004). Outros autores reportaram que o tratamento com pirfenidona promoveu uma melhoria no quadro de fibrose instalado no tecido cardíaco em camundongos com hipertrofia ventricular esquerda induzida por constrição aórtica transversal (TAC) (Wang et al., 2013). Em modelos de fibrose renal em camundongos, pirfenidona apresentou eficácia induzindo a inibição de componentes de MEC associado a reversão da transição epitélio-mesenquimal. A transição epitélio mesenquimal dá origem a fibroblastos cardíacos e é acionada pelas

vias de sinalização p38 MAPK, c-Jun e ERK, que são inibidas após o tratamento com a pirfenidona (Li et al., 2017). O uso da pirfenidona em quadros de fibrose intestinal promoveu uma redução na fibrose regulando a proliferação e a apoptose em fibroblastos intersticiais, inibindo a via clássica de sinalização SMADs e PI3K/AKT (Sun et al., 2018). Outros inibidores da via clássica e alternativa do TGF- β também já foram testados em modelos *in vivo* de infecção experimental pelo *T. cruzi*. O composto GW788388, que inibe o receptor de TGF- β do tipo I e do tipo II, quando administrado na fase aguda em camundongos infectados com *T. cruzi*, levou a redução na parasitemia, na mortalidade e impediu o desenvolvimento da fibrose com uma redução significativa de fibronectina e colágeno I (de Oliveira et al., 2012). Este mesmo composto também foi eficaz em reduzir a fibrose e inflamação em modelos de infecção crônica pelo *T. cruzi*, também resultando em melhora da função cardíaca (Ferreira et al., 2019). A fibrose no coração é mediada pelo menos parcialmente por TGF- β , um biomarcador importante para a gênese da fibrose cardíaca na doença de Chagas (Araújo-Jorge et al., 2012). Ainda, nossos resultados estão de acordo com dados da literatura em que a deposição de componentes de MEC e a ativação de vias de sinalização, encontram-se em níveis elevados em modelos de fase aguda em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, observando um aumento na fosforilação de SMAD 2/3, ERK, p38 MAPK e JNK. A inibição do receptor de TGF- β , T β RI e II, reduziu danos cardíacos apresentados no modelo e reverteu o quadro de fibrose cardíaca ainda no final da fase aguda da doença de Chagas (20 dpi) (Ferreira et al., 2016).

Além da via clássica do TGF- β , a via alternativa p38 MAPK é conhecida por estar envolvida no processo de falha cardíaca (Kojonazarov et al., 2017). Apesar de nosso estudo *in vivo* não demonstrar efeito do inibidor de p38 MAPK, evidências em diferentes modelos de cardiomiopatia mostraram que inibidores de p38 MAPK podem ser potenciais para o tratamento em indivíduos com problemas cardíacos. O tratamento com inibidores específicos de p38 MAPK como SB203580 reduziu a área fibrótica, promoveu uma melhoria na fração de ejeção do ventrículo esquerdo e aumentou a contratilidade em modelos de cardiomiopatia em hamsters (Arabacilar and Marber, 2015). Outro inibidor farmacológico, o PH797804, melhorou a função do ventrículo direito e inibiu a fibrose cardíaca em comparação com o placebo em modelo murino. Em fibroblastos isolados do ventrículo direito, a inibição de p38 MAPK reduziu a produção de colágeno, bem como a formação de fibras de estresse (Dewenter et al., 2016; Kojonazarov et al., 2017). Os inibidores da via de p38 MAPK SB203580 e o PH7804 apresentaram eficácia na melhoria do funcionamento cardíaco. Por sua vez,

no nosso estudo em camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi*, avaliamos o efeito do losmapimod, um inibidor específico da via de p38 MAPK, que alcançou fase II em ensaios clínicos em pacientes com infarto do miocárdio. Dados da literatura mostraram que a administração de losmapimod melhorou significativamente a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, reduziu a inflamação, melhorou a vascularização, promoveu uma diminuição do volume sistólico final e reduziu os níveis de moléculas natriuréticas NT-pro-BNP, importantes no desenvolvimento hipertrofico (O'Donoghue et al., 2016). Porém, no nosso estudo, o tratamento com losmapimod no tecido cardíaco em camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) não apresentou eficácia quanto a redução de colágeno.

Além da via de p38 MAPK, avaliamos também a importância da via de c-Jun. Danos cardíacos, como doença cardíaca coronariana, insuficiência cardíaca e aneurisma, podem estar associados com elevada atividade da proteína JNK (Zuo et al., 2019). No nosso estudo *in vivo*, o inibidor SP600125 não apresentou eficácia quanto a redução na deposição de colágeno. No entanto, a administração de SP600125 inibe a fosforilação de c-Jun, a expressão de genes inflamatórios como COX-2, IL-2, IFN- γ e TNF- α , regula a expressão de TNF- α por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, como a estabilidade do RNA mensageiro e o processamento de proteínas, bloqueando em animais a expressão de TNF- α induzida por lipopolisacarídeos e inibindo apoptose de timócitos (Bennett et al., 2001; Bogoyevitch and Arthur, 2008). Ainda, estudos apontam que a administração de SP600125, inibe a fosforilação de JNK em corações de camundongos e a expressão de RNA mensageiro JunD em camundongos com cardiomiopatia induzida por mutação do gene *Lmna*^{H222P/H222P}. Nesse modelo, o tratamento com SP600125 proporcionou uma redução na deposição de colágeno, reduzindo significativamente o quadro de fibrose no tecido cardíaco (Wu et al., 2010). Além disso a proteína c-Jun associados com a proteína 3 (JIP3), possui um papel importante na regulação da hipertrofia e a fibrose em modelos *in vitro* e *in vivo*. A inibição da via JNK, promove uma redução na hipertrofia e nos níveis de colágeno I e III no tecido cardíaco em modelos de cardiomiopatia induzida por *aortic banding* em camundongos (Ma et al., 2018). No entanto, em nosso modelo experimental em camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil), o tratamento com SP600125 não reduziu a deposição de colágeno no tecido cardíaco nem a hipertrofia.

Apesar de não ter sido possível testarmos GAG's no nosso ensaio *in vivo*, GAG's podem ser candidatos promissores para o tratamento da fibrose cardíaca na

doença de Chagas já que nosso estudo *in vitro* mostrou que heparina e análogos demonstraram efeito na inibição de colágeno, reduziram a infecção pelo *T. cruzi* e impediram a proliferação de fibroblastos cardíacos humanos infectados pelo *T. cruzi*. Outros GAGs, como ácido hialurônico, possuem ação contra o desenvolvimento da fibrose no tecido cardíaco. O acúmulo desse GAG no tecido atua como um regulador inflamatório, modula a liberação de citocinas próinflamatórias e a migração e diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos, a fim de conter o acúmulo de componentes de MEC que propiciam o desenvolvimento da fibrose cardíaca (Ghatak et al., 2015).

Portanto, o tratamento com os compostos benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125 em camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) revelaram que apenas a pirfenidona, que atua em vias de sinalização acionadas pelo TGF- β e TNF- α , apresentou efeito na redução da expressão de colágeno na MEC, sendo esse composto um bom candidato promissor para o tratamento da fibrose cardíaca em pacientes com CCC.

Conclusão

6 – CONCLUSÕES

- I. Culturas de mioblastos esqueléticos L6E9 e fibroblastos cardíacos não infectados, estimulados com diferentes concentrações de TGF- β , apresentaram um aumento na expressão de FN na MEC. A infecção pelo *T. cruzi* promoveu uma redução na expressão de FN em mioblastos L6E9 e um aumento na expressão de FN em FC. A via de sinalização de SMAD's é inibida após infecção intensa pelo *T. cruzi* em FC, enquanto p38 MAPK e c-Jun são estimuladas em FC infectados com *T. cruzi* e tratados com TGF- β . Tanto o TGF- β quanto a infecção pelo parasito promovem a proliferação de FC.
- II. Em fibroblastos cardíacos, o estímulo com diferentes concentrações de TNF- α e IFN- γ em FC promoveu um aumento na expressão de fibronectina e colágeno na MEC, estímulo da proliferação celular e da fosforilação de p38 MAPK e c-Jun. A infecção pelo *T. cruzi* em FC, tratadas com TNF- α e IFN- γ , resultou em redução na expressão de FN e aumento na expressão de colágeno na MEC. As vias de p38 MAPK e c-Jun são ativadas pela infecção pelo parasito e estímulo com TNF- α ou IFN- γ . A ativação dessas vias pode estar envolvida no desenvolvimento da fibrose cardíaca na doença de Chagas.
- III. A infecção pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) e o soro de camundongos infectados com *T. cruzi*, estimularam o aumento de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos. Os inibidores benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125 em doses únicas em FCh infectados ou estimulados, promoveram uma redução na expressão de colágeno na MEC.
- IV. O ensaio de detecção de colágeno por Sirius Red-Fast Green em FCh foi sensível o suficiente para construir curvas dose resposta sigmoidais em todos os modelos de estímulo de MEC avaliados - após infecção direta pelo *T. cruzi*, estímulo com meio condicionado e lisado do parasito. O tratamento com benzonidazol, pirfenidona, losmapimod, SP600125 apresentaram eficácia quanto a inibição de colágeno em fibroblastos cardíacos humanos infectados ou estimulados. Apenas o SP600125 não foi eficaz em reduzir a expressão de colágeno na MEC após o estímulo com lisado do parasito em FCh. Dos 24 GAG's testados no nosso estudo, 10 GAG's de heparina e seus análogos foram eficazes na inibição de colágeno na MEC.

- V. Os inibidores anti-fibróticos pirfenidona, losmapimod e SP600125 não promoveram uma redução na infecção pelo *T. cruzi* em FCh quando comparados com o benzonidazol.
- VI. GAG1 (Heparina de intestino suíno), GAG12 (Heparina 2-dissulfatada), GAG21 (Análogo de heparina dp16) e GAG25 (LMW heparina sódica da mucosa intestinal) reduziram a infecção pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) em FCh.
- VII. A infecção pelo *T. cruzi* promoveu um aumento na proliferação celular em FCh. O tratamento com os 24 GAG's disponíveis revelaram uma redução na proliferação celular induzida pelo parasito, alcançando níveis similares da cultura controle.
- VIII. Os inibidores de sinalização - pirfenidona, losmapimod e SP600125- não modularam a proliferação de FCh em nenhum modelo de estímulo testados.
- IX. O tratamento com diferentes inibidores anti-fibróticos (benzonidazol, pirfenidona, losmapimod e SP600125) em camundongos da linhagem C57/Bl6 infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil) não resultou uma redução no perfil hipertrófico cardíaco induzido pelo *T. cruzi*.
- X. O tratamento de camundongos infectados pelo *T. cruzi* com pirfenidona a partir de 60dpi reduziu a expressão de colágeno na MEC detectada por métodos histológicos e bioquímicos.

Referências

Bibliográficas

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquatella, H., Asch, F. M., Barbosa, M. M., Barros, M., Bern, C., Cavalcante, J. L., et al. (2018). Recommendations for Multimodality Cardiac Imaging in Patients with Chagas Disease: A Report from the American Society of Echocardiography in Collaboration With the InterAmerican Association of Echocardiography (ECOSIAC) and the Cardiovascular Imaging Depa. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 31, 3–25. doi:10.1016/j.echo.2017.10.019.
- Aiyer, R. A., and Aggarwal, B. B. (2018). Tumor necrosis factors. *Cytolytic Lymphocytes Complement Eff. Immune Syst.* 2, 105–134. doi:10.1201/9781351071291.
- Akhurst, R. J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 790–811. doi:10.1038/nrd3810.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2010). *Biologia Molecular da Célula*. 5a. edição. , ed. Artmed.
- ALEXAKIS, C., MESTRIES, P., GARCIA, S., PETIT, E., BARBIER, V., PAPY-GARCIA, D., et al. (2004). Structurally different RGTAs modulate collagen-type expression by cultured aortic smooth muscle cells via different pathways involving fibroblast growth factor-2 or transforming growth factor- β 1. *FASEB J.* 18, 1147–1149. doi:10.1096/fj.03-1126fje.
- AM, K., F, L., G, O., DL, D., D, Q., RT, W., et al. (2004). B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* 94, 453–6.
- Andrade, L. O., and Andrews, N. W. (2005). The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 819–23. doi:10.1038/nrmicro1249.
- Andrade, D. V, Gollob, K. J., and Dutra, W. O. (2014). Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3010. doi:10.1371/journal.pntd.0003010.
- Andrews, M. C. F. and N. W. (2013). Host Cell Invasion by Trypanosoma cruzi: A Unique Strategy that Promotes Persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 734–747. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.Host.
- AR, K., F, S., DA, L., A, A., DM, C., and BH, W. (2008). Long-Term but Not Short-Term p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition Improves Cardiac Function and Reduces Cardiac Remodeling Post-Myocardial. *J Pharmacol Exp Ther.* 325, 741–

750.

- Arabacilar, P., and Marber, M. (2015). The case for inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase in heart failure. *Front. Pharmacol.* 6, 1–7. doi:10.3389/fphar.2015.00102.
- Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Bailly, S., and Feige, J. J. (2012). The TGF- β pathway as an emerging target for chagas disease therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 613–621. doi:10.1038/clpt.2012.102.
- Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Hasslocher-moreno, A. M., Xavier, S., Higuchi, M. D. L., Keramidas, M., et al. (2002). Implication of Transforming Growth Factor – β 1 in Chagas Disease Myocardiopathy. *J. Infect. Dis.* 186, 1823–1828.
- Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Soeiro, M. D. N. C., Keramidas, M., Bailly, S., and Feige, J.-J. (2008). Pivotal role for TGF- β in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardiopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 405–13. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.08.002.
- Araújo-Jorge TC, Waghabi MC, Bailly S, F. J.-J., Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Bailly, S., and Feige, J.-J. J. (2012). The TGF- β pathway as an emerging target for chagas disease therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 613–621. doi:10.1038/clpt.2012.102.
- Arias, J. I., Sepulveda, C., Bravo, P., Hamilton-West, C., Maldonado, I., and Ferreira, A. (2015). Comparative effect of human and *Trypanosoma cruzi* calreticulin in wound healing. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, 41–54. doi:10.1002/term.
- Bach, E. A., Aguet, M., and Schreiber, R. D. (2002). THE IFN γ RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563–591. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.563.
- Badylak, J. L. D. and S. F. (2018). Cardiac Extracellular Matrix. *Card. Extracell. matrix* 1098. doi:10.1007/978-3-319-97421-7.
- Bambino-Medeiros, R., Oliveira, F. O., Calvet, C. M., Vicente, D., Toma, L., Krieger, M. A., et al. (2011). Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. *Parasitology* 138, 593–601. doi:10.1017/S0031182010001678.
- Begoña López, Arantxa González (2010). Circulating Biomarkers of Collagen Metabolism in Cardiac Diseases. *Circulation* 121, 1645–1654.
- Bello Corassa, R., Aceijas, C., Alves, P. A. B., and Garelick, H. (2017). Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: A critical review. *Perspect. Public Health* 137, 289–295.

doi:10.1177/1757913916671160.

- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., Leary, E. C. O., Sakata, S. T., Xu, W., et al. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *PNAS* 98, 1–6.
- Benziger, C. P., do Carmo, G. A. L., and Ribeiro, A. L. P. (2017). Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. *Cardiol. Clin.* 35, 31–47. doi:10.1016/j.ccl.2016.08.013.
- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 373, 456–466. doi:10.1056/NEJMra1410150.
- Bestetti, R. B., Scanavacca, M. I., Issa, V. S., Bocchi, E. A., and Cunha Neto, E. (2017). Chronic Chagas Heart Disease Management. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 1510–1524. doi:10.1016/j.jacc.2017.08.004.
- Bogoyevitch, M. A., and Arthur, P. G. (2008). Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases-
JunK no more? *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1784, 76–93. doi:10.1016/j.bbapap.2007.09.013.
- Bogoyevitch, M. A., Boehm, I., Oakley, A., Ketterman, A. J., and Barr, R. K. (2004). Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: Basic science and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1697, 89–101. doi:10.1016/j.bbapap.2003.11.016.
- Bonney, K. M. (2014). Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21, 11. doi:10.1051/parasite/2014012.
- Botoni, F. A., Poole-Wilson, P. A., Ribeiro, A. L. P., Okonko, D. O., Oliveira, B. M. R., Pinto, A. S., et al. (2007). A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 153, 544.e1-544.e8. doi:10.1016/j.ahj.2006.12.017.
- Bradshaw, M. J., and Smith, M. L. (2014). Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. *Acta Biomater.* 10, 1524–31. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.027.
- Browne, A. J., Guerra, C. A., Alves, R. V., Da Costa, V. M., Wilson, A. L., Pigott, D. M., et al. (2017). The contemporary distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in humans, alternative hosts and vectors. *Sci. Data* 4, 1–9. doi:10.1038/sdata.2017.50.
- Bujak, M., and Frangogiannis, N. G. (2007). The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 74, 184–95. doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.002.

- Burghardt, I., Tritschler, F., Opitz, C. A., Frank, B., Weller, M., and Wick, W. (2007). Pirfenidone inhibits TGF- β expression in malignant glioma cells. *354*, 542–547. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.012.
- Caldas, I. S., da Matta Guedes, P. M., dos Santos, F. M., de Figueiredo Diniz, L., Martins, T. A. F., da Silva do Nascimento, A. F., et al. (2013). Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. *Trop. Med. Int. Heal.* *18*, 75–84. doi:10.1111/tmi.12002.
- Calvet, C. M., Meuser, M., Almeida, D., Meirelles, M. N. L., and Pereira, M. C. S. (2004). *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp. Parasitol.* *107*, 20–30. doi:10.1016/j.exppara.2004.04.003.
- Calvet, C. M., Oliveira, F. O. R., Araújo-Jorge, T. C., and Pereira, M. C. S. (2009). Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int. J. Med. Microbiol.* *299*, 301–12. doi:10.1016/j.ijmm.2008.08.005.
- Calvet, C. M., Silva, T. A., De Melo, T. G., De Araújo-Jorge, T. C., and De Souza Pereira, M. C. (2016). TGF- β receptor type II costameric localization in cardiomyocytes and host cell TGF- β response is disrupted by *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology* *143*. doi:10.1017/S0031182016000299.
- Calvet, C. M., Toma, L., De Souza, F. R., Meirelles, M. D. N. S. L. De, and Pereira, M. C. S. (2003). Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* *50*, 97–103.
- Cardoso, D. R. F., Reis, L. M. S. dos, Sousa, R. F. V. de, Nascimento, E. F. do, Santos, J. P. dos, Carvalho-Costa, F. A., et al. (2018). Chagasic infection among blood donors in Brazil: an integrative review. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* *40*, 283–291. doi:10.1016/j.htct.2018.01.010.
- Carlos, J., Dias, P., Neto, V. A., and Albuquerque, J. De (2011). Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* *44*, 375–379. doi:10.1590/S0037-86822011005000032.Mecanismos.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *1*, no:2, 0074-0276.
- Chen, W., and Ten Dijke, P. (2016). Immunoregulation by members of the TGF β superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 723–740. doi:10.1038/nri.2016.112.

- Cheruku, H. R., Mohamedali, A., Cantor, D. I., Tan, S. H., Nice, E. C., and Baker, M. S. (2015). Transforming growth factor- β , MAPK and Wnt signaling interactions in colorectal cancer. *EuPA Open Proteomics* 8, 104–115. doi:10.1016/j.euprot.2015.06.004.
- Chilakamarti V. Ramana, M. Pilar Gil, R. D. S. and G. R. S., and The (2002). Stat1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol.* 23, 96–101. doi:10.1177/096701067901000109.
- Coelho, L. L., Pereira, I. R., Pereira, M. C. D. S., Mesquita, L., Lannes-Vieira, J., Adesse, D., et al. (2018). Trypanosoma cruzi activates mouse cardiac fibroblasts in vitro leading to fibroblast-myofibroblast transition and increase in expression of extracellular matrix proteins. *Parasites and Vectors* 11, 1–11. doi:10.1186/s13071-018-2614-1.
- Coura, José Rodrigues and Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115, 5–13.
- Coura, J. R. (2013). Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 962–7. doi:10.1590/0074-0276130565.
- Coura, J. R. (2015). The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 277–282. doi:10.1590/0074-0276140362.
- Cruz, J. S., Santos-Miranda, A., Sales, P. A., Monti-Rocha, R., Campos, P. P., Machado, F. S., et al. (2016). Altered cardiomyocyte function and Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 1028–1033. doi:10.4269/ajtmh.15-0255.
- Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1358–75. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010.
- Cui, J., Zhang, M., Zhang, Y. Q., and Xu, Z. H. (2007). JNK pathway: Diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 601–608. doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00579.x.
- Cunha-Neto, E., and Chevillard, C. (2014). Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. *Mediators Inflamm.* 2014, 683230. doi:10.1155/2014/683230.
- Darby, I. A., and Laverdet, B. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 7, 301–311.
- De Bona, E., Lidani, K. C. F., Bavia, L., Omidian, Z., Gremski, L. H., Sandri, T. L., et

- al. (2018). Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy? *Front. Immunol.* 9, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2018.01842.
- de Oliveira, F. L., Araújo-Jorge, T. C., de Souza, E. M., de Oliveira, G. M., Degraeve, W. M., Feige, J.-J. J., et al. (2012). Oral administration of gw788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1696. doi:10.1371/journal.pntd.0001696.
- De Souza, A. P., Tanowitz, H. B., Chandra, M., Shtutin, V., Weiss, L. M., Morris, S. A., et al. (2004). Effects of early and late verapamil administration on the development of cardiomyopathy in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. *Parasitol. Res.* 92, 496–501. doi:10.1007/s00436-004-1080-1.
- Deb, A., and Ubil, E. (2014). Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 47–55. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.02.017.
- Derynck, R., and Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci. Signal.* 12. doi:10.1126/scisignal.aav5183.
- Dewenter, M., Wagner, M., and El-Armouche, A. (2016). LATITUDE-TIMI: Is there still hope for anti-inflammatory therapy in acute myocardial infarction? *J. Thorac. Dis.* 8, E1047–E1049. doi:10.21037/jtd.2016.08.66.
- Dias, J. C. P., Ramos, A. N., Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M. A., Coura, J. R., et al. (2016). 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 3–60. doi:10.1590/0037-8682-0505-2016.
- Diniz, L. D. F., Urbina, J. a, de Andrade, I. M., Mazzeti, A. L., Martins, T. A. F., Caldas, I. S., et al. (2013). Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2367. doi:10.1371/journal.pntd.0002367.
- Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N. G. (2009). Chemokines and cardiac fibrosis. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* 1, 391–405. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482709>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2798729>.
- Domeier, P. P., Chodisetti, S. B., Soni, C., Schell, S. L., Elias, M. J., Wong, E. B., et al. (2016). IFN- γ receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 213, 715–732. doi:10.1084/jem.20151722.
- Doppler, S. A., Carvalho, C., Lahm, H., Deutsch, M. A., Dreßen, M., Puluca, N., et al. (2017). Cardiac fibroblasts: More than mechanical support. *J. Thorac. Dis.* 9, S36–S51. doi:10.21037/jtd.2017.03.122.

- Drabsch Y, ten D. P., Drabsch, Y., and ten Dijke, P. (2012). TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 31, 553–568. doi:10.1007/s10555-012-9375-7.
- Duschak, V. G. (2016). Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease in the Last 15 Years-Period. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 74–173. doi:10.2174/1574891X11666161024165.
- Dutra, W. O., Menezes, C. A. S., Magalhães, L. M. D., and Gollob, K. J. (2014). Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 36, 377–387. doi:10.1111/pim.12107.
- Echeverria, L. E., and Morillo, C. A. (2019). American Trypanosomiasis (Chagas Disease) Chagas disease Cardiomyopathy Heart failure Trypanosomiasis Parasitology. *Infect. Dis. Clin. NA* 33, 119–134. doi:10.1016/j.idc.2018.10.015.
- Engel, M. E., McDonnell, M. a., Law, B. K., and Moses, H. L. (1999). Interdependent SMAD and JNK Signaling in Transforming Growth Factor- β -mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 37413–37420. doi:10.1074/jbc.274.52.37413.
- Fan, D., Takawale, A., Lee, J., and Kassiri, Z. (2012). Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, 15. doi:10.1186/1755-1536-5-15.
- Ferrão, P. M., D'Avila-Levy, C. M., Araujo-Jorge, T. C., Degraive, W. M., Gonçalves, A. D. S., Garzoni, L. R., et al. (2015). Cruzipain activates latent TGF- β from host cells during *T. cruzi* invasion. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0124832.
- Ferrão, P., Nisimura, L., Moreira, O., Land, M., Pereira, M. C., de Mendonça-Lima, L., et al. (2018). Inhibition of TGF- β pathway reverts extracellular matrix remodeling in *T. cruzi*-infected cardiac spheroids. *Exp. Cell Res.* 362, 260–267. doi:10.1016/j.yexcr.2017.11.026.
- Ferreira, R. R., Abreu, S., Vilar-pereira, G., Ferreira, C., Degraive, W., Meuser-batista, M., et al. (2019). TGF- β inhibitor therapy decreases fibrosis and stimulates cardiac improvement in a pre-clinical study of chronic Chagas' heart disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, 1–27.
- Ferreira, R. R., Da Silva Madeira, F., Alves, G. F., Da Costa Chambela, M., De Oliveira Vaz Curvo, E., Dos Santos Moreira, A., et al. (2018). TGF- β polymorphisms are a risk factor for Chagas disease. *Dis. Markers* 2018. doi:10.1155/2018/4579198.
- Ferreira, R. R., de Souza, E. M., de Oliveira, F. L., Ferrão, P. M., Gomes, L. H. F., Mendonça-Lima, L., et al. (2016a). Proteins involved on TGF- β pathway are up-

- regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. *Immunobiology* 221, 587–94. doi:10.1016/j.imbio.2016.01.009.
- Ferreira, R. R., de Souza, E. M., de Oliveira, F. L., Ferrão, P. M., Gomes, L. H. F., Mendonça-Lima, L., et al. (2016b). Proteins involved on TGF- β pathway are up-regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. *Immunobiology* 221, 587–94. doi:10.1016/j.imbio.2016.01.009.
- Filigheddu, M. T., G??rgolas, M., and Ramos, J. M. (2017). Enfermedad de Chagas de transmissi??n oral. *Med. Clin. (Barc)*. 148, 125–131. doi:10.1016/j.medcli.2016.10.038.
- Fisk, M., Cheriyan, J., Mohan, D., Forman, J., Mäki-Petäjä, K. M., McEniery, C. M., et al. (2018). The p38 mitogen activated protein kinase inhibitor losmapimod in chronic obstructive pulmonary disease patients with systemic inflammation, stratified by fibrinogen: A randomised double-blind placebo-controlled trial. *PLoS One* 13, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0194197.
- Fix, C., Bingham, K., and Carver, W. (2011). Effects of Interleukin-18 on Cardiac Fibroblast Function and Gene Expression. *Cytokine* 53, 19–28. doi:10.1038/cdd.2010.172.MicroRNAs.
- Forsyth, C. J., Hernandez, S., Olmedo, W., Abuhamidah, A., Traina, M. I., Sanchez, D. R., et al. (2016). Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 63, 1056–1062. doi:10.1093/cid/ciw477.
- Frangogiannis, N. G. (2018). Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol. Aspects Med.*, 0–1. doi:10.1016/j.mam.2018.07.001.
- Frantz, C., Stewart, K. M., and Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195–200. doi:10.1242/jcs.023820.
- Fujiu, K., and Nagai, R. (2014). Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 64–73. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.01.013.
- Furtado, M. B., and Hasham, M. (2017). *Properties and Immune Function of Cardiac Fibroblasts*. doi:10.1007/978-3-319-57613-8.
- Garg, N. J., Bonney, K. M., Kim, S. A., Engman, D. M., and Luthringer, D. J. (2018). Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 14, 421–447. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043711.
- Garzoni, L. R., Adesse, D., Soares, M. J., Rossi, M. I. D., Borojevic, R., and de Meirelles, M. D. N. L. (2008). Fibrosis and hypertrophy induced by Trypanosoma cruzi in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J. Infect. Dis.* 197,

906–15. doi:10.1086/528373.

- Ghatak, S., Maytin, E. V., Mack, J. A., Hascall, V. C., Atanelishvili, I., Moreno Rodriguez, R., et al. (2015). Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *Int. J. Cell Biol.* 2015, 1–20. doi:10.1155/2015/834893.
- Guedes, P. M. M., Veloso, V. M., Afonso, L. C. C., Caliari, M. V., Carneiro, C. M., Diniz, L. F., et al. (2009). Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130, 43–52. doi:10.1016/j.vetimm.2009.01.004.
- Gutierrez, F. R. S. S., Guedes, P. M. M. M., Gazzinelli, R. T., and Silva, J. S. (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31, 673–685. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x.
- Hall, B. S., and Pereira, M. A. (2000). Dual Role for Transforming Growth Factor beta-Dependent Signaling in Trypanosoma cruzi Infection of Mammalian Cells. 68, 2077–2081.
- Hall, C. L., Wells, A. R., and Leung, K. P. (2018). Pirfenidone reduces profibrotic responses in human dermal myofibroblasts, in vitro. *Lab. Investig.* 98, 640–655. doi:10.1038/s41374-017-0014-3.
- Han, Y. lei, Li, Y. lin, Jia, L. xin, Cheng, J. zhong, Qi, Y. fen, Zhang, H. jia, et al. (2012). Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN- γ and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis. *PLoS One* 7, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0035506.
- Hinz, B. (2015). Myofibroblasts. *Exp. Eye Res.* 142, 56–70. doi:10.1016/j.exer.2015.07.009.
- Holmes, D. F., Lu, Y., Starborg, T., and Kadler, K. E. (2018). *Collagen Fibril Assembly and Function*. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.02.004.
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., and Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49, 1215–1228. doi:10.1093/rheumatology/keq031.
- Ignotz RA, M. J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261, 4337–45.
- Ignotz RA, M. J. (1987). Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell* 51, 189–197.

- Ilić, D., Kovacic, B., Johkura, K., Schlaepfer, D. D., Tomasević, N., Han, Q., et al. (2004). FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J. Cell Sci.* 117, 177–87. doi:10.1242/jcs.00845.
- Iozzo, R. V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Physiol. Behav.* 42, 11–15. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Issa, V. S. (2018). The Indeterminate Form of Chagas Disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, 111–112. doi:10.5935/abc.20180027.
- Ivey, M. J., and Tallquist, M. D. (2016). Defining the Cardiac Fibroblast: A New Hope. *Circ. J.* 80, 2269–2276. doi:10.1253/circj.CJ-16-1003.Defining.
- JR Bradley (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 216, 399–407. doi:10.1002/path.
- Kalil-Filho, R. (2015). Globalization of Chagas Disease Burden and New Treatment Perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 1190–1192. doi:10.1016/j.jacc.2015.07.024.
- Kalluri, R., and Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119. doi:10.1172/JCI39104.1420.
- Kapur, N. K., Wilson, S., Yunis, A. a, Qiao, X., Mackey, E., Paruchuri, V., et al. (2012). Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation* 125, 2728–38. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.080002.
- Kim, E. S., and Keating, G. M. (2015). Pirfenidone: A review of its use in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs* 75, 219–230. doi:10.1007/s40265-015-0350-9.
- Kim, S.-H., Turnbull, J., and Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 209, 139–51. doi:10.1530/JOE-10-0377.
- Kojonazarov, B., Novoyatleva, T., Boehm, M., Happe, C., Sibinska, Z., Tian, X., et al. (2017). P38 mapk inhibition improves heart function in pressure-loaded right ventricular hypertrophy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 57, 603–614. doi:10.1165/rcmb.2016-0374OC.
- Kong, P., Christia, P., and Frangogiannis, N. G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 549–74. doi:10.1007/s00018-013-1349-6.
- Kovarik, P., Stoiber, D., Eysers, P. A., Menghini, R., Neining, A., Gaestel, M., et al. (2002). Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13956–13961. doi:10.1073/pnas.96.24.13956.

- Köwitsch, A., Zhou, G., and Groth, T. (2018). Medical application of glycosaminoglycans: a review. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12, e23–e41. doi:10.1002/term.2398.
- Krenning, G., Zeisberg, E. M., and Kalluri, R. (2010). The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 225, 631–7. doi:10.1002/jcp.22322.
- Kumar, A., Singh, U. K., Kini, S. G., Garg, V., Agrawal, S., Tomar, P. K., et al. (2015). JNK pathway signaling: A novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases. *Future Med. Chem.* 7, 2065–2086. doi:10.4155/fmc.15.132.
- L. García-Pozo, M.E. Miquilena-Colina, T. L.-R. and C. G.-M. (2008). Endoglin : structure , biological functions and role in fibrogenesis. *Rev. Española Enfermedades Dig.* 401, 355–360.
- Lancaster, L. H., de Andrade, J. A., Zibrak, J. D., Padilla, M. L., Albera, C., Nathan, S. D., et al. (2017). Pirfenidone safety and adverse event management in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 26, 170057. doi:10.1183/16000617.0057-2017.
- Lannes-vieira, J., Pereira, I. R., Vinagre, N. F., Elena, L., and Arnez, A. (2011). TNF- α and TNFR in Chagas Disease: From Protective Immunity to Pathogenesis of Chronic Cardiomyopathy. *Adv. TNF Fam. Reseach* 691, 221–230. doi:10.1007/978-1-4419-6612-4.
- Leask, A. (2007). TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc. Res.* 74, 207–12. doi:10.1016/j.cardiores.2006.07.012.
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., and Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect. Dis.* 13, 342–8. doi:10.1016/S1473-3099(13)70002-1.
- Leiss, M., Beckmann, K., Girós, A., Costell, M., and Fässler, R. (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 502–7. doi:10.1016/j.ceb.2008.06.001.
- Leong, K. G., and Karsan, A. (2000). Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor α . *Histol. Histopathol.* 15, 1303–1325.
- Lepesheva, G. I. (2013). Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: What shows the most promise? *Expert Opin Drug Discov.* 8, 1–17. doi:10.1517/17460441.2013.845554.Design.
- Li, L., Zhao, Q., and Kong, W. (2018). Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol.* 68–69, 490–506. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.013.

- Li, Z., Liu, X., Wang, B., Nie, Y., Wen, J., Wang, Q., et al. (2017). Pirfenidone suppresses MAPK signalling pathway to reverse epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Nephrology* 22, 589–597. doi:10.1111/nep.12831.
- Liang, K., Dong, S. R., and Peng, H. (2016). Serum levels and clinical significance of IFN- γ and IL-10 in PATIENTS with coronary heart disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 1339–1343.
- Liang, Q., and Molkenin, J. D. (2003). Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: Dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 1385–1394. doi:10.1016/j.yjmcc.2003.10.001.
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., et al. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Heal.* 7, 1–13. doi:10.3389/fpubh.2019.00166.
- Liew, R., Khairunnisa, K., Gu, Y., Tee, N., Yin, N. O., Naylynn, T. M., et al. (2013). Role of Tumor Necrosis Factor- α in the Pathogenesis of Atrial Fibrosis and Development of an Arrhythmogenic Substrate. *Circ. J.* 77, 1171–1179. doi:10.1253/circj.cj-12-1155.
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., and Regenstein, J. M. (2015). Collagen and Gelatin. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 527–557. doi:10.1146/annurev-food-031414-111800.
- LK, N., MS, M., C, M., L, S.-B., LH, A., PE, A., et al. (2014). Losmapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in non-ST-segment elevation myocardial infarction: A randomised phase 2 trial. *Lancet* 384, 1187–1195. doi:10.1016/S0140-6736(14)60417-7.
- Lopez-De Leon, A., and Rojkind, M. (1985). A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 737–743. doi:10.1177/33.8.2410480.
- Lorena, V. M. B., Lorena, I. M. B., Braz, S. C. M., Melo, A. S., Melo, M. F. A. D., Melo, M. G. A. C., et al. (2010). Cytokine levels in serious cardiopathy of chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from trypanosoma cruzi. *Scand. J. Immunol.* 72, 529–539. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02462.x.
- Ma, Q., Liu, Y., and Chen, L. (2018a). JIP3 deficiency attenuates cardiac hypertrophy by suppression of JNK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 1–7. doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.208.
- Ma, Y., Iyer, R. P., Jung, M., Czubyrt, M. P., and Lindsey, M. L. (2017). Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps.

- Trends Pharmacol. Sci.* 38, 448–458. doi:10.1016/j.tips.2017.03.001.
- Ma, Z. G., Yuan, Y. P., Wu, H. M., Zhang, X., and Tang, Q. Z. (2018b). Cardiac fibrosis: New insights into the pathogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 1645–1657. doi:10.7150/ijbs.28103.
- Machado, F. S., Martins, G. a., Aliberti, J. C. S., Mestriner, F. L. a. C., Cunha, F. Q., and Silva, J. S. (2000). Trypanosoma cruzi-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. *Circulation* 102, 3003–3008. doi:10.1161/01.CIR.102.24.3003.
- Machado, F. S., Tanowitz, H. B., and Ribeiro, A. L. (2013). Pathogenesis of Chagas cardiomyopathy: Role of inflammation and oxidative stress. *J. Am. Heart Assoc.* 2, 8–11. doi:10.1161/JAHA.113.000539.
- Magnusson, M. K., and Mosher, D. F. (1998). Fibronectin : Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1363–1370. doi:10.1161/01.ATV.18.9.1363.
- Maldonado, I. R. S. C., Ferreira, M. L., Camargos, E. R. S., Chiari, E., and Machado, C. R. S. (2004). Skeletal muscle regeneration and Trypanosoma cruzi-induced myositis in rats. *Histol. Histopathol.* 19, 85–93.
- Mao, Y., and Schwarzbauer, J. E. (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 24, 389–99. doi:10.1016/j.matbio.2005.06.008.
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., and Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115, 1109–1123. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296.
- Marin-neto, J. A., Jr, A. R., Jr, A. A., Mattos, A. C., and Rassi, A. (2009). The BENEFIT trial : testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 319–324.
- Martin, D. L., Postan, M., Lucas, P., Gress, R., and Tarleton, R. L. (2007). TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental Trypanosoma cruzi infection. *Eur. J. Immunol.* 37, 2764–71. doi:10.1002/eji.200737033.
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–30. doi:10.1038/nrm3434.
- Maurer, L. M., Ma, W., and Mosher, D. F. (2016). Dynamic structure of plasma fibronectin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 51, 213–227.

doi:10.1080/10409238.2016.1184224.

- Maya, J. D., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., López-muñoz, R., and Morello, A. (2010). Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. 323–331.
- Meeks, B., Melacini, P. R., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., et al. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–1306. doi:10.1056/NEJMoa1507574.
- Meirelles, M. N. S. L., de Araújo-Jorge, T. C., Miranda, C. F., de Souza, W., Barbosa, H. S., and Meirelles MN, de Araujo-Jorge TC, Miranda CF, de Souza W, B. H. (1986). Interaction of Trypanosoma cruzi with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol.* 41, 198–206.
- Melo, T. G., Tucci, A. R., Nogueira, A. R., Meirelles, M. D. N. S. L., and Pereira, M. C. S. (2014). The involvement of FAK and Src in the invasion of cardiomyocytes by Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.* 139, 49–57. doi:10.1016/j.exppara.2014.02.008.
- Menezes Junior, A. da S., Lopes, C. C., Cavalcante, P. F., and Martins, E. (2018). Chronic Chagas Cardiomyopathy Patients and Resynchronization Therapy: a Survival Analysis. *Brazilian J. Cardiovasc. Surg.* 33, 82–88. doi:10.21470/1678-9741-2017-0134.
- Mienaltowski, M. J., and Birk, D. E. (2014). Structure, Physiology, and Biochemistry of Collagens. 802. doi:10.1007/978-94-007-7893-1.
- Ming, M., Ewen, M. E., Pereira, M. E. A., and Street, W. (1995). Trypanosome Invasion of Mammalian Cells Requires Activation of the TGF β Signaling Pathway. 82, 287–296.
- Molkentin, J. D., Bugg, D., Ghearing, N., Dorn, L. E., Kim, P., Sargent, M. A., et al. (2017). Fibroblast-specific genetic manipulation of p38 MAPK in vivo reveals its central regulatory role in fibrosis. *Circulation* 136, 549–561. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026238.
- Moncayo, Á., and Silveira, A. C. (2017). Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: epidemiology, surveillance, and health policies. *Am. Trypanos. Chagas Dis.*, 59–88. doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00004-6.
- Monteón VM, Furuzawa-Carballeda J, Alejandre-Aguilar R, Aranda-Fraustro A, Rosales-Encina JL, R. P., Monteón, V. M., Furuzawa-Carballeda, J., Alejandre-

- Aguilar, R., Aranda-Fraustro, A., Rosales-Encina, J. L., et al. (1996). American trypanosomosis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp. Parasitol.* 83, 267–2774.
- Moore-morris, T., Cattaneo, P., Puceat, M., Evans, S. M., Jolla, L., Jolla, L., et al. (2016). Origins of Cardiac Fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 91, 1–5. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.12.031.Origins.
- Moraes, A. V. de, Esteves-Filho, A., Barbero-Marcial, M., Belloti, G., Kalil, R., Bocchi, E. A., et al. (2004). In vivo detection of Trypanosoma cruzi antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am. Heart J.* 131, 301–307. doi:10.1016/s0002-8703(96)90358-0.
- Moretti, F. a, Chauhan, A. K., Iaconcig, A., Porro, F., Baralle, F. E., and Muro, A. F. (2007). A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J. Biol. Chem.* 282, 28057–62. doi:10.1074/jbc.M611315200.
- Morikawa, M., Derynck, R., and Miyazono, K. (2016). TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8. doi:10.1101/cshperspect.a021873.
- Morillo, C. A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., et al. (2017). Benzimidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 939–947. doi:10.1016/j.jacc.2016.12.023.
- Mott, G. A., Costales, J. a, and Burleigh, B. a (2011). A soluble factor from Trypanosoma cruzi inhibits transforming growth factor- β -induced MAP kinase activation and gene expression in dermal fibroblasts. *PLoS One* 6, e23482. doi:10.1371/journal.pone.0023482.
- Moustakas A, H. C., Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573–84. doi:10.1242/jcs.02554.
- Mouw, J. K., Ou, G., and Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771–785. doi:10.1038/nrm3902.
- Mu Y, Gudey SK, L. M. (2012). Non-SMAD signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347, 11–20.
- Mu, Y., Gudey, S. K., Landström, M., and Mu Y, Gudey SK, L. M. (2012). Non-SMAD signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347, 11–20. doi:10.1007/s00441-011-1201-y.
- Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J., and Sosa-Estani, S. (2018).

- Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease.* Taylor & Francis doi:10.1080/17512433.2018.1509704.
- Nakazato, H., Oku, H., Yamane, S., Tsuruta, Y., and Suzuki, R. (2002). A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α at the translational level. *Eur. J. Pharmacol.* 446, 177–185. doi:10.1016/S0014-2999(02)01758-2.
- Nogueira, P. M., Ribeiro, K., Silveira, A. C. O., Campos, J. H., Martins-Filho, O. A., Bela, S. R., et al. (2015). Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *J. Extracell. Vesicles* 4, 28734. doi:10.3402/jev.v4.28734.
- Nomura-Kitabayashi, A., Anderson, G. a, Sleep, G., Mena, J., Karabegovic, A., Karamath, S., et al. (2009). Endoglin is dispensable for angiogenesis, but required for endocardial cushion formation in the midgestation mouse embryo. *DEV Biol.* 335, 66–77. doi:10.1016/j.ydbio.2009.08.016.
- Nunes, M. C. P., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., et al. (2018). *Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association.* doi:10.1161/CIR.0000000000000599.
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. a, Encina, J. J., and Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 767–76. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.046.
- O'Donoghue, M. L., Glaser, R., Cavender, M. A., Aylward, P. E., Bonaca, M. P., Budaj, A., et al. (2016). Effect of losmapimod on cardiovascular outcomes in patients hospitalized with acute myocardial infarction: A randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 315, 1591–1599. doi:10.1001/jama.2016.3609.
- Oliveira, F. O. R. De, Alves, C. R., Calvet, C. M., Toma, L., Bouças, R. I., Nader, H. B., et al. (2008). *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. *Microb Pathog* 44, 329–338. doi:10.1016/j.micpath.2007.10.003.
- Ortí-Lucas, R. M., Parada-Barba, M. C., de la Rubia-Ortí, J. E., Carrillo-Ruiz, A., Beso-Delgado, M., and Boone, A. L. D. (2014). Impact of chagas disease in bolivian immigrants living in europe and the risk of stigmatization. *J. Parasitol. Res.* 2014, 514794. doi:10.1155/2014/514794.
- Page, C. (2013). Heparin and Related Drugs: Beyond Anticoagulant Activity. *ISRN Pharmacol.* 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/910743.
- Pascoe, S., Costa, M., Marks-Konczalik, J., McKie, E., Yang, S., and Scherbovsky, P.

- S. (2017). Biological effects of p38 MAPK inhibitor losmapimod does not translate to clinical benefits in COPD. *Respir. Med.* 130, 20–26. doi:10.1016/j.rmed.2017.07.002.
- Pecoul, B., Batista, C., Stobbaerts, E., Ribeiro, I., Vilasanjuan, R., Gascon, J., et al. (2016). The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004343. doi:10.1371/journal.pntd.0004343.
- Pereira, I. R., Vilar-pereira, G., Alice, A., and Lannes-vieira, J. (2014a). Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. 109, 289–298. doi:10.1590/0074-0276140033.
- Pereira, I. R., Vilar-Pereira, G., Moreira, O. C., Ramos, I. P., Gibaldi, D., Britto, C., et al. (2015). Pentoxifylline Reverses Chronic Experimental Chagasic Cardiomyopathy in Association with Repositioning of Abnormal CD8+ T-Cell Response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–23. doi:10.1371/journal.pntd.0003659.
- Pereira, I. R., Vilar-Pereira, G., Silva, A. A., Moreira, O. C., Britto, C., Sarmiento, E. D. M., et al. (2014b). Tumor Necrosis Factor Is a Therapeutic Target for Immunological Unbalance and Cardiac Abnormalities in Chronic Experimental Chagas' Heart Disease. *Mediators Inflamm.* 2014, 1–16. doi:10.1155/2014/798078.
- Pereira, M. C. de S., Costa, M., Chagas Filho, C., de Meirelles, M. D. N. S. L., and PEREIRA, Mirian C. S.; COSTA, M. L.; CHAGASFILHO, C.; MEIRELLES, M. N. S. L. (1993). Myofibrillar breakdown and Cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: immunological and ultrastructural study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 25, 559–569.
- Pereira, M. C. de S., Singer, R., and Meirelles, M. N. L. (2000). Ultrastructural Distribution of Poly (A)+ RNA During *Trypanosoma cruzi*- Cardiomyocyte Interaction in vitro: A Quantitative Analysis of the Total mRNA Content by in situ Hybridization. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 264–270.
- Pérez-Molina, J. A., and Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet* 391, 82–94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- Pinazo, M. J., Thomas, M. C., Bustamante, J., de Almeida, I. C., Lopez, M. C., and Gascon, J. (2015). Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: State of the art and future perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 422–432. doi:10.1590/0074-02760140435.
- Pinho, R. T., Vannier-Santos, M. A., Alves, C. R., Marino, A. P. M. P., Castello Branco,

- L. R. R., and Lannes-Vieira, J. (2002). Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. *Acta Trop.* 83, 103–115. doi:10.1016/S0001-706X(02)00062-1.
- Pomin, V. H., and Mulloy, B. (2018). Glycosaminoglycans and proteoglycans. *Pharmaceuticals* 11, 1–9. doi:10.3390/ph11010027.
- Poveda, C., Fresno, M., Gironès, N., Martins-Filho, O. A., Ramírez, J. D., Santi-Rocca, J., et al. (2014). Cytokine profiling in chagas disease: Towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (A benefit trial sub-study). *PLoS One* 9, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0091154.
- Prydz, K. (2015). Determinants of glycosaminoglycan (GAG) structure. *Biomolecules* 5, 2003–2022. doi:10.3390/biom5032003.
- Q, L., L, C., DM, S., and X., M. (2018). Effects of tetrandrine on proliferation and activation of cardiac fibroblasts. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 50, 331–334.
- Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., et al. (2017). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. *Cell. Microbiol.* 19. doi:10.1111/cmi.12672.
- Rassi, A., de Rezende, J. M., Luquetti, A. O., and Rassi, A. (2017a). *Clinical phases and forms of Chagas disease*. Second Edi. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00029-0.
- Rassi, A., and Marcondes de Rezende, J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 275–91. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002.
- Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Rassi, A., Marin-Neto, J. A., and Rassi, A. (2017b). Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 224–235. doi:10.1590/0074-02760160334.
- Reifenberg, K., Lehr, H. A., Torzewski, M., Steige, G., Wiese, E., Küpper, I., et al. (2007). Interferon- γ induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 171, 463–472. doi:10.2353/ajpath.2007.060906.
- Reis, M. M., Higuchi, M. de L., Benvenuti, L. A., Aiello, V. D., Gutierrez, P. S., Bellotti, G., et al. (1997). An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines

- and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83, 165–72.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–19. doi:10.1101/cshperspect.a004978.
- Rios, A., Ribeiro, M., Sousa, A., Pimentel, F., Hagström, L., Andrade, R., et al. (2018). Can sexual transmission support the enzootic cycle of *trypanosoma cruzi*? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, 3–8. doi:10.1590/0074-02760170025.
- Robertson, I. B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., and Rifkin, D. B. (2016). Latent TGF- β -binding proteins. 47, 44–53. doi:10.1016/j.matbio.2015.05.005.Latent.
- Rocha Rodrigues, D. B., dos Reis, M. A., Romano, A., Pereira, S. A. D. L., Teixeira, V. D. P. A., Tostes, S., et al. (2012). In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 361730. doi:10.1155/2012/361730.
- Rodríguez-barbero, A., Obreo, J., and Álvarez-muñoz, P. (2006). Endoglin Modulation of TGF- β 1-Induced Collagen Synthesis is Dependent on ERK1/2 MAPK Activation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 135–142.
- Rodríguez-Barbero, A., Obreo, J., Álvarez-Muñoz, P., Pandiella, A., Bernabeu, C., and Lopes-Novoa, J. M. (2006). Endoglin Modulation of TGF- β induced collagen synthesis is dependent on ERK1 / 2 MAPK Activation. *Cell. Physiol. Biochem.* 18, 135–142.
- Rose, B. A., Force, T., and Wang, Y. (2010). Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in the Heart: Angels Versus Demons in a Heart-Breaking Tale. *Physiol Rev* 90, 1–62. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Rosemary J. Akhurst and Akiko Hata (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 11, 790–811. doi:10.1038/nrd3810.Targeting.
- Russo, C., and Polosa, R. (2005). TNF- α as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clin. Sci.* 109, 135–142. doi:10.1042/CS20050038.
- Sabapathy, K. (2012). Role of the JNK Pathway in human diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 106, 145–169. doi:10.1016/B978-0-12-396456-4.00013-4.
- Salazar, B. L., Albéniz, R., Guedón, A., and Miqueo, G. (2006). Altered Fibrillar Collagen Metabolism in Hypertensive Heart Failure . Current Understanding and Future Prospects. 59, 1047–1057.

- Sales, P. A., Molina, I., Murta, S. M. F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., et al. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 1289–1303. doi:10.4269/ajtmh.16-0761.
- Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Rodríguez-Palomares, J., Sulleiro, E., Sao-Avilés, A., Roure, S., et al. (2016). Chagas cardiomyopathy: Usefulness of ekg and echocardiogram in a Non-Endemic country. *PLoS One* 11, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0157597.
- Sasaki, M., Kashima, M., Ito, T., Watanabe, A., Sano, M., Kagaya, M., et al. (2000). Effect of heparin and related glycosaminoglycan on PDGF-induced lung fibroblast proliferation, chemotactic response and matrix metalloproteinases activity.
- Schaefer, L., and Schaefer, R. M. (2010). Proteoglycans: From structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 339, 237–246. doi:10.1007/s00441-009-0821-y.
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., et al. (2009). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9, 241. doi:10.1038/nmeth.2019.Fiji.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004). Interferon gamma orchestrates : an overview of signals , mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252.Journal.
- Scott P Levick, and Goldspink, P. H. (2014). Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Hear. Fail Rev.* 19, 227–236. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4002.BONE.
- Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., et al. (2011a). Latent TGF- β structure and activation. *Nature* 474, 343–9. doi:10.1038/nature10152.
- Shi, Q., Liu, X., Bai, Y., Cui, C., Li, J., Li, Y., et al. (2011b). In vitro effects of pirfenidone on cardiac fibroblasts: Proliferation, myofibroblast differentiation, migration and cytokine secretion. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0028134.
- Shinde, A. V, and Frangogiannis, N. G. (2014). Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 74–82. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.015.
- Simões, M. V., Romano, M. M. D., Schmidt, A., Martins, K. S. M., and Marin-Neto, J. A. (2018a). Cardiomiopatia da Doença de Chagas. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 31,

- 173–189. doi:10.5935/2359-4802.20180011.
- Simões, M. V., Romano, M. M. D., Schmidt, A., Martins, K. S. M., and Marin-Neto, J. A. (2018b). Chagas Disease Cardiomyopathy. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 31, 173–189. doi:10.5935/2359-4802.20180011.
- Singh Purva, C. C. and S. J. E. (2010). Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 26, 397–419. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.Assembly.
- Soares, M. B. P., de Lima, R. S., Rocha, L. L., Vasconcelos, J. F., Rogatto, S. R., dos Santos, R. R., et al. (2010). Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* 202, 416–26. doi:10.1086/653481.
- Sobczak, A. I. S., Pitt, S. J., and Stewart, A. J. (2018). Glycosaminoglycan neutralization in coagulation control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 1258–1270. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311102.
- Stempin, C. C., Garrido, V. V., Dulgerian, L. R., and Cerbán, F. M. (2008). Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of *Trypanosoma cruzi* in macrophages. *Acta Trop.* 106, 119–27. doi:10.1016/j.actatropica.2008.02.004.
- Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasit. Vectors* 7, 317. doi:10.1186/1756-3305-7-317.
- Strauss, D. G., Cardoso, S., Lima, J. a C., Rochitte, C. E., and Wu, K. C. (2011). ECG scar quantification correlates with cardiac magnetic resonance scar size and prognostic factors in Chagas' disease. *Heart* 97, 357–361. doi:10.1136/hrt.2010.210047.
- Suman, S., Rachakonda, G., Mandape, S. N., Sakhare, S. S., Villalta, F., Pratapid, S., et al. (2018). Phospho-proteomic analysis of primary human colon epithelial cells during the early *Trypanosoma cruzi* infection phase. doi:10.1371/journal.pntd.0006792.
- Sun, M., Chen, M., Dawood, F., Zurawska, U., Li, J. Y., Parker, T., et al. (2007). Tumor necrosis factor-alpha mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation* 115, 1398–407. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.643585.
- Sun, Y., Zhang, Y., and Chi, P. (2018). Pirfenidone suppresses TGF- β 1-induced human intestinal fibroblasts activities by regulating proliferation and apoptosis via the inhibition of the Smad and PI3K/AKT signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 18,

- 3907–3913. doi:10.3892/mmr.2018.9423.
- Tallquist, M. D., and Molkenin, J. D. (2017). Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* 14, 484–491. doi:10.1038/nrcardio.2017.57.
- Tarleton, R. L. (2016). Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored. *Trends Mol. Med.* 22, 835–838. doi:10.1016/j.molmed.2016.07.008.
- Tassi, E. M., Continentino, M. A., Nascimento, E. M. Do, Pereira, B. D. B., and Pedrosa, R. C. (2014). Relationship between Fibrosis and Ventricular Arrhythmias in Chagas Heart Disease Without Ventricular Dysfunction. *Arq. Bras. Cardiol.*, 456–464. doi:10.5935/abc.20140052.
- Tau, G., and Rothman, P. (1999). Biologic functions of the IFN- γ receptors. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 54, 1233–1251. doi:10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x.
- Taylor, K. R., and Gallo, R. L. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 20, 9–22. doi:10.1096/fj.05-4682rev.
- Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., and Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 592–630. doi:10.1128/CMR.00063-10.
- Theiss, A. L., Simmons, J. G., Jobin, C., and Lund, P. K. (2005). Tumor necrosis factor (TNF) α increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J. Biol. Chem.* 280, 36099–36109. doi:10.1074/jbc.M505291200.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., and Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 4–27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
- Torres, O. A., Calzada, J. E., Beraún, Y., Morillo, C. A., González, A., González, C. I., et al. (2010). Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect. Genet. Evol.* 10, 682–685. doi:10.1016/j.meegid.2010.03.009.
- Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E., and Burns, C. (2017). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ. Res.* 118, 1021–1040. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.Cardiac.
- Turner, N. A. (2016). Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 94, 189–200. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.002.

- Udoko, A. N., Johnson, C. A., Dykan, A., Rachakonda, G., Villalta, F., Mandape, S. N., et al. (2016). Early Regulation of Profibrotic Genes in Primary Human Cardiac Myocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–23. doi:10.1371/journal.pntd.0003747.
- Valledor, A. F., Sanchez-Tillo, E., Arpa, L., Park, J. M., Caelles, C., Lloberas, J., et al. (2014). Selective Roles of MAPKs during the Macrophage Response to IFN- γ . *J. Immunol.* 180, 4523–4529. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4523.
- Van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R. E., and Libert, C. (2011). Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 311–319. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.09.004.
- Varfolomeev, E., and Vucic, D. (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine* 101, 26–32. doi:10.1016/j.cyto.2016.08.035.
- Vilar-Pereira, G., Resende Pereira, I., De Souza Ruivo, L. A., Cruz Moreira, O., Da Silva, A. A., Britto, C., et al. (2016). Combination chemotherapy with suboptimal doses of benznidazole and pentoxifylline sustains partial reversion of experimental Chagas' heart disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4297–4309. doi:10.1128/AAC.02123-15.
- Waghbi, M. C., Coutinho-silva, R., Feige, J., Higuchi, M. D. L., Becker, D., Burnstock, G., et al. (2009). Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor- β treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1083–1090. doi:S0074-02762009000800004 [pii].
- Waghbi, M. C., Coutinho, C. M. L. M., Soeiro, M. N. C., Pereira, M. C. S., Feige, J., Keramidas, M., et al. (2002). Increased *Trypanosoma cruzi* Invasion and Heart Fibrosis Associated with High Transforming Growth Factor- β Levels in Mice Deficient in $\alpha 2$ -Macroglobulin. *Infect. Immun.* 70, 5115–5123. doi:10.1128/IAI.70.9.5115.
- Waghbi, M. C., Keramidas, M., Bailly, S., Degraeve, W., Mendonça-Lima, L., Soeiro, M. D. N. C., et al. (2005). Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am. J. Pathol.* 167, 993–1003.
- Waghbi, M. C., Keramidas, M., Calvet, C. M., Meuser, M., de Nazaré C Soeiro, M., Mendonça-Lima, L., et al. (2007). SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2905–10. doi:10.1128/AAC.00022-07.

- Waghabi, M. C., Keramidas, M., Feige, J.-J., Araujo-Jorge, T. C., and Bailly, S. (2005). Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* 7, 511–7. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00481.x.
- Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC, B. S. (2009). Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4694–701.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45–65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189.
- Wallach, D. (2016). The cybernetics of TNF: Old views and newer ones. *Semin. Cell Dev. Biol.* 50, 105–114. doi:10.1016/j.semcdb.2015.10.014.
- Wang, Y., Wu, Y., Chen, J., Zhao, S., and Li, H. (2013). Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 Inflammasome formation. *Cardiol.* 126, 1–11. doi:10.1159/000351179.
- Ward, L. S., Guariento, M. E., and Fernandes, G. A. (1999). Serum cytokines in chronic Chagas' disease Citocinas séricas na forma crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 285–289.
- Weiss, A., and Attisano, L. (2013). The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 47–63. doi:10.1002/wdev.86.
- WHO (2012). Chagas Disease- factsheet. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 519–522.
- Wu, W., Muchir, A., Shan, J., Bonne, G., and Worman, H. J. (2011). Mitogen-activated protein kinase inhibitors improve heart function and prevent fibrosis in cardiomyopathy caused by mutation in Lamin A/C gene. *Circulation* 123, 53–61. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970673.
- Wu, W., Shan, J., Bonne, G., Worman, H. J., and Muchir, A. (2010). Pharmacological inhibition of c-Jun N-terminal kinase signaling prevents cardiomyopathy caused by mutation in LMNA gene. *Biochim Biophys Acta* 1802, 632–638. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Wyler DJ, Libby P, Prakash S, Prioli RP, P. M. (1987). Elaboration by mammalian mesenchymal cells infected with *Trypanosoma cruzi* of a fibroblast-stimulating factor that may contribute to chagasic cardiomyopathy. *Infect Immun.* 55, 3188–3191.
- Yan, X., Liu, Z., and Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- β signaling by Smad7
- Overview of TGF- β Signaling Pathways. 263–272.

doi:10.1093/abbs/gmp018.Review.

- Yibin, W. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinases in Heart Development and Diseases. *Circulation* 116, 1–21. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589.
- Yokota, Tomohiro and Wang, Y. (2016). p38 MAP Kinases in Heart. *Gene* 575, 369–376. doi:10.1016/j.gene.2015.09.030.
- Yu, X. H., Zhang, J., Zheng, X. L., Yang, Y. H., and Tang, C. K. (2015). Interferon- γ in foam cell formation and progression of atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* 441, 33–43. doi:10.1016/j.cca.2014.12.007.
- Yue, B. (2014). Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. *J Glaucoma* 0000000000, 20–23. doi:10.1097/IJG.0000000000000108.
- Zhang, L., and Tarleton, R. L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180, 480–486.
- Zhang, Y. E. (2010). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* 19, 128–139. doi:10.1038/cr.2008.328.Non-Smad.
- Zhao, B., and Chen, Y.-G. (2014). Regulation of TGF- β Signal Transduction. *Scientifica (Cairo)*. 2014, 874065. doi:10.1155/2014/874065.
- Zuo, G., Ren, X., Qian, X., Ye, P., Luo, J., Gao, X., et al. (2019). Inhibition of JNK and p38 MAPK-mediated inflammation and apoptosis by ivabradine improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J. Cell. Physiol.* 234, 1925–1936. doi:10.1002/jcp.27070.

Anexos

8 ANEXOS

8/18/2019

Gmail - [IJMS] Manuscript ID: ijms-568700 - Accepted for Publication



Tatiana Araújo <tatibio86@gmail.com>

[IJMS] Manuscript ID: ijms-568700 - Accepted for Publication

1 mensagem

Maria Li <maria.li@mdpi.com>

7 de agosto de 2019 05:10

Responder a: Maria Li <maria.li@mdpi.com>, IJMS Editorial Office <ijms@mdpi.com>

Para: Claudia Calvet <claudiacalvet@gmail.com>

Cc: Tatiana Silva <tatibio86@gmail.com>, Luis Felipe Ferreira <lfdcferrera@gmail.com>, Mirian Pereira <mirian@ioc.fiocruz.br>, IJMS Editorial Office <ijms@mdpi.com>, Maria Li <maria.li@mdpi.com>

Dear Dr. Calvet,

We are pleased to inform you that the following paper has been officially accepted for publication:

Manuscript ID: ijms-568700

Type of manuscript: Article

Title: Differential role of TGF- β in extracellular matrix regulation during

Trypanosoma cruzi-host cell interaction

Authors: Tatiana Silva, Luis Felipe Ferreira, Mirian Pereira, Claudia Calvet *

Received: 24 July 2019

E-mails: tatibio86@gmail.com, lfdcferrera@gmail.com, mirian@ioc.fiocruz.br, claudiacalvet@gmail.com

Submitted to section: Biochemistry,

<https://www.mdpi.com/journal/ijms/sections/biochemistry>

TGF-Beta Super Family Signaling 2.0

https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/TGF_Beta_2

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/5bb1f8ea10df482c33e5ab7bc7845f95

We will now make the final preparations for publication, then return the manuscript to you for your approval.

If, however, extensive English edits are required to your manuscript, we will need to return the paper requesting improvements throughout.

We encourage you to set up your profile at SciProfiles.com, MDPI's researcher network platform. Articles you publish with MDPI will be linked to your SciProfiles page, where colleagues and peers will be able to see all of your publications, citations, as well as your other academic contributions.

We also invite you to contribute to Encyclopedia (<https://encyclopedia.pub>), a scholarly platform providing accurate information about the latest research results. You can adapt parts of your paper to provide valuable reference information for others in the field.

Kind regards,

Ms. Maria Li

Section Managing Editor

E-Mail: maria.li@mdpi.com

MDPI

IJMS Editorial Office

St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel,

Postfach, CH-4020 Basel,

Switzerland

E-Mail: ijms@mdpi.com

<http://www.mdpi.com/journal/ijms/>

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=f5807a8a1c&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1641194913694769167&simpl=msg-f%3A164119491369...> 1/1

Differential Role of TGF- β in Extracellular Matrix Regulation During *Trypanosoma cruzi*-Host Cell Interaction

Tatiana Araújo Silva, Luis Felipe de Carvalho Ferreira, Mirian Claudia de Souza Pereira and Claudia Magalhães Calvet *

Cellular Ultrastructure Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21040-360, RJ, Brazil

* Corresponding author: cmcalvet@ioc.fiocruz.br or claudiacalvet@gmail.com

Received: 24 July 2019; Accepted: 7 August 2019; Published: X August 2019

Abstract: Transforming growth factor beta (TGF- β) is a determinant for inflammation and fibrosis in cardiac and skeletal muscle in Chagas disease. To determine its regulatory mechanisms, we investigated the response of *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes (CM), cardiac fibroblasts (CF), and L6E9 skeletal myoblasts to TGF- β . Cultures of CM, CF, and L6E9 were infected with *T. cruzi* (Y strain) and treated with TGF- β (1–10 ng/mL, 1 h or 48 h). Fibronectin (FN) distribution was analyzed by immunofluorescence and *Western blot* (WB). Phosphorylated SMAD2 (PS2), phospho-p38 (p-p38), and phospho-c-Jun (p-c-Jun) signaling were evaluated by WB. CF and L6E9 showed an increase in FN from 1 ng/mL of TGF- β , while CM displayed FN modulation only after 10 ng/mL treatment. CF and L6E9 showed higher PS2 levels than CM, while p38 was less stimulated in CF than CM and L6E9. *T. cruzi* infection resulted in localized FN disorganization in CF and L6E9. *T. cruzi* induced an increase in FN in CF cultures, mainly in uninfected cells. Infected CF cultures treated with TGF- β showed a reduction in PS2 and an increase in p-p38 and p-c-Jun levels. Our data suggest that p38 and c-Jun pathways may be participating in the fibrosis regulatory process mediated by TGF- β after *T. cruzi* infection.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; TGF- β ; heart fibrosis; extracellular matrix; signaling pathways; SMAD2; p38 MAPK; c-Jun

1. Introduction

Chagas disease (CD), caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), currently affects 6–8 million people worldwide (Moncayo and Silveira, 2017). The disease scenario has shifted to a global threat due to migration of infected individuals to non-endemic areas (Nunes et al., 2013; WHO, 2012). CD presents in acute and chronic clinical forms. While the former is typically inapparent or presents only mild manifestations and is commonly ignored due to non-specific signs, the latter, although asymptomatic in approximately 70% of cases, may progress to severe damage. Muscular pain and weakness are also frequent symptoms in Chagasic patients (Maldonado et al., 2004). Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), estimated to be present in 20–30% of infected individuals (Menezes Junior et al., 2018; Rassi and Marcondes de Rezende, 2012), is the most severe manifestation in CD with a high morbidity and mortality and has significant economic and social impacts in Latin America (Benziger et al., 2017).

In CD, cardiomyopathy is characterized by an intense myocarditis related to the presence of inflammatory cells reacting to the parasite, resulting in cardiac tissue damage and fibrosis (Rassi et al., 2017b). Skeletal muscle tissue also presents parasitism and inflammation in myofibers (Maldonado et al., 2004; Monteón VM, Furuzawa-Carballeda J, Alejandre-Aguilar R, Aranda-Fraustro A, Rosales-Encina JL et al., 1996). Cardiac fibroblasts are the main actors in fibrotic processes acting on the remodeling of the extracellular matrix (ECM) in the myocardium (Fujiu and Nagai, 2014). External stimuli, including chemokines and cytokines, regulate fibroblast proliferation and ECM synthesis and secretion (Deb and Ubil, 2014).

Transforming growth factor β (TGF- β), a cytokine involved in various biological and physiological processes (Morikawa et al., 2016), has been highlighted as a regulator of the fibrotic process in the pathogenesis of Chagas disease (Araújo-Jorge et al., 2002b; Araújo-Jorge TC, Waghabi MC, Bailly S et al., 2012). The signaling pathway of the TGF- β family occurs through three receptors, type I (TGF β I), II (TGF β II), and III (TGF β III). Type III receptors, also called betaglycans or endoglycans, act as co-receptors, presenting the cytokine to its specific receptors. The binding of active TGF- β to the TGF β II propagates the signal via downstream effectors with the phosphorylation of proteins from the TGF- β classical (canonical) signaling pathway and SMAD proteins (SMADS 1–7) (Zhao and Chen, 2014). In addition to the classical signaling pathway, TGF- β also modulates non-canonical signaling pathways, such as p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), extracellular signal regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), nuclear factor- κ B (NF- κ B), and small GTPases (Akhurst and Hata, 2012; Massagué, 2012). JNK and p38 MAPK are the alternative routes of TGF- β signaling best characterized. The JNK and p38 MAPK pathways are activated by MAP kinases (MKKs) MKK4 and MKK 3/6, respectively. TGF- β also triggers the activation of TGF- β 1-associated kinases (TAK1) through the catalytic activation of factor-associated tumor necrosis factor receptor 6 (TRAF6), crucial processes for the activation of JNK and p38 MAPK (Mu et al., 2012).

TGF- β plays an important role in *T. cruzi* biology. This cytokine is involved in the host cell invasion process, since *T. cruzi* requires functional TGF- β receptors and activation of its classical signaling pathway to invade the host cell (Hall and Pereira, 2000; Ming et al., 1995; Waghabi et al., 2007b). Also, amastigote forms capture TGF- β from the host cell, using it for differentiation into the trypomastigote form, which allows the completion of the parasite intracellular cycle (Waghabi et al., 2005c). Experimental evidence also shows that the parasite induces the synthesis of TGF- β in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts (Waghabi et al., 2009), which may influence the survival of the parasite. Trypomastigote and amastigote forms are able to directly activate latent TGF- β through its main cysteine peptidase (CP), cruzipain, (Ferrão et al., 2015; Waghabi et al., 2005a), which may contribute to the invasion process and the genesis of Chagas disease.

In addition, the host immune response is controlled by TGF- β during *T. cruzi* infection (Martin et al., 2007; Rocha Rodrigues et al., 2012; Waghabi et al., 2002). Elevated TGF- β levels are associated with intense myocardial fibrosis detected in *T. cruzi*-infected α 2-macrobulin knockout mice (Waghabi et al., 2002) and in patients with CCC (Araújo-Jorge et al., 2002b). TGF- β receptor expression is increased in *T. cruzi*-infected mouse hearts in association with increased collagen I and fibronectin expression in myocardium (Ferreira et al., 2016b). Recent reports describe that TGF- β inhibitors reduce infection and prevent cardiac damage and fibrosis during experimental *T. cruzi* infection (Bogoyevitch et al., 2004; Calvet et al., 2009; de Oliveira et al., 2012; Ferrão et al., 2018; Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidias M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC et al., 2009). Taken together, these evidences show a key role of TGF- β in *T. cruzi* infection and in Chagas disease cardiomyopathy.

Besides the known enhancement of ECM during fibrosis process in vivo, our group demonstrated that cardiomyocytes highly infected with *T. cruzi* (72 and 96 h of infection) in vitro present low fibronectin expression, while adjacent non-infected cells show an intense network of extracellular matrix component similar to the control (Calvet et al., 2004), even after treatment with TGF- β (Calvet et al., 2009). Although TGF- β treatment is able to trigger the increase of ECM expression in uninfected cardiomyocytes, the effect is dose dependent, being observed only after the treatment with high concentrations of TGF- β (>10 ng/mL) (Calvet et al., 2009).

Given that cardiac fibroblasts, the main cell type responsible for ECM synthesis in the myocardium, are the effector cells in the cardiac fibrosis process, (Leask, 2007), and that cell lines originated from skeletal muscle (skeletal myoblasts L6E9) respond to TGF- β in picomolar concentrations (Ignatz RA, 1987), we evaluated the expression of extracellular matrix components in uninfected and *T. cruzi*-infected cardiac fibroblasts and skeletal muscle cells (L6E9) after treatment with different concentrations of TGF- β and analyzed the underlying signaling mechanisms of these processes.

2. Results

2.1. Modulation of Fibronectin Spatial Distribution in Different Cell Types after TGF- β Stimulation

In an attempt to understand the mechanisms underlying cardiac fibrosis evidenced in the pathogenesis of Chagas disease, we evaluated the modulation of extracellular matrix components in cardiomyocytes (CM), cardiac fibroblasts (CFs), and L6E9 skeletal myoblasts stimulated with TGF- β , an important mediator of the fibrosis process. First, the distribution of fibronectin (FN) fibrils in the ECM of these cell types was analyzed in response to stimulation of TGF- β (1–10 ng/mL) for 48 h by indirect immunofluorescence. Purified CF cultures were achieved after the fifth culture passage of CM cultures, as determined by the absence of *Western blot* (WB) reactivity for desmin, intermediate filament proteins specifically expressed in CM (Supplemental Material, Figure S1). Confocal microscopy revealed the arrangement of FN fibrils on the CM surface, evidencing a thickening at the FN network dependent on cytokine stimulus concentration (Figure 1). The profile of FN distribution in the ECM remained similar to the untreated cells (Figure 1A) even after stimulation with TGF- β at 1 ng/mL (Figure 1B). However, CMs stimulated with 10 ng/mL of TGF- β (Figure 1C) displayed an increase in the thickness of FN fibrils in the ECM, as previously reported (Calvet et al., 2009). Measurement of FN staining area with Image J software (Figure 1J) showed an increase from an average of 10% of total area (untreated CM, Figure 1A) and 10.5% (CM + 1 ng/mL TGF- β , Figure 1B) to 24% of total area after treatment with 10 ng/mL TGF- β , a 2.3-fold increase in FN fibril thickness. In contrast, an increase in FN fibrils was revealed at the surface of L6E9 skeletal myoblasts (Figure 1E) and CFs (Figure 1H) after stimulation with 1 ng/mL of TGF- β , a dose 10 times lower than that required to stimulate CMs. The enhancement of FN deposit occurred in a dose-dependent manner, showing thicker FN fibrillar network after treatment of L6E9 skeletal myoblasts (Figure 1F) and CF (Figure 1I) with 10 ng/mL of the cytokine. Quantification of FN fibril thickness by image processing with Image J software (Figure 1J) showed an increase of 3.2-fold of FN staining area after addition of 1 ng/mL TGF- β and 3.5-fold after 10 ng/mL for L6E9 skeletal myoblasts. In a similar fashion, CFs displayed 2.8-fold increase of FN fibrils after treatment with 1 ng/mL of TGF- β and 2.3-fold increase after addition of 10 ng/mL of the cytokine (Figure 1J).

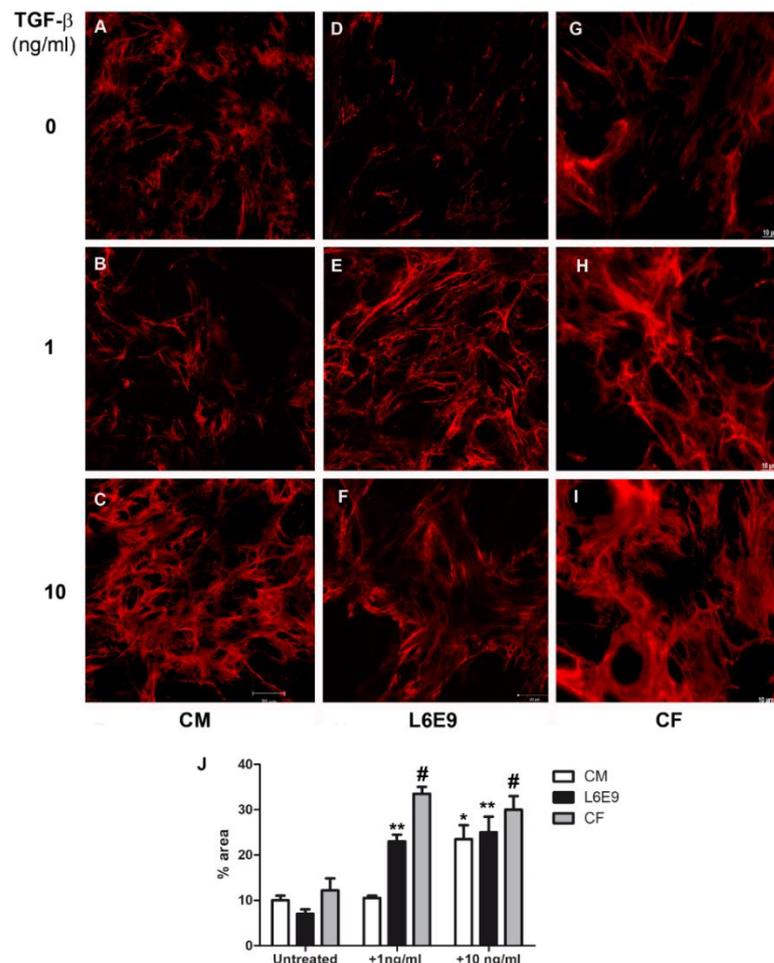


Figure 1. Transforming growth factor beta (TGF- β) differentially modulates fibronectin (FN) in cardiomyocytes, skeletal myoblasts L6E9, and cardiac fibroblasts. (A) Normal cardiomyocytes showed FN fibrils on surface. The addition of 1 ng/mL of TGF- β (B) did not alter the FN expression in normal cardiomyocytes. Only 10 ng/mL of TGF- β induced the increase of FN expression (C). In contrast, L6E9 skeletal myoblasts (E) and cardiac fibroblasts (H) presented the FN matrix stimulation after treatment with 1 ng/mL TGF- β when compared to untreated cultures (D and G). The FN increase was still detected in these two cell types with addition of 10 ng/mL (F and I) of TGF- β . (J) FN staining area was measured with Image J software, showing the thickening of FN fibrils after TGF- β treatment. * $p \leq 0.05$ compared to untreated cardiomyocytes (CM); ** $p \leq 0.05$ compared to untreated L6E9; # $p \leq 0.05$ compared to untreated cardiac fibroblasts (CF). Bar = 20 μm .

2.2. Signaling Pathways Triggered by TGF- β Stimulation

The discrepancy in response to TGF- β stimulation led us to investigate whether the distinct modulation of FN profile between CFs, L6E9 skeletal myoblasts, and CMs could be related to different signaling pathways triggered in the ECM regulation process. Thus, the classic and the alternative TGF- β signaling pathways were evaluated in all cell types after cytokine treatment, using CM cultures as reference. Comparing the baseline response without TGF- β stimulus, L6E9 SMAD2 phosphorylation (PS2) was 5-fold higher than CM, while CF displayed 1.8-fold the PS2 levels of CM (Figure 2A). Analysis of the SMAD pathway revealed that, following stimulation of L6E9 skeletal myoblasts with 1 and 10 ng/mL of TGF- β , respectively, 2.1- and 2.9-fold increases in levels of PS2 in L6E9 skeletal myoblasts were observed compared to untreated L6E9 cultures (Figure 2A). The kinetics of TGF- β treatment of CFs revealed a 40% increase in PS2 levels after stimulation with 1 ng/mL TGF- β , while with 10 ng/mL stimulation, a maximum level of 69% increase was attained (Figure 2A). Interestingly, L6E9 skeletal myoblasts were more susceptible to cytokine stimulation, presenting levels of PS2 10- to 13-fold higher than CM and 4-fold higher than CFs at the TGF- β concentrations analyzed. CF also presented more PS2 activation than CM, achieving increases of 2.5 and 2.7-fold above CM cultures when stimulated with 1 ng/mL and 10 ng/mL of TGF- β , respectively (Figure 2A). CMs exhibited increases in PS2 level only after high doses of TGF- β (10 ng/mL) (Figure 2A).

In parallel, we also evaluated the non-canonical p38 MAPK phosphorylation (phospho-p38 MAPK, phospho-p38) pathway in CFs, CMs, and L6E9 skeletal myoblasts after 1 h treatment with TGF- β (1–10 ng/mL). L6E9 skeletal myoblasts also showed P-p38 levels 80% higher than CM and 3.7-fold higher than CF at the baseline. L6E9 also showed increased sensitivity to TGF- β compared to CMs and CFs, reaching 2- and 4.7-fold increases in CM and CF levels, respectively, after TGF- β treatment (Figure 2B). An increase in phospho-p38 MAPK levels was observed in CF cultures stimulated with TGF- β , reaching a maximum of 45% increase in concentration at 10 ng/mL (Figure 2B). In contrast, a 37% p38 MAPK activation was noticed in CMs stimulated only with 10 ng/mL of TGF- β . In all concentrations of TGF- β (1–10 ng/mL), the phospho-p38 MAPK levels in CFs were significantly lower than in CMs and L6E9 (Figure 2B). The addition of 1 ng/mL of TGF- β to L6E9 skeletal myoblasts resulted in a 1.2-fold increase of phospho-p38 MAPK, which remained constant after treatment with higher doses of TGF- β (Figure 2B). In contrast, even though the responses of L6E9 and CMs to the cytokine stimulus were similar, with a rise in the range of 20–35%, TGF- β -treated CMs did not reach levels of phospho-p38 MAPK comparable to the profile of stimulated L6E9 skeletal myoblasts, even after high doses of cytokine treatment.

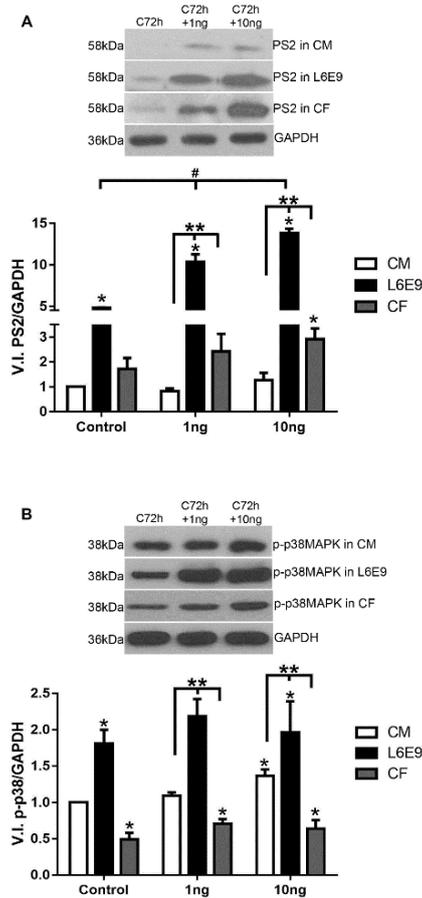


Figure 2. Phosphorylated SMAD2 and p38 MAPK detection in normal cultures. **(A)** Comparison of SMAD2 phosphorylation (PS2) detection of CM, L6E9 skeletal myoblasts, and CF treated with TGF- β (1–10 ng/mL) per 1 h. PS2 basal levels in L6E9 skeletal myoblasts and CF were significantly greater than CM. After the addition of TGF- β , PS2 remained significantly higher in L6E9 and CF relative to CM. L6E9 skeletal myoblasts responded to TGF- β stimulus in a dose dependent manner. CF showed a slight level of PS2 increase. * $p \leq 0.05$ compared to CM; ** $p \leq 0.05$ compared with CM in a different concentration; # $p \leq 0.05$ compared with L6E9 control. $N = 3$; **(B)** Comparison of phospho-p38 MAPK detection of CM, L6E9 skeletal myoblasts, and CF treated with TGF- β (1–10 ng/mL) per 1 h. L6E9 skeletal myoblasts presented a high level of p38 MAPK phosphorylation when compared with CM. When CM was compared with CF, a higher p38 MAPK phosphorylation after stimulation with TGF- β (1–10 ng/mL) was observed. * $p \leq 0.05$ compared to CM and ** $p \leq 0.05$ compared with CM in a different concentration. $N = 3$.

2.3. Differential Fibronectin Expression Induced by *T. cruzi* Infection and TGF- β Stimulation

With the knowledge of the differential modulation in FN expression and the distinct activation of TGF- β -dependent signaling pathways (PS2 and p-p38) in the different cell types, we next sought to evaluate the response of these cells to *T. cruzi* infection. Thus, we evaluated the levels of FN expression in CFs and L6E9 skeletal myoblasts late in *T. cruzi* infection (72 h). Initially, the FN expression of CFs and L6E9 skeletal myoblasts cultures were analyzed after 48 h treatment with TGF- β (1–10 ng/mL) by *Western blot*. Our results showed increased FN expression in both cell cultures at all TGF- β concentrations analyzed, but CFs were more responsive to cytokine stimulation (Figure 3). L6E9 skeletal myoblasts showed a dose-dependent response with significant increases in FN expression ranging from 3- to 5.5-fold at different concentrations of TGF- β (1 to 10 ng/mL) (Figure 3A). The highest FN increase was observed in CFs, with 6.9-fold increase at 1 ng/mL and 9.4-fold increase at 10 ng/mL, while L6E9 skeletal myoblasts reached a maximum of 5.5-fold enhancement at 10 ng/mL (Figure 3).

Next, we analyzed the expression of FN in L6E9 and CFs infected by *T. cruzi* (72 h). Interestingly, *T. cruzi* infection induced a differential response on FN expression in L6E9 skeletal myoblast and CF cultures (Figure 3). Infected L6E9 skeletal myoblasts showed a significant 82% reduction in FN

expression, while CFs demonstrated a 5-fold up-regulation in the expression of this ECM component (Figure 3). Although cytokine treatment stimulated a significant increase in FN expression in *T. cruzi*-infected L6E9 skeletal myoblasts, as compared to non-stimulated infected cells, FN expression levels were significantly down-regulated in comparison to stimulated control cells (Figure 3A). Significant reductions of 67% and 45% in FN expression were demonstrated in *T. cruzi*-infected L6E9 stimulated with 1 and 10 ng/mL TGF- β , respectively, compared to uninfected cultures. In contrast, *T. cruzi*-infected and stimulated CF cultures were not responsive to TGF- β stimulation, even at high concentrations of the cytokine (10 ng/mL), maintaining FN levels similar to control (Figure 3B). In CF cultures with a high degree of infection, even treated with TGF- β , reductions of 38% (1 ng/mL) and 48% (10 ng/mL) in FN expression were observed when compared to their normal treated pairs (Figure 3B). Pre-treatment of CF cultures with signaling inhibitors for 1 h (p38- SB203580, 10 μ M; ALK5- SB431542, 10 μ M) before the addition of TGF- β prevented the FN stimulation, resulting in FN levels similar to untreated and uninfected controls (Figure 3B). In addition, the treatment of control and *T. cruzi* infected cultures with ALK 5 inhibitor (SB431542) prevented the FN stimulation induced by *T. cruzi*, suggesting that TGF- β triggered by parasite infection modulates FN expression (Supplemental Material, Figure S2).

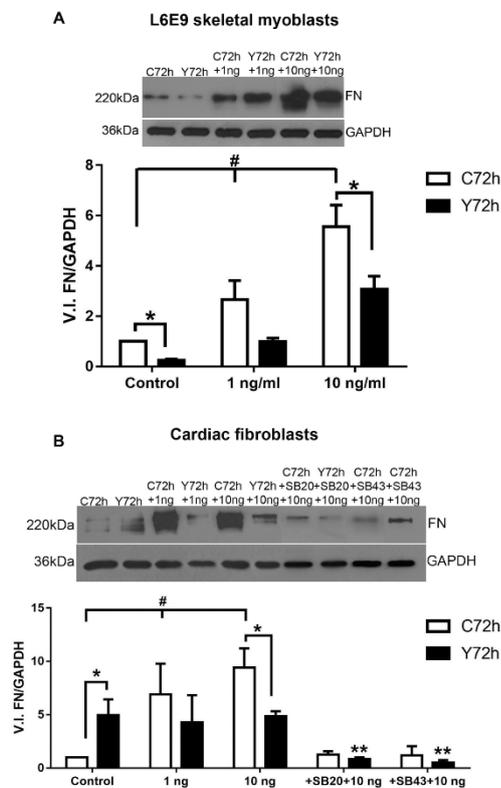


Figure 3. Fibronectin expression in L6E9 skeletal myoblasts and cardiac fibroblasts treated with TGF- β . (A) In normal cultures, treatment with 1 ng/mL TGF- β for 48 h triggered the increase of FN expression in L6E9 skeletal myoblasts in a dose-dependent manner after the addition of 1 and 10 ng/mL TGF- β . In L6E9 skeletal myoblasts infected with *T. cruzi* (72 h) and treated with TGF- β (1 and 10 ng/mL) an increase of FN expression was observed when compared with the infected and untreated cultures, but there was a reduction in the FN expression when compared with the uninfected cultures, even after treatment with TGF- β (1 and 10 ng/mL). * $p \leq 0.05$ compared to uninfected pairs; # $p \leq 0.05$ compared to untreated control and uninfected culture; $N = 4$. (B) Normal CF was treated with TGF- β (1 and 10 ng/mL) and showed an increase of FN expression according to the dose administered. In CF infected and untreated, there was an increase in the FN expression when compared with their normal counterparts. In CF infected and treated with TGF- β (1 and 10 ng/mL), a reduction of FN expression was observed when compared with their treated pairs. Pre-treatment of the culture with p38 (SB203580) and SMAD2 (SB431543) inhibitors prevented FN stimulation by TGF- β . White bars correspond to control, uninfected cultures (C72h), while

black bars depict levels of *T. cruzi* (Y strain) infected cultures (Y72h). * $p \leq 0.05$ compared to uninfected pairs; # $p \leq 0.05$ compared with control uninfected and untreated and ** $p \leq 0.05$ compared to TGF- β treated controls (10 ng/mL). $N = 3$.

2.4. Regulation of Fibronectin Fibrillar Network Assembly by *T. cruzi* Infection

The FN distribution in the extracellular matrix of L6E9 skeletal myoblasts and CF infected with *T. cruzi* and treated with TGF- β per 48 h was evaluated by indirect immunofluorescence. *T. cruzi* infection resulted in a reduction in general FN expression in L6E9 skeletal myoblasts (Figure 4B,C,E,F,H,I), while uninfected controls displayed widespread distribution of FN fibrils (Figure 4A,D,G). On the other hand, CF displayed a general intensification of the FN staining, which was localized in the uninfected cells of the cultures, when compared to controls (Figure 5A,D,G) with less or no FN fibrils distributed over highly infected cells (Figure 5B,C,E,F,H,I). Highly infected L6E9 skeletal myoblasts (Figure 4E,F,H,I) and CF (Figure 5E,F,H,I) cultures treated with TGF- β (1 and 10 ng/mL) showed a general increase in FN fibrils in the culture compared with the untreated controls (Figures 4A–C and 5A–C). However, the FN increase was localized in adjacent non-infected cells, while highly infected cells displayed a reduction in FN distribution, even after addition of high doses of TGF- β (1–10 ng/mL (Figures 4E,F,H,I and 5E,F,H,I) compared to untreated controls. In both cell types, the remaining FN expression was redistributed, being seen along the borders of the infected cells instead of as the widespread fibrils observed in uninfected controls (Figures 4 and 5). Measurement of FN staining area through image processing with Image J (Figures 4J and 5J) confirmed these observations. L6E9 showed a decrease of 29% on FN fibrils after *T. cruzi* infection, while CF increased 1.5-fold from control in infected cultures. With addition of TGF- β , the area occupied by FN increased 3.2-fold (1 ng/mL) and 3.5-fold (10 ng/mL) for L6E9 (Figure 4J), while CF cultures increased 2.8-fold (1 ng/mL) and 2.3-fold (10 ng/mL) (Figure 5J). *T. cruzi* infection prevented FN stimulation by TGF- β in both cell types, with L6E9 skeletal myoblasts showing a reduction in FN fibril thickness of 72% for 1 ng/mL and 79% for 10 ng/mL when compared to uninfected treated peers (Figure 4J). CF also presented low response to TGF- β , with the FN area remaining similar to control after TGF- β treatment, representing decreases of 37% (1 ng/mL) and 21% (10 ng/mL) when compared to treated and uninfected controls (Figure 5J). Even though we could not detect the same level of TGF- β stimulation of FN through image processing revealed by *Western blot*, since our measurements took in account only the area occupied by FN fibrils and not the intensity of staining, the modulation patterns were similar between the two approaches and confirmed the biological phenomenon. The treatment of cardiac fibroblast cultures with TGF- β did not impact *T. cruzi* levels of infection, as there were no significant differences in the percentage of infected cells or at the number of intracellular amastigotes (Supplemental Material, Figure S3).

We also performed staining of actin cytoskeleton in cardiac fibroblast cultures. *T. cruzi* infection resulted in myofibrillar breakdown, which impacted FN network organization, even after TGF- β treatment (Supplementary Material, Figure S4).

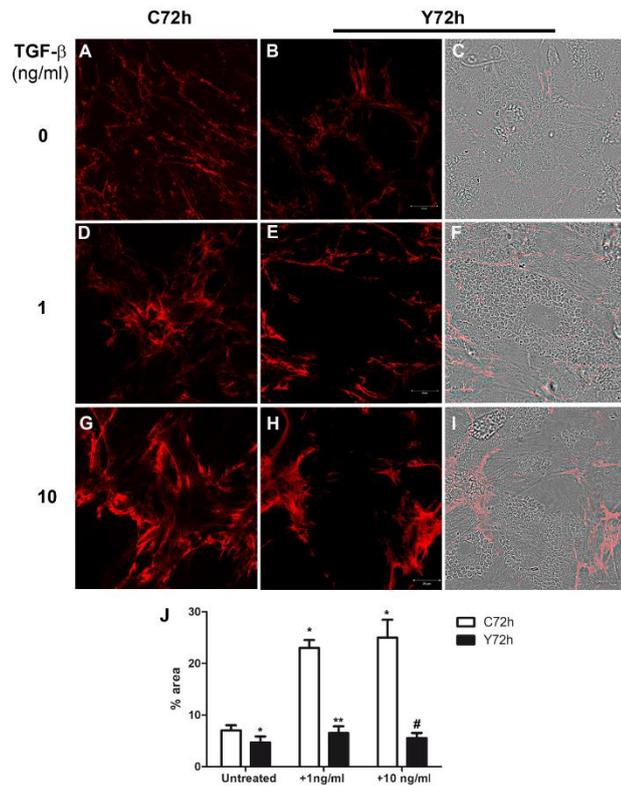


Figure 4. Distribution of fibronectin in L6E9 skeletal myoblasts infected with *T. cruzi* and treated with TGF- β . *T. cruzi* infection (72 h) reduced FN fibrils staining (red) in L6E9 skeletal myoblasts (B,C) when compared to uninfected controls (A). The treatment of *T. cruzi* infected L6E9 skeletal myoblasts with 1 ng/mL (E,F) or 10 ng/mL (H,I) of TGF- β induced an increase in FN expression only in uninfected areas in this culture when compared to uninfected TGF- β treated cultures (D, 1 ng/mL; G, 10 ng/mL), which presented widespread enhancement of FN. (J) Measurement of FN staining area with Image J software showed a reduction of the FN area after infection and a thickening of FN fibrils after TGF- β treatment in uninfected cultures. Differential interference contrast (DIC) was used to show the intracellular parasites in the host cells. * $p \leq 0.05$ vs. untreated, uninfected control (C72h); ** $p \leq 0.05$ vs. uninfected + 1 ng/mL TGF- β ; # $p \leq 0.05$ vs. uninfected + 10 ng/mL TGF- β . Bar = 20 μ m.

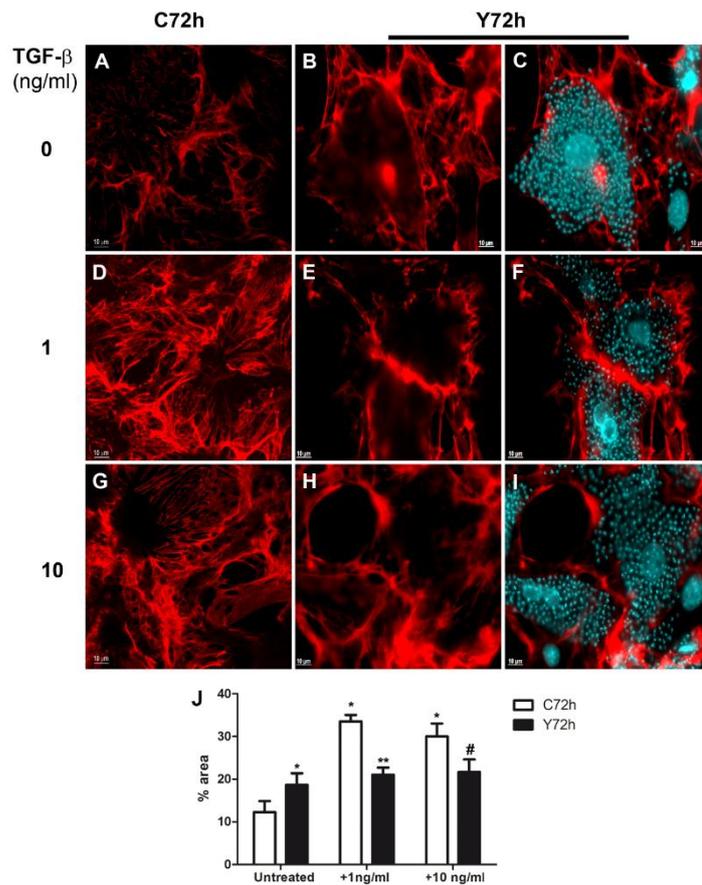


Figure 5. Distribution of fibronectin in cardiac fibroblasts infected with *T. cruzi* and treated with TGF- β . FN staining (red) in untreated *T. cruzi* infected CF (B,C) showed a general intensification of FN expression after 72 h of interaction, while highly infected cells presented a localized reduction when compared to uninfected controls (A). CF cultures showed higher FN expression after treatment with 1 ng/mL (D) and 10 ng/mL (G) of TGF- β . CF still displayed a localized reduction of FN staining in infected cells, even after TGF- β treatment (E,F, 1 ng/mL; H,I, 10 ng/mL). (J) Quantification of FN fibril thickness by image processing with Image J software. DAPI (blue) was used to label the nucleus of the host cell and the kinetoplast of intracellular parasites. * $p \leq 0.05$ vs. untreated, uninfected control (C72h); ** $p \leq 0.05$ vs. uninfected + 1 ng/mL TGF- β ; # $p \leq 0.05$ vs. uninfected + 10 ng/mL TGF- β . Bar = 20 μ m.

2.5. Signaling Pathways Involved in ECM Modulation Triggered by *T. cruzi* Cardiac Fibroblast Infection

The association of fibroblasts, the effector cells of fibrosis, with relative down-regulation of FN expression in *T. cruzi*-infected cells after TGF- β stimulation led us to evaluate (in detail) the regulation of the signaling pathways involved in ECM modulation. We analyzed the activation profiles of PS2, phospho-p38 MAPK, and phospho-c-Jun signaling pathways in uninfected and *T. cruzi*-infected CFs (72 h) subjected (or not) to stimulation with 10 ng/mL of TGF- β . A 59% reduction in PS2 activation was evidenced in the infected CF cultures when compared to their uninfected counterparts (Figure 6A). Both uninfected and *T. cruzi*-infected CF cultures were stimulated by the cytokine treatment. Addition of exogenous TGF- β induced a significant 4.6-fold increase in PS2 activation of *T. cruzi*-infected CF cultures compared to unstimulated infected cultures (Figure 6A). However, a 28% reduction in the activation of the SMAD2 pathway was evidenced when compared to PS2 phosphorylation levels of the uninfected and TGF- β stimulated culture (Figure 6A). As expected, an inhibition of PS2 activation was revealed after treatment of cultures with the specific pharmacological inhibitor SB431542 (ALK5 signaling inhibitor), reaching levels similar to controls (Figure 6A).

Interestingly, high activation of p38 MAPK was revealed in CFs infected with *T. cruzi* as compared to uninfected cultures, achieving a significant 54% increase in the activation of this pathway. The addition of 10 ng/mL of TGF- β induced a rise in the p38 MAPK phosphorylation in uninfected and

infected CF cultures, but its activation was 78% higher in infected cultures. SB431542 treatment prior to TGF- β stimulation led to a reduction of p38 MAPK phosphorylation in both conditions (Figure 6B).

Up-regulation of c-Jun signaling pathway was also induced by *T. cruzi* infection, showing a significant 1.98-fold increase of c-Jun phosphorylation compared to uninfected CFs (Figure 6C). Although 25% activation of c-Jun pathway was observed in stimulated uninfected cells, the increase in phosphorylated c-Jun levels in stimulated *T. cruzi*-infected CFs exceeded this value by 35%. SB431542 also prevented c-Jun phosphorylation in uninfected and *T. cruzi*-infected CF cultures.

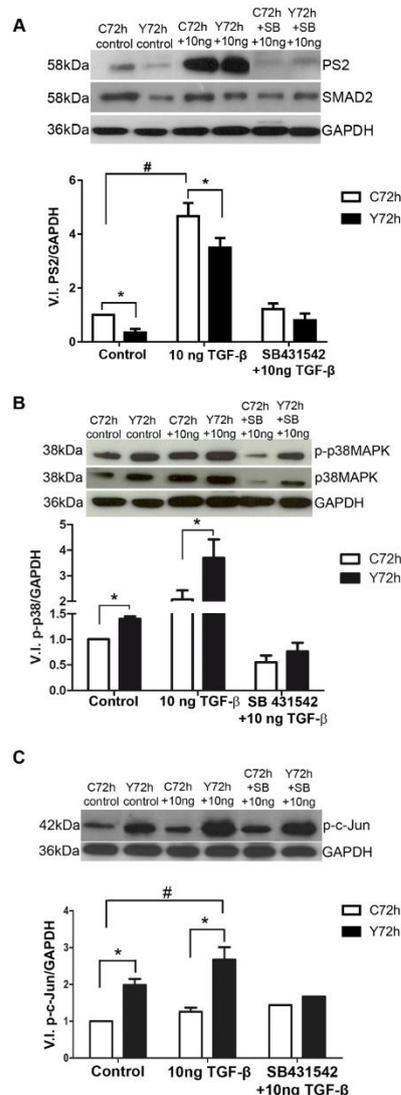


Figure 6. PS2, phospho-p38 MAPK, and phospho-c-Jun detection in normal and infected cardiac fibroblasts with *T. cruzi*. **(A)** PS2 detection. Normal CF showed an increase of SMAD2 phosphorylation when treated with 10 ng/mL of TGF- β . Infected CF were unable to trigger the classical signaling pathway, even when treated with 10 ng/mL, compared to the uninfected pair. The SB431542 inhibitor prevented SMAD2 phosphorylation in CF cultures after stimulation with TGF- β . **(B)** Phosphorylated p38 MAPK detection. In normal CF treated with 10 ng/mL of TGF- β , an increase of p38 MAPK phosphorylation detection was observed. *T. cruzi* infection did not result in significant differences in p38 MAPK phosphorylation, although there was a tendency to increase in this signaling pathway. After addition of 10 ng/mL of TGF- β , the signaling pathway was triggered in CF. The inhibitor SB431542 prevented the p38 MAPK phosphorylation in both normal and infected CF treated with 10 ng/mL TGF- β . **(C)** Phosphorylated c-Jun detection. Note that infection by *T. cruzi* led to an increase in the c-Jun signaling pathway. The addition of TGF- β in normal cultures resulted in a 25% increase in c-Jun detection. The increase triggered by the infection remained and was enhanced by treatment with TGF- β . In all panels, white bars correspond to control, uninfected cultures (C72h), while black bars depict

levels of *T. cruzi* (Y strain) infected cultures (Y72h). * $p \leq 0.05$ compared their control pairs; # $p \leq 0.05$ compared to untreated, uninfected controls $N = 3$.

To evaluate if *T. cruzi* could modulate phosphorylated SMAD2 (PS2) transduction to the nucleus of infected cells, we treated normal and infected cardiac fibroblasts with TGF- β , pre-treated or not with ALK5 inhibitor SB431542, and analyzed PS2 localization by immunofluorescence. Our data showed that the uninfected cells presented constitutive PS2 in nuclei and cytoplasm (Figure 7A,B). Addition of TGF- β induced SMAD2 phosphorylation with intense staining in the nuclei (Figure 7E,F), and there was a 50% increase in the number of nuclei positive for PS2 (Figure 7Q). Addition of SB431542 reduced constitutive PS2 expression (Figure 7I,J) with a 26% decrease in PS2 positive nuclei (Figure 7Q). The inhibitor also prevented TGF- β stimulus of PS2 (Figure 7M,N), corresponding to 66% inhibition of PS2 activation in the nucleus when compared to TGF- β treated CF (Figure 7Q). *T. cruzi* infection of cardiac fibroblasts reduced PS2 detection in host cell nuclei (Figure 7C,D) with a decrease of 10% of nuclei PS2 localization. The presence of intracellular parasites resulted in a significant inhibition of PS2 activation after TGF- β treatment (Figure 7G,H) with a 45% reduction of nuclear localization of PS2 when compared to uninfected TGF- β treated controls (Figure 7Q). *T. cruzi* infection had a synergic effect with SB431542 in CF with low detection of PS2 (Figure 7K,L) and a reduction of 48% of PS2 positive nuclei when compared to uninfected SB431542 treated controls (Figure 7Q). Pre-treatment of infected cultures with ALK5 inhibitor prior to addition of TGF- β also resulted in low PS2 detection in CF cultures (Figure 7O,P) and induced a 54% inhibition in the number of PS2 positive nuclei when compared to TGF- β treated and uninfected peers (Figure 7Q).

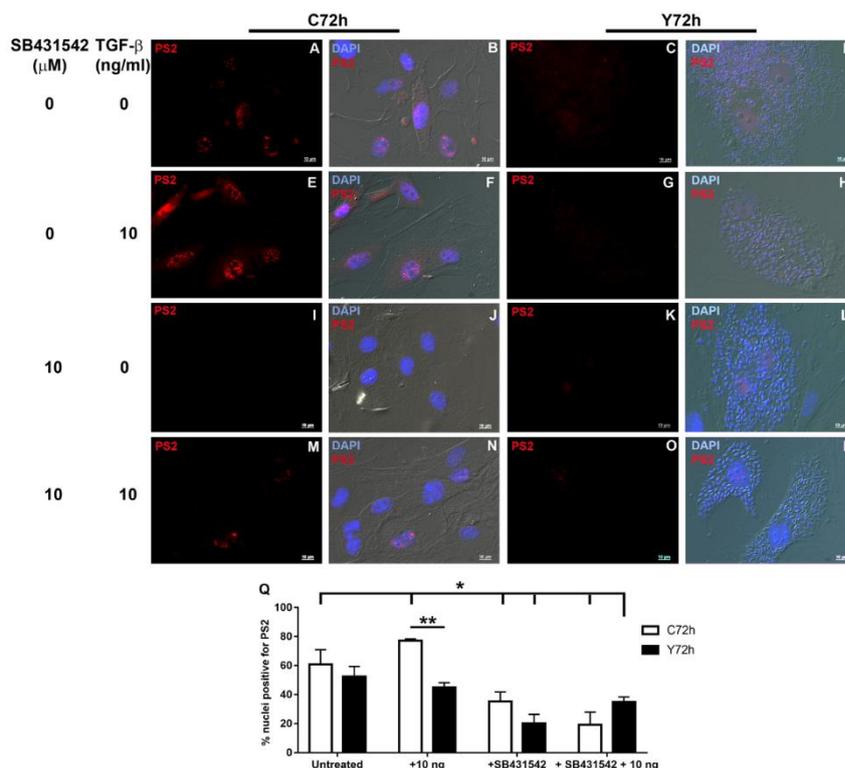


Figure 7. Phosphorylated SMAD2 detection in *Trypanosoma cruzi* infected cardiac fibroblasts. PS2 staining is represented in red (A,C,E,G,I,K,M,O), while cell nuclei are depicted in blue after DAPI staining together with DIC (B,D,F,H,J,L,N,P). (A,B) Control, uninfected cultures (C72h), showing constitutive PS2 expression; (C,D) *T. cruzi* infection (72h- Y72h) reduced PS2 detection (Y72h); (E,F) TGF- β treatment stimulated PS2 in uninfected cultures; (G,H) Infection with *T. cruzi* prevented PS2 signaling in CF; SB431542 inhibited PS2 detection in uninfected (I,J) and *T. cruzi* infected (K,L) CF cultures; (M,N) SB431542 prevented TGF- β stimulation of PS2; (O,P) *T. cruzi* infection and SB431542 treatment resulted in low detection of PS2 in CF. (Q) Quantification of percentage of nuclei positive for PS2. * $p \leq 0.05$ vs. untreated, uninfected control; ** $p \leq 0.05$ vs. C72h + 10 ng/mL TGF- β . Bar = 10 μ m.

2.6. Induction of Cardiac Fibroblast Proliferation by *T. cruzi* Infection and TGF- β Stimulation

To evaluate whether *T. cruzi* infection and TGF- β played a role in the proliferation of CF, these cells were infected with *T. cruzi* and treated for 48 h with different concentrations of TGF- β (1–10 ng/mL). Interestingly, *T. cruzi* infection augmented CF proliferation by 37% as compared to uninfected cells. Both uninfected and *T. cruzi*-infected cultures showed similar responses in the induction of CFs proliferation after stimulation with TGF- β , and 2.5-fold higher levels in cell proliferation profiles were revealed from the stimulation of 10 ng/mL TGF- β in both uninfected and *T. cruzi*-infected cultures (Figure 8).

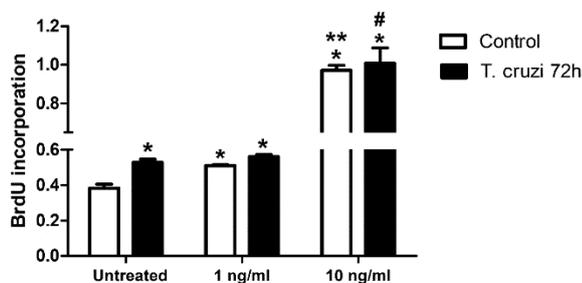


Figure 8. Cardiac fibroblast proliferation treated with TGF- β . Cardiac fibroblasts treated with different concentrations of TGF- β (1 and 10 ng/mL) showed a high proliferation in a dose dependent manner when compared with CF untreated. * $p \leq 0.05$ vs. untreated, uninfected control; ** $p \leq 0.05$ vs. control + 1 ng/mL TGF- β ; # $p \leq 0.05$ vs. *T. cruzi* 72 h + 1 ng/mL TGF- β . $N=3$.

3. Discussion

Cardiac fibrosis is a major feature of cardiomyopathy, increasing the deposition and the accumulation of extracellular matrix proteins in the myocardium. TGF- β is a pro-fibrogenic cytokine and exerts a significant role in the heart as a regulator of components of ECM and is implicated in the genesis of cardiac fibrosis in Chagas disease (Araújo-Jorge et al., 2002b).

In this study, FN expression and its distribution in ECM were analyzed in normal and *T. cruzi*-infected CF and L6E9 skeletal myoblasts treated with TGF- β (1–10 ng/mL). Also, the roles of classical and alternative TGF- β signaling pathways in the FN modulation in ECM in CF were investigated. Our data revealed that CF and L6E9 skeletal myoblasts showed an increase of FN starting in low concentrations of TGF- β (1–10 ng/mL). In contrast, normal cardiomyocytes displayed ECM stimulus only when treated with 10 ng/mL, similar to results previously reported by our group (Calvet et al., 2009). The differences observed in ECM expression in the different cell types could be explained by distinctive expression of TGF- β receptors, such as endoglin, an auxiliary type III TGF- β receptor that controls ECM expression in response to TGF- β (L. García-Pozo, M.E. Miquilena-Colina, 2008). Skeletal muscle cells do not have endoglin on their surface (Rodríguez-Barbero et al., 2006). In CF, endoglin is constitutively expressed and is critical for TGF- β 1 signaling, also modulating type I collagen synthesis in these cells (Kapur et al., 2012). Expression of endoglins, which is poorly understood in cardiomyocytes, occurs during the formation of the heart in the embryonic development, mainly in endothelial cells (Nomura-Kitabayashi et al., 2009).

L6E9 skeletal myoblasts infected with *T. cruzi* showed a reduction of FN expression, even after treatment with higher doses of TGF- β . In contrast, in CF, the overall measurement of the culture by *Western blot* showed an increase of FN, while immunofluorescence demonstrated that highly infected cells presented a redistribution of FN to the borders of the cell. In both cases, the parasite may have been directly modulating synthesis, secretion, and organization of matrix proteins. In the case of CF, *T. cruzi* seemed to be preventing the cell response to exogenous TGF- β stimulus. Evidence from the literature supports this idea, since a secreted or released factor from *T. cruzi* is capable of repressing connective tissue growth factor (CTGF) / cellular communication network factor 2 (CCN2) expression in response to TGF- β in dermal fibroblasts, an effect also observed in the down-regulation of fibrogenic genes after infection (Mott et al., 2011). The localized FN reduction and matrix delocalization in *T. cruzi*-infected L6E9 myoblasts and CF could also be associated with the actin cytoskeleton breakdown caused by the

infection, which prevents both the anchoring of FN to integrins on the cell surface and the organization of the FN matrix (Melo et al., 2014; Pereira et al., 1993). Our results support this hypothesis, since *T. cruzi* infection disrupted the actin cytoskeleton of CF. Previous work from our group also showed a disorganization of the TGF- β receptor type II cell surface distribution induced by *T. cruzi* in cardiac fibroblast-containing primary cardiomyocyte cultures, which is associated with a lower global PS2 signaling response to exogenous TGF- β (Calvet et al., 2016). Furthermore, *T. cruzi* infection induces a significant reduction in the global levels of mRNA in the cytoplasm of host cell concomitant with the amastigote proliferation in primary cardiomyocyte cultures that also contain CF (Pereira et al., 2000), suggesting that the intracellular multiplication of *T. cruzi* can affect the mRNA stability in the host, an effect that could result in reduced levels of protein synthesis.

In cardiac cultures infected with *T. cruzi*, different cytokines and chemokines such as TNF- α , IL-1 β , and iNOS are secreted in response of the infection (Machado et al., 2000). The increase of FN expression in CF infected cultures suggests that the cellular stress against infection causes a release of cytokines such as TNF- α , and that adjacent uninfected cells of the infected culture receive cytokine stimulus together with TGF- β , potentiating and modulating the synthesis and the release of FN in the ECM. It was observed that, in cardiac fibrosis, TNF- α may be involved in excessive accumulation of ECM in the myocardium (Sun et al., 2007). Furthermore, mixed cultures containing cardiomyocytes and CF showed an increase in FN in response to stimulation with TNF- α (Calvet et al., 2009).

Our results demonstrated that CF and skeletal L6E9 myoblasts showed higher SMAD2 phosphorylation than CM after TGF- β stimulation. However, p38 MAPK levels were higher in CM and skeletal L6E9 myoblasts when compared with CF. The differences in signaling responses could have been caused by differences in TGF- β receptor expression between the different cell types, including endoglins, as discussed above. In addition, in cardiac tissue, the p38 MAPK signaling pathway is a dominant response to injury, leading to cardiomyocyte hypertrophy through further activation of MKK3 and MKK6 (Cuenda and Rousseau, 2007). Our data showed that p38 MAPK detection was higher in cardiomyocytes than CF, suggesting that the p38 MAPK pathway may have resulted in hypertrophy rather than fibrosis in cardiomyocytes.

Our findings demonstrated that PS2 levels were reduced in *T. cruzi*-infected CF cultures after the addition of TGF- β (10 ng/mL) when compared to uninfected controls. We also demonstrated that *T. cruzi* infection significantly prevented TGF- β stimulus of PS2 localization in CF nuclei. The presence of the intracellular parasite in CF seemed to be modulating the classical signaling pathway and preventing the signal transduction to the nucleus. Studies in cardiomyocyte cultures have shown that *T. cruzi* uptakes endogenous TGF- β for multiplication and development in the host cell, using it for its own cycle (Waghbi et al., 2005a). Also, the secreted factor from *T. cruzi* that inhibits TGF- β response in dermal fibroblasts (Mott et al., 2011) might be disrupting SMAD signaling in CF.

We demonstrated an increase of p38 MAPK phosphorylation in CF after *T. cruzi* infection and treatment with TGF- β . The p38 MAPK phosphorylation can modulate the deposition of ECM proteins in infected CF and might be a candidate for intervention against Chagas disease fibrosis. In *T. cruzi*-infected macrophage cultures, the exogenous addition of cruzipain, the most abundant cysteine protease of *T. cruzi*, and the JNK pathway inhibitor, SP600125, induces triggering and amplification of the p38 MAPK signal in this cell type, favoring survival and amplification of the parasite in macrophages (Stempin et al., 2008). In other models of cardiomyopathy, p38 MAPK also was proven to be a critical pathway for fibrosis, since conditional knock-out of the p38 MAPK gene, *Map14k*, in cardiac fibroblasts blocked myofibroblast differentiation after ischemic injury and led to reduced heart fibrosis (Molkentin et al., 2017).

Our data revealed that *T. cruzi* infection increased c-Jun phosphorylation in CF. When TGF- β bound to its specific receptor, a rapid c-Jun activation occurred depending on the cell type, leading to SMAD3 phosphorylation. Therefore, c-Jun signaling may have increased the classical signaling pathway through SMAD3 phosphorylation (Engel et al., 1999; Zhang, 2010). In *T. cruzi*-infected macrophage cultures, an increase in c-Jun phosphorylation was similarly observed (Stempin et al., 2008). Likewise, significant up-regulation of c-Jun was detected in early *T. cruzi* infection of primary human colonic epithelial cells by phosphoproteomics and *Western blot* (Suman et al., 2018). In addition, primary cultures of cardiac myocytes displayed an increase in nuclear translocation of JunB up to 2 h

after *T. cruzi* infection (Udoko et al., 2016). These data demonstrated that the parasite has an important role in the activation of c-Jun in different cell types and also in CF cultures, where an increase in c-Jun phosphorylation triggered by infection was observed independent of TGF- β treatment, suggesting c-Jun as a candidate target for intervention against Chagas disease fibrosis in the heart.

To investigate if FN increase resulting from *T. cruzi* infection was caused by CF proliferation stimulated by the parasite, we measured 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) incorporation in *T. cruzi*-infected CF cultures treated with different concentrations of TGF- β . Our results showed that *T. cruzi* infection and TGF- β promoted the proliferation of cardiac fibroblasts, with TGF- β response being observed in a dose-dependent manner, an effect consistent with fibrosis development in the myocardium in CD. Different sources of evidence show that *T. cruzi*-derived molecules can modulate fibroblast proliferation. Conditioned media from *T. cruzi*-infected cultures and amastigote extract stimulated [³H]thymidine incorporation in human dermal fibroblasts, although the authors were not able to identify which parasite molecule was responsible for this process (Wyler DJ, Libby P, Prakash S, Prioli RP, 1987). More recently, recombinant *T. cruzi* calreticulin (TcCRT) was shown to induce fibroblast migration in scratch plate assays and increase proliferation of human dermal fibroblasts three orders of magnitude more efficiently than the recombinant human calreticulin (Arias et al., 2015). Thus, *T. cruzi* can potentially modulate cardiac fibroblast proliferation either by direct infection or through a paracrine effect of infected cells over uninfected cells, or possibly via the remaining antigens of dead parasites in the Chagas patient's cardiac tissue (Reis et al., 1997) acting through *T. cruzi* calreticulin. Cardiac fibroblast proliferation can be targeted for treatment, since tetrandrine, a drug used for cancer treatment, can inhibit the proliferation of cardiac fibroblasts induced by TGF- β (Q et al., 2018) and potentially could be repurposed for treatment of cardiac fibrosis in Chagas Disease.

Altogether, our studies open new perspectives to understand the regulatory mechanisms of TGF- β in FN matrix in cardiomyocytes, cardiac fibroblasts, and L6E9 myoblasts and uncover new therapeutic targets against cardiac fibrosis in Chagas Disease.

4. Materials and Methods

4.1. Primary Cardiomyocyte Culture

Primary cultures of cardiomyocytes and cardiac fibroblasts were performed using 18 day old mouse embryos as previously described (Meirelles et al., 1986). Cardiac fragments were dissociated in phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.88 mM KH₂PO₄, 6.4 mM Na₂HPO₄, pH7.2) containing 0.025% trypsin and 0.01% collagenase (Worthington Co., Lakewood, NJ, USA) and plated into a 24-well plate (10⁵ cells/mL) containing glass coverslips coated with 0.01% gelatin. Although cardiomyocytes constitute approximately 80% of the total cells, the culture still displayed myoblasts and fibroblasts. Cultures were cultivated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma), 2.5 mM CaCl₂, 1 mM L-glutamine, and 2% chicken embryo extract and kept at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂.

4.2. Cardiac Fibroblasts and Skeletal Muscle Myoblasts Culture

CF cultures were purified from successive dissociations of mouse cardiac muscle cells primary cultures. Cells seeded in 25 cm² culture flasks were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 2% chicken embryo extract, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM L-glutamine, and antibiotics and kept at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Fibroblast purification was carried out by the differential plating method and successive subculture based on the slower adhesion of cardiomyocytes to the substrate and its susceptibility to sequential enzyme activity, respectively. Rat skeletal muscle myoblasts from L6E9 lineage were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 1 mM L-glutamine. The cells were subcultured by the dissociation of confluent cultures with a solution of 0.025% trypsin and 0.01% EDTA in PBS. After dissociation, the isolated cells were counted and seeded at a density of 5 × 10⁴ cells/well and 5 × 10⁵ cells/dish in 24-well plates and 60 mm dishes, respectively.

4.3. Parasites and Cell Culture Infection

Trypomastigotes of *T. cruzi*, Y strain, derived from Vero culture were used. Cardiac muscle cells, CF, and skeletal myoblasts L6E9 were infected at a multiplicity of infection of 10 parasites/host cell (10:1) after 24 h of cultivation. The infection was interrupted after 72 h.

4.4. Treatment of Cardiomyocytes, Cardiac Fibroblasts, and Skeletal Myoblasts L6E9 with TGF- β

Normal and 24 h infected cultures were washed with Ringer's solution to remove the FBS contained in the nutritive medium. The treatment was performed with recombinant TGF- β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) diluted in DMEM supplemented with 0.1% FBS, 2.5 mM CaCl₂, and 2% L-glutamine. TGF- β was added at concentrations of 1 and 10 ng/mL after 24 h of cultivation. The cells were fixed after 48 h of TGF- β treatment and 72 h of *T. cruzi* infection. For analysis of signaling pathways, the treatment with recombinant TGF- β was performed for 1 h in the same concentrations in normal and *T. cruzi*-infected cultures (72 h).

4.5. Indirect Immunofluorescence

Cardiomyocytes, CF, and skeletal myoblasts L6E9 treated or not with TGF- β were fixed for 5 min at room temperature with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS followed by washing in PBS. To block nonspecific reactions, monolayers were washed (three times for 20 min) with PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA). The cells were then incubated for 18 h at 4 °C with anti-fibronectin antibody (1:400; Sigma Chemical Co.) or anti-phosphorylated SMAD2 antibody (1:200; Cell Signaling, Danvers, MA, USA). After successive washes in PBS, the cultures were incubated for 1 h at 37 °C with secondary anti-rabbit antibody TRITC-conjugated (1:200; Sigma). Phalloidin-FITC (4 μ g/mL, Sigma Chemical Co.) was added together with the secondary antibodies to display actin microfilaments. For visualization of the nucleus, cells were stained with DAPI (DNA dye), and then the coverslips were mounted in 2.5% 1'4-Diazabicyclo-(2.2.2)-octane (DABCO, Sigma Chemical Co.) in PBS/50% glycerol and sealed with nail polish. As negative controls, the primary antibodies were omitted, and no unspecific reaction was visualized (Supplemental Material, Figure S5). The images were acquired at the confocal laser scanning microscope LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen, BW, DE) or Bx512 Fluoview 500 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, JP), where differential interference contrast (DIC) images showed localization of intracellular parasites. The fraction of total area of the field occupied by FN staining was measured using FIJI software (Schindelin et al., 2012). The raw images were segmented by color thresholding defined in images from control, untreated, and uninfected samples. After generation of binary images, the percentage of total area of the field covered by FN staining was measured. Immunofluorescence for PS2 was observed and acquired at an Axio Image M2 equipped with Apotome system (Olympus).

4.6. Protein Extraction

Cardiomyocytes, CF, and L6E9 skeletal myoblasts treated or not with TGF- β were washed 3 times with cold PBS on ice. Then, the cells were scraped in lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 8.0) containing phosphatase and protease inhibitors (PhosStop Roche Diagnostics, Basel, CH), 1 mM EGTA, 1 mg/mL pepstatin, 100 mg/mL PMSF, 1 μ g/mL aprotinin and 2 mg/mL leupeptin. After the lysis, electrophoresis sample buffer 5X was added (0.3 M Tris, 10% SDS, 0.125% Bromophenol Blue, 25% β -mercaptoethanol, and 50% glycerol), and the samples were heated to 100 °C for 5 min in a dry bath. After the samples cooled down to room temperature, the samples were stored at -20 °C. Before adding the sample buffer, an aliquot of each sample was separated to quantify the total protein amount using the Folin-Lowry method.

4.7. Western Blot

After the determination of protein concentration, 10 μ g or 20 μ g of total protein extracts obtained from cardiomyocytes, CF, and skeletal myoblasts L6E9 normal and infected and treated or not with TGF- β were subjected to electrophoresis on 10% and 12% of polyacrylamide gel containing SDS (SDS-PAGE). The electrophoretic separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated for 1 h at 4 °C with blocking buffer consisting of 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (TBST), 5% non-fat dry milk (Molico), and 0.1% Tween 20. After blocking, the membranes were

incubated with anti-fibronectin antibody (1:5000; Sigma Chemical Co.), anti-phosphorylated SMAD2 (1:2000; Millipore, Burlington, MA, USA), anti-phosphorylated p38 (1:1000; Cell Signaling), and anti-phosphorylated c-Jun (1:500; Millipore) for 18 h at 4 °C. Anti-GAPDH (1:50,000; RDI Fitzgerald, Acton, MA, USA) was used as internal control. The membranes were then washed with TBST and incubated for 1 h at room temperature with anti-rabbit or anti-mouse peroxidase conjugate (Thermo Scientific Pierce Protein Biology, Waltham, MA, USA) diluted 1:20,000 and 1:30,000, respectively, in blocking buffer. The membranes were washed, and the peroxidase was revealed by chemiluminescence using the Super Signal West Pico (Thermo Scientific Pierce Protein Biology) kit. Densitometry of the resulting bands was performed with the Image J program (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.8. Cardiac Fibroblasts Proliferation

CFs plated in a density of 1.5×10^4 cells per well in 96-well plates were infected with *T. cruzi* (Y strain, 10 parasites/host cell), and after 24 h of infection, the cultures were treated with 1, 5, and 10 ng/mL of TGF- β per 48 h. Measurement of proliferation of CFs was performed using BrdU Cell Proliferation Kit (Millipore) according to manufacturer's instructions. Briefly, after 48 h of treatment with TGF- β and 72 h of *T. cruzi* infection, the cultures were incubated with 20 μ g/mL of 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), allowing its incorporation in proliferating cells for 2 h. Cells were fixed, and the DNA was denatured with the solution provided by the kit for 30 min at room temperature. After washing, the BrdU-labeled DNA was detected by the monoclonal anti-BrdU antibody for 1 h at room temperature. The plate was washed, and the antigen-antibody complex was revealed by addition of peroxidase-conjugate goat anti-mouse IgG, antibody, and 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) as peroxidase substrate. The reaction was stopped with acid Stop Solution, and the colorimetric reaction was read in an M2 Spectramax Plate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) at λ 450 nm.

4.9. Statistical Analysis

Student's *t*-test was used for comparison of experimental data from FN immunostaining area measurements, densitometry of *Western blotting* bands, and quantification of PS2 positive nuclei. Values were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/xxx/s1

Author Contributions: Conceptualization, C.M.C.; methodology, C.M.C., M.C.S.P.; investigation, C.M.C., T.A.S., L.F.C.F.; resources, C.M.C., M.C.S.P.; data curation, C.M.C., T.A.S., L.F.C.F.; writing—original draft preparation, T.A.S.; writing—review and editing, C.M.C., M.C.S.P.; visualization, C.M.C., T.A.S.; supervision, C.M.C., M.C.S.P.; funding acquisition, C.M.C., M.C.S.P.

Funding: This research was funded by research funds from the Oswaldo Cruz Institute of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (Papes VI)/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil (grant 421856/2017-3 and 424015/2018-8 to M.C.S.P.), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (grant E-26/010.001548/2014 and E-26/110.553/2014 to M.C.S.P. and E26/110.817/2009 to C.M.C.) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Acknowledgments: The authors acknowledge Liliâne Batista de Mesquita and Alanderson Nogueira for technical support with cardiomyocyte and parasite culture; Pedro Paulo de A. Manso and Carlos Bizarro for confocal image acquisition; Potter Wickware for editorial assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Acquatella, H., Asch, F. M., Barbosa, M. M., Barros, M., Bern, C., Cavalcante, J. L., et al. (2018). Recommendations for Multimodality Cardiac Imaging in Patients with Chagas Disease: A Report from the American Society of Echocardiography in Collaboration With the InterAmerican Association of Echocardiography (ECOSIAC) and the Cardiovascular Imaging Depa. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 31, 3–25. doi:10.1016/j.echo.2017.10.019.
- Aiyer, R. A., and Aggarwal, B. B. (2018). Tumor necrosis factors. *Cytolytic Lymphocytes Complement Eff. Immune Syst.* 2, 105–134. doi:10.1201/9781351071291.
- Akhurst, R. J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 790–811. doi:10.1038/nrd3810.

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2010). *Biologia Molecular da Célula*. 5a. edição, ed. Artmed.
- ALEXAKIS, C., MESTRIES, P., GARCIA, S., PETIT, E., BARBIER, V., PAPY-GARCIA, D., et al. (2004). Structurally different RGTAs modulate collagen-type expression by cultured aortic smooth muscle cells via different pathways involving fibroblast growth factor-2 or transforming growth factor- β 1. *FASEB J.* 18, 1147–1149. doi:10.1096/fj.03-1126fje.
- AM, K., F, L., G, O., DL, D., D, Q., RT, W., et al. (2004). B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation. *Circ Res* 94, 453–6.
- Andrade, L. O., and Andrews, N. W. (2005). The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 819–23. doi:10.1038/nrmicro1249.
- Andrade, D. V., Gollob, K. J., and Dutra, W. O. (2014). Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3010. doi:10.1371/journal.pntd.0003010.
- Andrews, M. C. F. and N. W. (2013). Host Cell Invasion by Trypanosoma cruzi: A Unique Strategy that Promotes Persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 734–747. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.Host.
- AR, K., F, S., DA, L., A, A., DM, C., and BH, W. (2008). Long-Term but Not Short-Term p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition Improves Cardiac Function and Reduces Cardiac Remodeling Post-Myocardial. *J Pharmacol Exp Ther.* 325, 741–750.
- Arabacilar, P., and Marber, M. (2015). The case for inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase in heart failure. *Front. Pharmacol.* 6, 1–7. doi:10.3389/fphar.2015.00102.
- Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Bailly, S., and Feige, J. J. (2012). The TGF- β pathway as an emerging target for chagas disease therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 613–621. doi:10.1038/clpt.2012.102.
- Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Hasslocher-moreno, A. M., Xavier, S., Higuchi, M. D. L., Keramidas, M., et al. (2002a). Implication of Transforming Growth Factor - β 1 in Chagas Disease Myocardiopathy. *J. Infect. Dis.* 186, 1823–1828.
- Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Hasslocher-Moreno, A. M., Xavier, S. S., Higuchi, M. D. L., Keramidas, M., et al. (2002b). Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardiopathy. *J. Infect. Dis.* 186, 1823–8. doi:10.1086/345882.
- Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Soeiro, M. D. N. C., Keramidas, M., Bailly, S., and Feige, J.-J. (2008). Pivotal role for TGF- β in infectious heart disease: The case of Trypanosoma cruzi infection and consequent Chagasic myocardiopathy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 405–13. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.08.002.
- Araújo-Jorge TC, Waghabi MC, Bailly S, F. J.-J., Araújo-Jorge, T. C., Waghabi, M. C., Bailly, S., and Feige, J.-J. J. (2012). The TGF- β pathway as an emerging target for chagas disease therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 613–621. doi:10.1038/clpt.2012.102.
- Arias, J. I., Sepulveda, C., Bravo, P., Hamilton-West, C., Maldonado, I., and Ferreira, A. (2015). Comparative effect of human and Trypanosoma cruzi calreticulin in wound healing. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, 41–54. doi:10.1002/term.
- Bach, E. A., Aguet, M., and Schreiber, R. D. (2002). THE IFN γ RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563–591. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.563.
- Badylak, J. L. D. and S. F. (2018). Cardiac Extracellular Matrix. *Card. Extracell. matrix* 1098. doi:10.1007/978-3-319-97421-7.
- Bambino-Medeiros, R., Oliveira, F. O., Calvet, C. M., Vicente, D., Toma, L., Krieger, M. A., et al. (2011). Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in Trypanosoma cruzi amastigote attachment and invasion. *Parasitology* 138, 593–601. doi:10.1017/S0031182010001678.
- Begoña López, Arantxa González (2010). Circulating Biomarkers of Collagen Metabolism in Cardiac Diseases. *Circulation* 121, 1645–1654.
- Bello Corassa, R., Aceijas, C., Alves, P. A. B., and Garelick, H. (2017). Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: A critical review. *Perspect. Public Health* 137, 289–295. doi:10.1177/1757913916671160.
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., Leary, E. C. O., Sakata, S. T., Xu, W., et al. (2001). SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *PNAS* 98, 1–6.
- Benziger, C. P., do Carmo, G. A. L., and Ribeiro, A. L. P. (2017). Chagas Cardiomyopathy: Clinical Presentation and Management in the Americas. *Cardiol. Clin.* 35, 31–47. doi:10.1016/j.ccl.2016.08.013.
- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 373, 456–466. doi:10.1056/NEJMra1410150.
- Bestetti, R. B., Scanavacca, M. I., Issa, V. S., Bocchi, E. A., and Cunha Neto, E. (2017). Chronic Chagas Heart Disease Management. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 1510–1524. doi:10.1016/j.jacc.2017.08.004.
- Bogoyevitch, M. A., and Arthur, P. G. (2008). Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases-JuNK no more? *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1784, 76–93. doi:10.1016/j.bbapap.2007.09.013.
- Bogoyevitch, M. A., Boehm, I., Oakley, A., Ketterman, A. J., and Barr, R. K. (2004). Targeting the JNK MAPK cascade

- for inhibition: Basic science and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1697, 89–101. doi:10.1016/j.bbapap.2003.11.016.
- Bonney, K. M. (2014). Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21, 11. doi:10.1051/parasite/2014012.
- Botoni, F. A., Poole-Wilson, P. A., Ribeiro, A. L. P., Okonko, D. O., Oliveira, B. M. R., Pinto, A. S., et al. (2007). A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. *Am. Heart J.* 153, 544.e1-544.e8. doi:10.1016/j.ahj.2006.12.017.
- Bradshaw, M. J., and Smith, M. L. (2014). Multiscale relationships between fibronectin structure and functional properties. *Acta Biomater.* 10, 1524–31. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.027.
- Browne, A. J., Guerra, C. A., Alves, R. V., Da Costa, V. M., Wilson, A. L., Pigott, D. M., et al. (2017). The contemporary distribution of *Trypanosoma cruzi* infection in humans, alternative hosts and vectors. *Sci. Data* 4, 1–9. doi:10.1038/sdata.2017.50.
- Bujak, M., and Frangogiannis, N. G. (2007). The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 74, 184–95. doi:10.1016/j.cardiores.2006.10.002.
- Burghardt, I., Tritschler, F., Opitz, C. A., Frank, B., Weller, M., and Wick, W. (2007). Pirfenidone inhibits TGF- β expression in malignant glioma cells. 354, 542–547. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.012.
- Caldas, I. S., da Matta Guedes, P. M., dos Santos, F. M., de Figueiredo Diniz, L., Martins, T. A. F., da Silva do Nascimento, A. F., et al. (2013). Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. *Trop. Med. Int. Heal.* 18, 75–84. doi:10.1111/tmi.12002.
- Calvet, C. M., Meuser, M., Almeida, D., Meirelles, M. N. L., and Pereira, M. C. S. (2004). *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp. Parasitol.* 107, 20–30. doi:10.1016/j.exppara.2004.04.003.
- Calvet, C. M., Oliveira, F. O. R., Araújo-Jorge, T. C., and Pereira, M. C. S. (2009). Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 301–12. doi:10.1016/j.ijmm.2008.08.005.
- Calvet, C. M., Silva, T. A., De Melo, T. G., De Araújo-Jorge, T. C., and De Souza Pereira, M. C. (2016). TGF- β receptor type II costameric localization in cardiomyocytes and host cell TGF- β response is disrupted by *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology* 143. doi:10.1017/S0031182016000299.
- Calvet, C. M., Toma, L., De Souza, F. R., Meirelles, M. D. N. S. L. De, and Pereira, M. C. S. (2003). Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 50, 97–103.
- Cardoso, D. R. F., Reis, L. M. S. dos, Sousa, R. F. V. de, Nascimento, E. F. do, Santos, J. P. dos, Carvalho-Costa, F. A., et al. (2018). Chagasic infection among blood donors in Brazil: an integrative review. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* 40, 283–291. doi:10.1016/j.htct.2018.01.010.
- Carlos, J., Dias, P., Neto, V. A., and Albuquerque, J. De (2011). Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 375–379. doi:10.1590/S0037-86822011005000032.Mecanismos.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, no:2, 0074-0276.
- Chen, W., and Ten Dijke, P. (2016). Immunoregulation by members of the TGF β superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 723–740. doi:10.1038/nri.2016.112.
- Cheruku, H. R., Mohamedali, A., Cantor, D. I., Tan, S. H., Nice, E. C., and Baker, M. S. (2015). Transforming growth factor- β , MAPK and Wnt signaling interactions in colorectal cancer. *EuPA Open Proteomics* 8, 104–115. doi:10.1016/j.euprot.2015.06.004.
- Chilakamarti V. Ramana, M. Pilar Gil, R. D. S. and G. R. S., and The (2002). Stat1-dependent and -independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. *Trends Immunol.* 23, 96–101. doi:10.1177/096701067901000109.
- Coelho, L. L., Pereira, I. R., Pereira, M. C. D. S., Mesquita, L., Lannes-Vieira, J., Adesse, D., et al. (2018). *Trypanosoma cruzi* activates mouse cardiac fibroblasts in vitro leading to fibroblast-myofibroblast transition and increase in expression of extracellular matrix proteins. *Parasites and Vectors* 11, 1–11. doi:10.1186/s13071-018-2614-1.
- Coura, José Rodrigues and Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115, 5–13.
- Coura, J. R. (2013). Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 962–7. doi:10.1590/0074-0276130565.
- Coura, J. R. (2015). The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 277–282. doi:10.1590/0074-0276140362.
- Cruz, J. S., Santos-Miranda, A., Sales, P. A., Monti-Rocha, R., Campos, P. P., Machado, F. S., et al. (2016). Altered cardiomyocyte function and *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 1028–1033. doi:10.4269/ajtmh.15-0255.
- Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases.

- Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1358–75. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010.
- Cui, J., Zhang, M., Zhang, Y. Q., and Xu, Z. H. (2007). JNK pathway: Diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 601–608. doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00579.x.
- Cunha-Neto, E., and Chevillard, C. (2014). Chagas Disease Cardiomyopathy: Immunopathology and Genetics. *Mediators Inflamm.* 2014, 683230. doi:10.1155/2014/683230.
- Darby, I. A., and Laverdet, B. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 7, 301–311.
- De Bona, E., Lidani, K. C. F., Bavia, L., Omidian, Z., Gremski, L. H., Sandri, T. L., et al. (2018). Autoimmunity in chronic chagas disease: A road of multiple pathways to cardiomyopathy? *Front. Immunol.* 9, 1–8. doi:10.3389/fimmu.2018.01842.
- de Oliveira, F. L., Araújo-Jorge, T. C., de Souza, E. M., de Oliveira, G. M., Degraive, W. M., Feige, J.-J. J., et al. (2012). Oral administration of gw788388, an inhibitor of transforming growth factor beta signaling, prevents heart fibrosis in chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1696. doi:10.1371/journal.pntd.0001696.
- De Souza, A. P., Tanowitz, H. B., Chandra, M., Shtutin, V., Weiss, L. M., Morris, S. A., et al. (2004). Effects of early and late verapamil administration on the development of cardiomyopathy in experimental chronic *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. *Parasitol. Res.* 92, 496–501. doi:10.1007/s00436-004-1080-1.
- Deb, A., and Ubil, E. (2014). Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 47–55. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.02.017.
- Derynck, R., and Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Sci. Signal.* 12. doi:10.1126/scisignal.aav5183.
- Dewenter, M., Wagner, M., and El-Armouche, A. (2016). LATITUDE-TIMI: Is there still hope for anti-inflammatory therapy in acute myocardial infarction? *J. Thorac. Dis.* 8, E1047–E1049. doi:10.21037/jtd.2016.08.66.
- Dias, J. C. P., Ramos, A. N., Gontijo, E. D., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, M. A., Coura, J. R., et al. (2016). 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 3–60. doi:10.1590/0037-8682-0505-2016.
- Diniz, L. D. F., Urbina, J. a, de Andrade, I. M., Mazzeti, A. L., Martins, T. A. F., Caldas, I. S., et al. (2013). Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2367. doi:10.1371/journal.pntd.0002367.
- Dobaczewski, M., and Frangogiannis, N. G. (2009). Chemokines and cardiac fibrosis. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* 1, 391–405. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482709> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2798729>.
- Domeier, P. P., Chodisetti, S. B., Soni, C., Schell, S. L., Elias, M. J., Wong, E. B., et al. (2016). IFN- γ receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 213, 715–732. doi:10.1084/jem.20151722.
- Doppler, S. A., Carvalho, C., Lahm, H., Deutsch, M. A., Dreßen, M., Puluca, N., et al. (2017). Cardiac fibroblasts: More than mechanical support. *J. Thorac. Dis.* 9, S36–S51. doi:10.21037/jtd.2017.03.122.
- Drabsch Y, ten D. P., Drabsch, Y., and ten Dijke, P. (2012). TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 31, 553–568. doi:10.1007/s10555-012-9375-7.
- Duschak, V. G. (2016). Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease in the Last 15 Years-Period. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 74–173. doi:10.2174/1574891X11666161024165.
- Dutra, W. O., Menezes, C. A. S., Magalhães, L. M. D., and Gollob, K. J. (2014). Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 36, 377–387. doi:10.1111/pim.12107.
- Echeverria, L. E., and Morillo, C. A. (2019). A m e r i c a n T r y p a n o s o m i a s i s (Chagas Disease) Chagas disease Cardiomyopathy Heart failure Trypanosomiasis Parasitology. *Infect. Dis. Clin. NA* 33, 119–134. doi:10.1016/j.idc.2018.10.015.
- Engel, M. E., McDonnell, M. a., Law, B. K., and Moses, H. L. (1999). Interdependent SMAD and JNK Signaling in Transforming Growth Factor- β -mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 37413–37420. doi:10.1074/jbc.274.52.37413.
- Fan, D., Takawale, A., Lee, J., and Kassiri, Z. (2012). Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, 15. doi:10.1186/1755-1536-5-15.
- Ferrão, P. M., D’Avila-Levy, C. M., Araujo-Jorge, T. C., Degraive, W. M., Gonçalves, A. D. S., Garzoni, L. R., et al. (2015). Cruzipain activates latent TGF- β from host cells during *T. cruzi* invasion. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0124832.
- Ferrão, P., Nisimura, L., Moreira, O., Land, M., Pereira, M. C., de Mendonça-Lima, L., et al. (2018). Inhibition of TGF- β pathway reverts extracellular matrix remodeling in *T. cruzi*-infected cardiac spheroids. *Exp. Cell Res.* 362, 260–267. doi:10.1016/j.yexcr.2017.11.026.
- Ferreira, R. R., Abreu, S., Vilar-pereira, G., Ferreira, C., Degraive, W., Meuser-batista, M., et al. (2019). TGF- β inhibitor therapy decreases fibrosis and stimulates cardiac improvement in a pre-clinical study of chronic

- Chagas' heart disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, 1–27.
- Ferreira, R. R., Da Silva Madeira, F., Alves, G. F., Da Costa Chambela, M., De Oliveira Vaz Curvo, E., Dos Santos Moreira, A., et al. (2018). TGF- β polymorphisms are a risk factor for Chagas disease. *Dis. Markers* 2018. doi:10.1155/2018/4579198.
- Ferreira, R. R., de Souza, E. M., de Oliveira, F. L., Ferr??o, P. M., Gomes, L. H. F., Mendon??a-Lima, L., et al. (2016a). Proteins involved on TGF- β pathway are up-regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. *Immunobiology* 221, 587–94. doi:10.1016/j.imbio.2016.01.009.
- Ferreira, R. R., de Souza, E. M., de Oliveira, F. L., Ferr??o, P. M., Gomes, L. H. F., Mendon??a-Lima, L., et al. (2016b). Proteins involved on TGF- β pathway are up-regulated during the acute phase of experimental Chagas disease. *Immunobiology* 221, 587–94. doi:10.1016/j.imbio.2016.01.009.
- Filigheddu, M. T., G??rgolas, M., and Ramos, J. M. (2017). Enfermedad de Chagas de transmisi??n oral. *Med. Clin. (Barc)*. 148, 125–131. doi:10.1016/j.medcli.2016.10.038.
- Fisk, M., Cheriyan, J., Mohan, D., Forman, J., Mäki-Petäjä, K. M., McEniery, C. M., et al. (2018). The p38 mitogen activated protein kinase inhibitor losmapimod in chronic obstructive pulmonary disease patients with systemic inflammation, stratified by fibrinogen: A randomised double-blind placebo-controlled trial. *PLoS One* 13, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0194197.
- Fix, C., Bingham, K., and Carver, W. (2011). Effects of Interleukin-18 on Cardiac Fibroblast Function and Gene Expression. *Cytokine* 53, 19–28. doi:10.1038/cdd.2010.172.MicroRNAs.
- Forsyth, C. J., Hernandez, S., Olmedo, W., Abuhamidah, A., Traina, M. I., Sanchez, D. R., et al. (2016). Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 63, 1056–1062. doi:10.1093/cid/ciw477.
- Frangiannis, N. G. (2018). Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol. Aspects Med.*, 0–1. doi:10.1016/j.mam.2018.07.001.
- Frantz, C., Stewart, K. M., and Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195–200. doi:10.1242/jcs.023820.
- Fujiu, K., and Nagai, R. (2014). Fibroblast-mediated pathways in cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 64–73. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.01.013.
- Furtado, M. B., and Hasham, M. (2017). *Properties and Immune Function of Cardiac Fibroblasts*. doi:10.1007/978-3-319-57613-8.
- Garg, N. J., Bonney, K. M., Kim, S. A., Engman, D. M., and Luthringer, D. J. (2018). Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 14, 421–447. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043711.
- Garzoni, L. R., Adesse, D., Soares, M. J., Rossi, M. I. D., Borojevic, R., and de Meirelles, M. D. N. L. (2008). Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J. Infect. Dis.* 197, 906–15. doi:10.1086/528373.
- Ghatak, S., Maytin, E. V., Mack, J. A., Hascall, V. C., Atanelishvili, I., Moreno Rodriguez, R., et al. (2015). Roles of Proteoglycans and Glycosaminoglycans in Wound Healing and Fibrosis. *Int. J. Cell Biol.* 2015, 1–20. doi:10.1155/2015/834893.
- Guedes, P. M. M., Veloso, V. M., Afonso, L. C. C., Caliari, M. V., Carneiro, C. M., Diniz, L. F., et al. (2009). Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 130, 43–52. doi:10.1016/j.vetimm.2009.01.004.
- Gutierrez, F. R. S. S., Guedes, P. M. M. M., Gazzinelli, R. T., and Silva, J. S. (2009). The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunol.* 31, 673–685. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01108.x.
- Hall, B. S., and Pereira, M. A. (2000). Dual Role for Transforming Growth Factor beta-Dependent Signaling in *Trypanosoma cruzi* Infection of Mammalian Cells. 68, 2077–2081.
- Hall, C. L., Wells, A. R., and Leung, K. P. (2018). Pirfenidone reduces profibrotic responses in human dermal myofibroblasts, in vitro. *Lab. Investig.* 98, 640–655. doi:10.1038/s41374-017-0014-3.
- Han, Y. lei, Li, Y. lin, Jia, L. xin, Cheng, J. zhong, Qi, Y. fen, Zhang, H. jia, et al. (2012). Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN- γ and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis. *PLoS One* 7, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0035506.
- Hinz, B. (2015). Myofibroblasts. *Exp. Eye Res.* 142, 56–70. doi:10.1016/j.exer.2015.07.009.
- Holmes, D. F., Lu, Y., Starborg, T., and Kadler, K. E. (2018). *Collagen Fibril Assembly and Function*. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.02.004.
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., and Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49, 1215–1228. doi:10.1093/rheumatology/keq031.
- Ignatz RA, M. J. (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261, 4337–45.
- Ignatz RA, M. J. (1987). Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor-beta action. *Cell*

- Ilić, D., Kovacic, B., Johkura, K., Schlaepfer, D. D., Tomasević, N., Han, Q., et al. (2004). FAK promotes organization of fibronectin matrix and fibrillar adhesions. *J. Cell Sci.* 117, 177–87. doi:10.1242/jcs.00845.
- Iozzo, R. V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Physiol. Behav.* 42, 11–15. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Issa, V. S. (2018). The Indeterminate Form of Chagas Disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, 111–112. doi:10.5935/abc.20180027.
- Ivey, M. J., and Tallquist, M. D. (2016). Defining the Cardiac Fibroblast: A New Hope. *Circ. J.* 80, 2269–2276. doi:10.1253/circj.CJ-16-1003.Defining.
- JR Bradley (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 216, 399–407. doi:10.1002/path.
- Kalil-Filho, R. (2015). Globalization of Chagas Disease Burden and New Treatment Perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 1190–1192. doi:10.1016/j.jacc.2015.07.024.
- Kalluri, R., and Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119. doi:10.1172/JCI39104.1420.
- Kapur, N. K., Wilson, S., Yunis, A. a, Qiao, X., Mackey, E., Paruchuri, V., et al. (2012). Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation* 125, 2728–38. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.080002.
- Kim, E. S., and Keating, G. M. (2015). Pirfenidone: A review of its use in idiopathic pulmonary fibrosis. *Drugs* 75, 219–230. doi:10.1007/s40265-015-0350-9.
- Kim, S.-H., Turnbull, J., and Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 209, 139–51. doi:10.1530/JOE-10-0377.
- Kojonazarov, B., Novoyatleva, T., Boehm, M., Happe, C., Sibinska, Z., Tian, X., et al. (2017). P38 mapk inhibition improves heart function in pressure-loaded right ventricular hypertrophy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 57, 603–614. doi:10.1165/rcmb.2016-0374OC.
- Kong, P., Christia, P., and Frangogiannis, N. G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 549–74. doi:10.1007/s00018-013-1349-6.
- Kovarik, P., Stoiber, D., Eysers, P. A., Menghini, R., Neining, A., Gaestel, M., et al. (2002). Stress-induced phosphorylation of STAT1 at Ser727 requires p38 mitogen-activated protein kinase whereas IFN-gamma uses a different signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13956–13961. doi:10.1073/pnas.96.24.13956.
- Köwitsch, A., Zhou, G., and Groth, T. (2018). Medical application of glycosaminoglycans: a review. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12, e23–e41. doi:10.1002/term.2398.
- Krenning, G., Zeisberg, E. M., and Kalluri, R. (2010). The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 225, 631–7. doi:10.1002/jcp.22322.
- Kumar, A., Singh, U. K., Kini, S. G., Garg, V., Agrawal, S., Tomar, P. K., et al. (2015). JNK pathway signaling: A novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases. *Future Med. Chem.* 7, 2065–2086. doi:10.4155/fmc.15.132.
- L. García-Pozo, M.E. Miquilena-Colina, T. L.-R. and C. G.-M. (2008). Endoglin : structure , biological functions and role in fibrogenesis. *Rev. Española Enfermedades Dig.* 401, 355–360.
- Lancaster, L. H., de Andrade, J. A., Zibrak, J. D., Padilla, M. L., Albera, C., Nathan, S. D., et al. (2017). Pirfenidone safety and adverse event management in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* 26, 170057. doi:10.1183/16000617.0057-2017.
- Lannes-vieira, J., Pereira, I. R., Vinagre, N. F., Elena, L., and Arnez, A. (2011). TNF- α and TNFR in Chagas Disease: From Protective Immunity to Pathogenesis of Chronic Cardiomyopathy. *Adv. TNF Fam. Reseach* 691, 221–230. doi:10.1007/978-1-4419-6612-4.
- Leask, A. (2007). TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc. Res.* 74, 207–12. doi:10.1016/j.cardiores.2006.07.012.
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., and Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect. Dis.* 13, 342–8. doi:10.1016/S1473-3099(13)70002-1.
- Leiss, M., Beckmann, K., Girós, A., Costell, M., and Fässler, R. (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 502–7. doi:10.1016/j.ceb.2008.06.001.
- Leong, K. G., and Karsan, A. (2000). Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor α . *Histol. Histopathol.* 15, 1303–1325.
- Lepesheva, G. I. (2013). Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: What shows the most promise? *Expert Opin Drug Discov.* 8, 1–17. doi:10.1517/17460441.2013.845554.Design.
- Li, L., Zhao, Q., and Kong, W. (2018). Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol.* 68–69, 490–506. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.013.
- Li, Z., Liu, X., Wang, B., Nie, Y., Wen, J., Wang, Q., et al. (2017). Pirfenidone suppresses MAPK signalling pathway to reverse epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Nephrology* 22, 589–597. doi:10.1111/nep.12831.
- Liang, K., Dong, S. R., and Peng, H. (2016). Serum levels and clinical significance of IFN- γ and IL-10 in PATIENTS

- with coronary heart disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 1339–1343.
- Liang, Q., and Molkentin, J. D. (2003). Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: Dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 1385–1394. doi:10.1016/j.yjmcc.2003.10.001.
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., et al. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Heal.* 7, 1–13. doi:10.3389/fpubh.2019.00166.
- Liew, R., Khairunnisa, K., Gu, Y., Tee, N., Yin, N. O., Naylynn, T. M., et al. (2013). Role of Tumor Necrosis Factor- α in the Pathogenesis of Atrial Fibrosis and Development of an Arrhythmogenic Substrate. *Circ. J.* 77, 1171–1179. doi:10.1253/circj.cj-12-1155.
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., and Regenstein, J. M. (2015). Collagen and Gelatin. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 527–557. doi:10.1146/annurev-food-031414-111800.
- LK, N., MS, M., C, M., L, S.-B., LH, A., PE, A., et al. (2014). Losmapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in non-ST-segment elevation myocardial infarction: A randomised phase 2 trial. *Lancet* 384, 1187–1195. doi:10.1016/S0140-6736(14)60417-7.
- Lopez-De Leon, A., and Rojkind, M. (1985). A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. *J. Histochem. Cytochem.* 33, 737–743. doi:10.1177/33.8.2410480.
- Lorena, V. M. B., Lorena, I. M. B., Braz, S. C. M., Melo, A. S., Melo, M. F. A. D., Melo, M. G. A. C., et al. (2010). Cytokine levels in serious cardiopathy of chagas disease after in vitro stimulation with recombinant antigens from trypanosoma cruzi. *Scand. J. Immunol.* 72, 529–539. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02462.x.
- Ma, Q., Liu, Y., and Chen, L. (2018a). JIP3 deficiency attenuates cardiac hypertrophy by suppression of JNK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503, 1–7. doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.208.
- Ma, Y., Iyer, R. P., Jung, M., Czubyrt, M. P., and Lindsey, M. L. (2017). Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 448–458. doi:10.1016/j.tips.2017.03.001.
- Ma, Z. G., Yuan, Y. P., Wu, H. M., Zhang, X., and Tang, Q. Z. (2018b). Cardiac fibrosis: New insights into the pathogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 1645–1657. doi:10.7150/ijbs.28103.
- Machado, F. S., Martins, G. a., Aliberti, J. C. S., Mestriner, F. L. a. C., Cunha, F. Q., and Silva, J. S. (2000). Trypanosoma cruzi-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. *Circulation* 102, 3003–3008. doi:10.1161/01.CIR.102.24.3003.
- Machado, F. S., Tanowitz, H. B., and Ribeiro, A. L. (2013). Pathogenesis of Chagas cardiomyopathy: Role of inflammation and oxidative stress. *J. Am. Heart Assoc.* 2, 8–11. doi:10.1161/JAHA.113.000539.
- Magnusson, M. K., and Mosher, D. F. (1998). Fibronectin : Structure, Assembly, and Cardiovascular Implications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1363–1370. doi:10.1161/01.ATV.18.9.1363.
- Maldonado, I. R. S. C., Ferreira, M. L., Camargos, E. R. S., Chiari, E., and Machado, C. R. S. (2004). Skeletal muscle regeneration and Trypanosoma cruzi-induced myositis in rats. *Histol. Histopathol.* 19, 85–93.
- Mao, Y., and Schwarzbauer, J. E. (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol.* 24, 389–99. doi:10.1016/j.matbio.2005.06.008.
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., and Simões, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115, 1109–1123. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296.
- Marin-neto, J. A., Jr, A. R., Jr, A. A., Mattos, A. C., and Rassi, A. (2009). The BENEFIT trial : testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 319–324.
- Martin, D. L., Postan, M., Lucas, P., Gress, R., and Tarleton, R. L. (2007). TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental Trypanosoma cruzi infection. *Eur. J. Immunol.* 37, 2764–71. doi:10.1002/eji.200737033.
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–30. doi:10.1038/nrm3434.
- Maurer, L. M., Ma, W., and Mosher, D. F. (2016). Dynamic structure of plasma fibronectin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 51, 213–227. doi:10.1080/10409238.2016.1184224.
- Maya, J. D., Orellana, M., Ferreira, J., Kemmerling, U., López-muñoz, R., and Morello, A. (2010). Chagas disease : Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. 323–331.
- Meeks, B., Melacini, P. R., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., et al. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373, 1295–1306. doi:10.1056/NEJMoa1507574.
- Meirelles, M. N. S. L., de Araújo-Jorge, T. C., Miranda, C. F., de Souza, W., Barbosa, H. S., and Meirelles MN, de Araújo-Jorge TC, Miranda CF, de Souza W, B. H. (1986). Interaction of Trypanosoma cruzi with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol.* 41, 198–206.
- Melo, T. G., Tucci, A. R., Nogueira, A. R., Meirelles, M. D. N. S. L., and Pereira, M. C. S. (2014). The involvement of FAK and Src in the invasion of cardiomyocytes by Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.* 139, 49–57.

- doi:10.1016/j.exppara.2014.02.008.
- Menezes Junior, A. da S., Lopes, C. C., Cavalcante, P. F., and Martins, E. (2018). Chronic Chagas Cardiomyopathy Patients and Resynchronization Therapy: a Survival Analysis. *Brazilian J. Cardiovasc. Surg.* 33, 82–88. doi:10.21470/1678-9741-2017-0134.
- Mienaltowski, M. J., and Birk, D. E. (2014). Structure, Physiology, and Biochemistry of Collagens. 802. doi:10.1007/978-94-007-7893-1.
- Ming, M., Ewen, M. E., Pereira, M. E. A., and Street, W. (1995). Trypanosome Invasion of Mammalian Cells Requires Activation of the TGF β Signaling Pathway. 82, 287–296.
- Molkentin, J. D., Bugg, D., Ghearing, N., Dorn, L. E., Kim, P., Sargent, M. A., et al. (2017). Fibroblast-specific genetic manipulation of p38 MAPK in vivo reveals its central regulatory role in fibrosis. *Circulation* 136, 549–561. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026238.
- Moncayo, Á., and Silveira, A. C. (2017). Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: epidemiology, surveillance, and health policies. *Am. Trypanos. Chagas Dis.*, 59–88. doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00004-6.
- Monteón VM, Furuzawa-Carballeda J, Alejandre-Aguilar R, Aranda-Fraustro A, Rosales-Encina JL, R. P., Monteón, V. M., Furuzawa-Carballeda, J., Alejandre-Aguilar, R., Aranda-Fraustro, A., Rosales-Encina, J. L., et al. (1996). American trypanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp. Parasitol.* 83, 267–2774.
- Moore-morris, T., Cattaneo, P., Puceat, M., Evans, S. M., Jolla, L., Jolla, L., et al. (2016). Origins of Cardiac Fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 91, 1–5. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.12.031.Origins.
- Moraes, A. V. de, Esteves-Filho, A., Barbero-Marcial, M., Belloti, G., Kalil, R., Bocchi, E. A., et al. (2004). In vivo detection of Trypanosoma cruzi antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am. Heart J.* 131, 301–307. doi:10.1016/s0002-8703(96)90358-0.
- Moretti, F. a, Chauhan, A. K., Iaconcig, A., Porro, F., Baralle, F. E., and Muro, A. F. (2007). A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J. Biol. Chem.* 282, 28057–62. doi:10.1074/jbc.M611315200.
- Morikawa, M., Derynck, R., and Miyazono, K. (2016). TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8. doi:10.1101/cshperspect.a021873.
- Morillo, C. A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., et al. (2017). Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 939–947. doi:10.1016/j.jacc.2016.12.023.
- Mott, G. A., Costales, J. a, and Burleigh, B. a (2011). A soluble factor from Trypanosoma cruzi inhibits transforming growth factor- β -induced MAP kinase activation and gene expression in dermal fibroblasts. *PLoS One* 6, e23482. doi:10.1371/journal.pone.0023482.
- Moustakas A, H. C., Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573–84. doi:10.1242/jcs.02554.
- Mouw, J. K., Ou, G., and Weaver, V. M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 771–785. doi:10.1038/nrm3902.
- Mu Y, Gudey SK, L. M. (2012). Non-SMAD signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347, 11–20.
- Mu, Y., Gudey, S. K., Landström, M., and Mu Y, Gudey SK, L. M. (2012). Non-SMAD signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347, 11–20. doi:10.1007/s00441-011-1201-y.
- Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J., and Sosa-Estani, S. (2018). *Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease*. Taylor & Francis doi:10.1080/17512433.2018.1509704.
- Nakazato, H., Oku, H., Yamane, S., Tsuruta, Y., and Suzuki, R. (2002). A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor- α at the translational level. *Eur. J. Pharmacol.* 446, 177–185. doi:10.1016/S0014-2999(02)01758-2.
- Nogueira, P. M., Ribeiro, K., Silveira, A. C. O., Campos, J. H., Martins-Filho, O. A., Bela, S. R., et al. (2015). Vesicles from different Trypanosoma cruzi strains trigger differential innate and chronic immune responses . *J. Extracell. Vesicles* 4, 28734. doi:10.3402/jev.v4.28734.
- Nomura-Kitabayashi, A., Anderson, G. a, Sleep, G., Mena, J., Karabegovic, A., Karamath, S., et al. (2009). Endoglin is dispensable for angiogenesis, but required for endocardial cushion formation in the midgestation mouse embryo. *DEV Biol.* 335, 66–77. doi:10.1016/j.ydbio.2009.08.016.
- Nunes, M. C. P., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., et al. (2018). *Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association*. doi:10.1161/CIR.0000000000000599.
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. a, Encina, J. J., and Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 767–76. doi:10.1016/j.jacc.2013.05.046.
- O'Donoghue, M. L., Glaser, R., Cavender, M. A., Aylward, P. E., Bonaca, M. P., Budaj, A., et al. (2016). Effect of losmapimod on cardiovascular outcomes in patients hospitalized with acute myocardial infarction: A

- randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 315, 1591–1599. doi:10.1001/jama.2016.3609.
- Oliveira, F. O. R. De, Alves, C. R., Calvet, C. M., Toma, L., Bouças, R. I., Nader, H. B., et al. (2008). Trypanosoma cruzi heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. *Microb Pathog* 44, 329–338. doi:10.1016/j.micpath.2007.10.003.
- Ortí-Lucas, R. M., Parada-Barba, M. C., de la Rubia-Ortí, J. E., Carrillo-Ruiz, A., Beso-Delgado, M., and Boone, A. L. D. (2014). Impact of chagas disease in bolivian immigrants living in europe and the risk of stigmatization. *J. Parasitol. Res.* 2014, 514794. doi:10.1155/2014/514794.
- Page, C. (2013). Heparin and Related Drugs: Beyond Anticoagulant Activity. *ISRN Pharmacol.* 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/910743.
- Pascoe, S., Costa, M., Marks-Konczalik, J., McKie, E., Yang, S., and Scherbovsky, P. S. (2017). Biological effects of p38 MAPK inhibitor losmapimod does not translate to clinical benefits in COPD. *Respir. Med.* 130, 20–26. doi:10.1016/j.rmed.2017.07.002.
- Pecoul, B., Batista, C., Stobbaerts, E., Ribeiro, I., Vilasanjuan, R., Gascon, J., et al. (2016). The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004343. doi:10.1371/journal.pntd.0004343.
- Pereira, I. R., Vilar-pereira, G., Alice, A., and Lannes-vieira, J. (2014a). Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum : models of mild and severe disease. 109, 289–298. doi:10.1590/0074-0276140033.
- Pereira, I. R., Vilar-Pereira, G., Moreira, O. C., Ramos, I. P., Gibaldi, D., Britto, C., et al. (2015). Pentoxifylline Reverses Chronic Experimental Chagasic Cardiomyopathy in Association with Repositioning of Abnormal CD8+ T-Cell Response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–23. doi:10.1371/journal.pntd.0003659.
- Pereira, I. R., Vilar-Pereira, G., Silva, A. A., Moreira, O. C., Britto, C., Sarmento, E. D. M., et al. (2014b). Tumor Necrosis Factor Is a Therapeutic Target for Immunological Unbalance and Cardiac Abnormalities in Chronic Experimental Chagas' Heart Disease. *Mediators Inflamm.* 2014, 1–16. doi:10.1155/2014/798078.
- Pereira, M. C. de S., Costa, M., Chagas Filho, C., de Meirelles, M. D. N. S. L., and PEREIRA, Mirian C. S. ; COSTA, M. L. ; CHAGASFILHO, C. ; MEIRELLES, M. N. S. L. (1993). Myofibrillar breakdown and Cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by Trypanosoma cruzi: immunological and ultrastructural study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 25, 559–569.
- Pereira, M. C. de S., Singer, R., and Meirelles, M. N. L. (2000). Ultrastructural Distribution of Poly (A)+ RNA During Trypanosoma cruzi- Cardiomyocyte Interaction in vitro: A Quantitative Analysis of the Total mRNA Content by in situ Hybridization. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 264–270.
- Pérez-Molina, J. A., and Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet* 391, 82–94. doi:10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- Pinazo, M. J., Thomas, M. C., Bustamante, J., de Almeida, I. C., Lopez, M. C., and Gascon, J. (2015). Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: State of the art and future perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 422–432. doi:10.1590/0074-02760140435.
- Pinho, R. T., Vannier-Santos, M. A., Alves, C. R., Marino, A. P. M. P., Castello Branco, L. R. R., and Lannes-Vieira, J. (2002). Effect of Trypanosoma cruzi released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. *Acta Trop.* 83, 103–115. doi:10.1016/S0001-706X(02)00062-1.
- Pomin, V. H., and Mulloy, B. (2018). Glycosaminoglycans and proteoglycans. *Pharmaceuticals* 11, 1–9. doi:10.3390/ph11010027.
- Poveda, C., Fresno, M., Gironès, N., Martins-Filho, O. A., Ramírez, J. D., Santi-Rocca, J., et al. (2014). Cytokine profiling in chagas disease: Towards understanding the association with infecting Trypanosoma cruzi discrete typing units (A benefit trial sub-study). *PLoS One* 9, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0091154.
- Prydz, K. (2015). Determinants of glycosaminoglycan (GAG) structure. *Biomolecules* 5, 2003–2022. doi:10.3390/biom5032003.
- Q, L., L, C., DM, S., and X., M. (2018). Effects of tetrandrine on proliferation and activation of cardiac fibroblasts. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 50, 331–334.
- Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., et al. (2017). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite–host cell interaction of Trypanosoma cruzi in eukaryotic cells. *Cell. Microbiol.* 19. doi:10.1111/cmi.12672.
- Rassi, A., de Rezende, J. M., Luquetti, A. O., and Rassi, A. (2017a). *Clinical phases and forms of Chagas disease*. Second Edi. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-801029-7.00029-0.
- Rassi, A., and Marcondes de Rezende, J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 275–91. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002.
- Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- Rassi, A., Marin-Neto, J. A., and Rassi, A. (2017b). Chronic chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 224–235. doi:10.1590/0074-02760160334.

- Reifenberg, K., Lehr, H. A., Torzewski, M., Steige, G., Wiese, E., Küpper, I., et al. (2007). Interferon- γ induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 171, 463–472. doi:10.2353/ajpath.2007.060906.
- Reis, M. M., Higuchi, M. de L., Benvenuti, L. A., Aiello, V. D., Gutierrez, P. S., Bellotti, G., et al. (1997). An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R⁺ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83, 165–72.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–19. doi:10.1101/cshperspect.a004978.
- Rios, A., Ribeiro, M., Sousa, A., Pimentel, F., Hagström, L., Andrade, R., et al. (2018). Can sexual transmission support the enzootic cycle of *trypanosoma cruzi*? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, 3–8. doi:10.1590/0074-02760170025.
- Robertson, I. B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., and Rifkin, D. B. (2016). Latent TGF- β -binding proteins. 47, 44–53. doi:10.1016/j.matbio.2015.05.005.Latent.
- Rocha Rodrigues, D. B., dos Reis, M. A., Romano, A., Pereira, S. A. D. L., Teixeira, V. D. P. A., Tostes, S., et al. (2012). In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 361730. doi:10.1155/2012/361730.
- Rodríguez-barbero, A., Obreo, J., and Álvarez-muñoz, P. (2006). Endoglin Modulation of TGF- β 1-Induced Collagen Synthesis is Dependent on ERK1/2 MAPK Activation. *Cell. Physiol. Biochem.*, 135–142.
- Rodríguez-Barbero, A., Obreo, J., Álvarez-Muñoz, P., Pandiella, A., Bernabeu, C., and Lopes-Novoa, J. M. (2006). Endoglin Modulation of TGF- β induced collagen synthesis is dependent on ERK1 / 2 MAPK Activation. *Cell. Physiol. Biochem.* 18, 135–142.
- Rose, B. A., Force, T., and Wang, Y. (2010). Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in the Heart: Angels Versus Demons in a Heart-Breaking Tale. *Physiol Rev* 90, 1–62. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Rosemary J. Akhurst and Akiko Hata (2012). Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov.* 11, 790–811. doi:10.1038/nrd3810.Targeting.
- Russo, C., and Polosa, R. (2005). TNF- α as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clin. Sci.* 109, 135–142. doi:10.1042/CS20050038.
- Sabapathy, K. (2012). Role of the JNK Pathway in human diseases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 106, 145–169. doi:10.1016/B978-0-12-396456-4.00013-4.
- Salazar, B. L., Albéniz, R., Guedón, A., and Miqueo, G. (2006). Altered Fibrillar Collagen Metabolism in Hypertensive Heart Failure . Current Understanding and Future Prospects. 59, 1047–1057.
- Sales, P. A., Molina, I., Murta, S. M. F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., et al. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 1289–1303. doi:10.4269/ajtmh.16-0761.
- Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Rodríguez-Palomares, J., Sulleiro, E., Sao-Avilés, A., Roure, S., et al. (2016). Chagas cardiomyopathy: Usefulness of ekg and echocardiogram in a Non-Endemic country. *PLoS One* 11, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0157597.
- Sasaki, M., Kashima, M., Ito, T., Watanabe, A., Sano, M., Kagaya, M., et al. (2000). Effect of heparin and related glycosaminoglycan on PDGF-induced lung fibroblast proliferation, chemotactic response and matrix metalloproteinases activity.
- Schaefer, L., and Schaefer, R. M. (2010). Proteoglycans: From structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 339, 237–246. doi:10.1007/s00441-009-0821-y.
- Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., et al. (2009). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nat. Methods* 9, 241. doi:10.1038/nmeth.2019.Fiji.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004). Interferon gamma orchestrates : an overview of signals , mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189. doi:10.1189/jlb.0603252.Journal.
- Scott P Levick, and Goldspink, P. H. (2014). Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Hear. Fail Rev.* 19, 227–236. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4002.BONE.
- Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., et al. (2011a). Latent TGF- β structure and activation. *Nature* 474, 343–9. doi:10.1038/nature10152.
- Shi, Q., Liu, X., Bai, Y., Cui, C., Li, J., Li, Y., et al. (2011b). In vitro effects of pirfenidone on cardiac fibroblasts: Proliferation, myofibroblast differentiation, migration and cytokine secretion. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0028134.
- Shinde, A. V., and Frangiannis, N. G. (2014). Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 70, 74–82. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.11.015.
- Simões, M. V., Romano, M. M. D., Schmidt, A., Martins, K. S. M., and Marin-Neto, J. A. (2018a). Cardiomiopatia da

- Doença de Chagas. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 31, 173–189. doi:10.5935/2359-4802.20180011.
- Simões, M. V., Romano, M. M. D., Schmidt, A., Martins, K. S. M., and Marin-Neto, J. A. (2018b). Chagas Disease Cardiomyopathy. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 31, 173–189. doi:10.5935/2359-4802.20180011.
- Singh Purva, C. C. and S. J. E. (2010). Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 26, 397–419. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020.Assembly.
- Soares, M. B. P., de Lima, R. S., Rocha, L. L., Vasconcelos, J. F., Rogatto, S. R., dos Santos, R. R., et al. (2010). Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy. *J. Infect. Dis.* 202, 416–26. doi:10.1086/653481.
- Sobczak, A. I. S., Pitt, S. J., and Stewart, A. J. (2018). Glycosaminoglycan neutralization in coagulation control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 1258–1270. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311102.
- Stempin, C. C., Garrido, V. V., Dulgerian, L. R., and Cerbán, F. M. (2008). Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of *Trypanosoma cruzi* in macrophages. *Acta Trop.* 106, 119–27. doi:10.1016/j.actatropica.2008.02.004.
- Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasit. Vectors* 7, 317. doi:10.1186/1756-3305-7-317.
- Strauss, D. G., Cardoso, S., Lima, J. a C., Rochitte, C. E., and Wu, K. C. (2011). ECG scar quantification correlates with cardiac magnetic resonance scar size and prognostic factors in Chagas' disease. *Heart* 97, 357–361. doi:10.1136/hrt.2010.210047.
- Suman, S., Rachakonda, G., Mandape, S. N., Sakhare, S. S., Villalta, F., Pratapid, S., et al. (2018). Phospho-proteomic analysis of primary human colon epithelial cells during the early *Trypanosoma cruzi* infection phase. doi:10.1371/journal.pntd.0006792.
- Sun, M., Chen, M., Dawood, F., Zurawska, U., Li, J. Y., Parker, T., et al. (2007). Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation* 115, 1398–407. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.643585.
- Sun, Y., Zhang, Y., and Chi, P. (2018). Pirfenidone suppresses TGF- β 1-induced human intestinal fibroblasts activities by regulating proliferation and apoptosis via the inhibition of the Smad and PI3K/AKT signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 18, 3907–3913. doi:10.3892/mmr.2018.9423.
- Tallquist, M. D., and Molkentin, J. D. (2017). Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat. Rev. Cardiol.* 14, 484–491. doi:10.1038/nrcardio.2017.57.
- Tarleton, R. L. (2016). Chagas Disease: A Solvable Problem, Ignored. *Trends Mol. Med.* 22, 835–838. doi:10.1016/j.molmed.2016.07.008.
- Tassi, E. M., Continentino, M. A., Nascimento, E. M. Do, Pereira, B. D. B., and Pedrosa, R. C. (2014). Relationship between Fibrosis and Ventricular Arrhythmias in Chagas Heart Disease Without Ventricular Dysfunction. *Arq. Bras. Cardiol.*, 456–464. doi:10.5935/abc.20140052.
- Tau, G., and Rothman, P. (1999). Biologic functions of the IFN- γ receptors. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 54, 1233–1251. doi:10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x.
- Taylor, K. R., and Gallo, R. L. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 20, 9–22. doi:10.1096/fj.05-4682rev.
- Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., and Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 592–630. doi:10.1128/CMR.00063-10.
- Theiss, A. L., Simmons, J. G., Jobin, C., and Lund, P. K. (2005). Tumor necrosis factor (TNF) α increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J. Biol. Chem.* 280, 36099–36109. doi:10.1074/jbc.M505291200.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., and Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 4–27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001.
- Torres, O. A., Calzada, J. E., Beraún, Y., Morillo, C. A., González, A., González, C. I., et al. (2010). Role of the IFNG +874T/A polymorphism in Chagas disease in a Colombian population. *Infect. Genet. Evol.* 10, 682–685. doi:10.1016/j.meegid.2010.03.009.
- Travers, J. G., Kamal, F. A., Robbins, J., Yutzey, K. E., and Burns, C. (2017). Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ. Res.* 118, 1021–1040. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306565.Cardiac.
- Turner, N. A. (2016). Inflammatory and fibrotic responses of cardiac fibroblasts to myocardial damage associated molecular patterns (DAMPs). *J. Mol. Cell. Cardiol.* 94, 189–200. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.002.
- Udoko, A. N., Johnson, C. A., Dykan, A., Rachakonda, G., Villalta, F., Mandape, S. N., et al. (2016). Early Regulation of Profibrotic Genes in Primary Human Cardiac Myocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–23. doi:10.1371/journal.pntd.0003747.
- Valledor, A. F., Sanchez-Tillo, E., Arpa, L., Park, J. M., Caelles, C., Lloberas, J., et al. (2014). Selective Roles of MAPKs during the Macrophage Response to IFN-. *J. Immunol.* 180, 4523–4529. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4523.
- Van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R. E., and Libert, C. (2011). Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 311–319. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.09.004.

- Varfolomeev, E., and Vucic, D. (2018). Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine* 101, 26–32. doi:10.1016/j.cyto.2016.08.035.
- Vilar-Pereira, G., Resende Pereira, I., De Souza Ruivo, L. A., Cruz Moreira, O., Da Silva, A. A., Britto, C., et al. (2016). Combination chemotherapy with suboptimal doses of benznidazole and pentoxifylline sustains partial reversion of experimental Chagas' heart disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4297–4309. doi:10.1128/AAC.02123-15.
- Waghabi, M. C., Coutinho-silva, R., Feige, J., Higuchi, M. D. L., Becker, D., Burnstock, G., et al. (2009). Gap junction reduction in cardiomyocytes following transforming growth factor- β treatment and *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1083–1090. doi:S0074-02762009000800004 [pii].
- Waghabi, M. C., Coutinho, C. M. L. M., Soeiro, M. N. C., Pereira, M. C. S., Feige, J., Keramidas, M., et al. (2002). Increased *Trypanosoma cruzi* Invasion and Heart Fibrosis Associated with High Transforming Growth Factor β Levels in Mice Deficient in $\alpha 2$ -Macroglobulin. *Infect. Immun.* 70, 5115–5123. doi:10.1128/IAI.70.9.5115.
- Waghabi, M. C., Keramidas, M., Bailly, S., Degrave, W., Mendonça-Lima, L., Soeiro, M. D. N. C., et al. (2005a). Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am. J. Pathol.* 167, 993–1003.
- Waghabi, M. C., Keramidas, M., Bailly, S., Degrave, W., Nazare, M. De, Meirelles, M. D. N. L., et al. (2005b). Uptake of Host Cell Transforming Growth Factor- β by *Trypanosoma cruzi* Amastigotes in Cardiomyocytes Potential Role in Parasite Cycle Completion. 167, 993–1003.
- Waghabi, M. C., Keramidas, M., Calvet, C. M., Meuser, M., de Nazaré C Soeiro, M., Mendonça-Lima, L., et al. (2007a). SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2905–10. doi:10.1128/AAC.00022-07.
- Waghabi, M. C., Keramidas, M., Calvet, C. M., Meuser, M., Soeiro, M. D. N. C., Mendonça-Lima, L., et al. (2007b). SB-431542, a transforming growth factor β inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51. doi:10.1128/AAC.00022-07.
- Waghabi, M. C., Keramidas, M., Feige, J.-J., Araujo-Jorge, T. C., and Bailly, S. (2005c). Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* 7, 511–7. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00481.x.
- Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC, B. S. (2009). Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4694–701.
- Waghabi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC, B. S., Waghabi, M. C., de Souza, E. M., de Oliveira, G. M., Keramidas, M., Feige, J.-J., et al. (2009). Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4694–701. doi:10.1128/AAC.00580-09.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45–65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189.
- Wallach, D. (2016). The cybernetics of TNF: Old views and newer ones. *Semin. Cell Dev. Biol.* 50, 105–114. doi:10.1016/j.semcdb.2015.10.014.
- Wang, Y., Wu, Y., Chen, J., Zhao, S., and Li, H. (2013). Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 Inflammasome formation. *Cardiol.* 126, 1–11. doi:10.1159/000351179.
- Ward, L. S., Guariento, M. E., and Fernandes, G. A. (1999). Serum cytokines in chronic Chagas' disease Citocinas séricas na forma crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 285–289.
- Weiss, A., and Attisano, L. (2013). The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2, 47–63. doi:10.1002/wdev.86.
- WHO (2012). Chagas Disease- factsheet. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 519–522.
- Wu, W., Muchir, A., Shan, J., Bonne, G., and Worman, H. J. (2011). Mitogen-activated protein kinase inhibitors improve heart function and prevent fibrosis in cardiomyopathy caused by mutation in Lamin A/C gene. *Circulation* 123, 53–61. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970673.
- Wu, W., Shan, J., Bonne, G., Worman, H. J., and Muchir, A. (2010). Pharmacological inhibition of c-Jun N-terminal kinase signaling prevents cardiomyopathy caused by mutation in LMNA gene. *Biochim Biophys Acta* 1802, 632–638. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Wyler DJ, Libby P, Prakash S, Prioli RP, P. M. (1987). Elaboration by mammalian mesenchymal cells infected with *Trypanosoma cruzi* of a fibroblast-stimulating factor that may contribute to chagasic cardiomyopathy. *Infect Immun.* 55, 3188–3191.
- Yan, X., Liu, Z., and Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- β signaling by Smad7 Overview of TGF- β Signaling Pathways. 263–272. doi:10.1093/abbs/gmp018.Review.
- Yibin, W. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinases in Heart Development and Diseases. *Circulation* 116, 1–21.

- doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679589.
- Yokota, Tomohiro and Wang, Y. (2016). p38 MAP Kinases in Heart. *Gene* 575, 369–376. doi:10.1016/j.gene.2015.09.030.
- Yu, X. H., Zhang, J., Zheng, X. L., Yang, Y. H., and Tang, C. K. (2015). Interferon- γ in foam cell formation and progression of atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* 441, 33–43. doi:10.1016/j.cca.2014.12.007.
- Yue, B. (2014). Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. *J Glaucoma* 0000000000, 20–23. doi:10.1097/IJG.0000000000000108.
- Zhang, L., and Tarleton, R. L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J. Infect. Dis.* 180, 480–486.
- Zhang, Y. E. (2010). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* 19, 128–139. doi:10.1038/cr.2008.328.Non-Smad.
- Zhao, B., and Chen, Y.-G. (2014). Regulation of TGF- β Signal Transduction. *Scientifica (Cairo)*. 2014, 874065. doi:10.1155/2014/874065.
- Zuo, G., Ren, X., Qian, X., Ye, P., Luo, J., Gao, X., et al. (2019). Inhibition of JNK and p38 MAPK-mediated inflammation and apoptosis by ivabradine improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J. Cell. Physiol.* 234, 1925–1936. doi:10.1002/jcp.27070.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).